

**UNESP-UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CONSÓRCIOS MICROBIANOS ASSOCIADOS A AMBIENTES DE MINAS:  
OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

**ÍRIS GABRIELA GARCIA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Denise Bevilaqua**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**2013**

**ÍRIS GABRIELA GARCIA**

**CONSÓRCIOS MICROBIANOS ASSOCIADOS A AMBIENTES DE MINAS:  
OBTENÇÃO, AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Bevilaqua**

**Araraquara- SP  
2013**

FICHA CATALOGRAFICA

G216c Garcia, Íris Gabriela  
Consórcios microbianos associados a ambientes de minas : obtenção, avaliação fisiológica e molecular / Íris Gabriela Garcia. – Araraquara : [s.n], 2013  
96 f. ; il.

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

1. Biotecnologia. 2. Biolixiviação. 3. Acidithiobacillus ferrooxidans. I. Título.

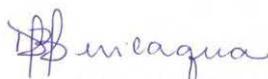
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara  
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ÍRIS GABRIELA GARCIA

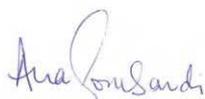
Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 05 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Denise Bevilaqua (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Ana Teresa Lombardi  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCAr, São Carlos



Profª Drª Mônica-Cristina Teixeira  
Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, Ouro Preto

## **DADOS CURRICULARES**

### **ÍRIS GABRIELA GARCIA**

#### **1 - Dados pessoais**

Nascimento: Íris Gabriela Garcia

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Birigui - SP

Filiação: Pedro Garcia Negrini e Inês de Fátima Pereira Garcia

Estado civil: Solteira

Profissão: Farmacêutica Bioquímica

Documento de identidade: 44.770.416-3

Cadastro de Pessoa Física: 383.530.638-32

Endereço: João Gurgel, 1131. Jardim do Carmo

CEP: 14800-180

Email: iris.gabriela@hotmail.com

#### **2 - Formação acadêmica/Titulação**

##### **2.1 Graduação**

Farmacêutica Bioquímica pela Universidade Paulista - UNIP, Araçatuba-SP, concluído em 07 de Dezembro de 2010.

#### **3 - Produção bibliográfica**

##### **3.1 Resumo apresentados em congresso**

GARCIA, I. G., MICHELIN, A. F. "Avaliação bacteriológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante". In: II Congresso Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012, UNESP - Araraquara, SP.

GARCIA, I. G.; BEVILAQUA, D. Enriquecimento de consórcios de bactérias oxidantes de ferro e enxofre a partir de diferentes amostras minerais para a biolixiviação da calcopirita. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos, SP.

### 3.2 Resumo publicados em congressos

GARCIA, I. G., MICHELIN, A. F. “Avaliação bacteriológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante”. In: II Congresso Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012, UNESP - Araraquara, SP.

GARCIA, I. G.; BEVILAQUA, D. Enriquecimento de consórcios de bactérias oxidantes de ferro e enxofre a partir de diferentes amostras minerais para a biolixiviação da calcopirita. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos, SP.

## 4 - Participação em eventos

Apresentação de Pôster/ Paineis “Índice de tuberculose na região de Araçatuba”. In: 69ª Semana da Saúde, 2008, UNIP - Araçatuba, SP.

Participação do I Workshop on Bioprocess for the Mining Industry and Environment

Atuação durante todo o ano de 2011 como colaboradora na organização do I Workshop on Bioprocess for the Mining Industry and Environment, realizado no período de 13 a 15 de novembro de 2011, no Instituto de Química, Campus de Araraquara.

Apresentação de Pôster/Painel no XII Encontro Científico da Vice Reitoria da Pós Graduação e Pesquisa da Universidade Paulista, 2009. “Avaliação bacteriológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante”.

Apresentação de Pôster/Painel na 69ª Semana da Saúde da Universidade Paulista, 2008. “Índice de tuberculose na região de Araçatuba”.

Apresentação de Pôster/Painel no II Congresso Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. “Avaliação bacteriológica e físico-química da água-de-coco verde vendida no comércio ambulante”.

## **5 - CURSOS/TREINAMENTOS**

Curso Intensivo sobre Geomicrobiologia, 2011. Araraquara, SP.

Curso intensivo sobre Técnicas Analíticas em Minerais, 2011, Araraquara, SP.

Curso sobre sistemas patentários, 2013, Araraquara, SP.

Treinamento Agilent Road Show, 2013, São Carlos, SP.

*Aos meus amados pais Inês e Pedro, que sempre foram motivo de incentivo, orgulho e motivação. À minha querida irmã Beatriz, que é essencial em minha vida e faz parte de todas minhas conquistas e ao Thiago, que é um companheiro impecável, gentil, prestativo, muito amigo, compreensivo, paciente e amável.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, que é fonte de força, sabedoria, expectativas e saúde.

À Prof Dra Denise Bevilaqua pela orientação, oportunidade, confiança, experiência e aprendizado.

À Prof Dra Laura Ottoboni pelo apoio, auxílio e parceria através do projeto CNPq/Vale.

Ao Prof Dr. Marcio Lambais pela gentileza em disponibilizar seu laboratório de Microbiologia do Solo da USP-ESALQ .

Aos companheiros do laboratório de Biohidrometalurgia, Ana Laura, Fabiana, Josiane, Maiara, Mariana A., Mariana B., Raul, Stella, Victor Souza e ao técnico Waldenir, que sempre proporcionaram momentos bons no dia a dia de trabalho, pela paciência, conversas, conselhos e risos durante esses anos.

À Renata de Bello Solcia que se tornou uma grande e queridíssima amiga. E seu apoio, ajuda, paciência, compreensão, amizade, simplicidade, tranquilidade e generosidade me proporcionou entusiasmo e força nesta conquista.

Ao meu querido e amado noivo Thiago Sequinel que teve uma participação especial nesta caminhada, sempre me ajudando, apoiando, confortando, ensinando, sendo um exemplo de profissional integro, sensato, de bom caráter, de boa índole e acima de tudo um companheiro dedicado.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, me ensinando a batalhar pelos meus objetivos, me incentivando a estudar, a ser uma pessoa melhor a cada dia, e a cada obstáculo enfrentado.

À minha querida irmã por me ajudar nas dificuldades, por ser uma grande amiga, me alegrando nos dias ruins, e me fazendo sorrir mais ainda nos dias bons.

Às minhas avós Aurora e Francisca e aos meus avôs Romão e Domingos.

À minha Tia Cecília pela amizade.

À Vanessa Sequinel, Leticia Caetano, Rodrigo Sequinel, Raphael Moura, Renata Zocal, Amanda Amoroso, Jeniffer Capel, Rosane Sanvidor, Sahra Lemos e Monalisa Maziero pela sincera amizade, bons momentos e conselhos.

A Sueli e José Carlos Sequinel pelo voto de confiança e apoio nesta caminhada.

Ao Adriano Lucheta, Alice Cassetari e Elisa Matos pela gentileza, hospitalidade, compreensão. A ajuda de vocês foi de fundamental importância e relevância em meu trabalho.

Ao Thiago Miranda e Viviane Drummond pela ajuda e disponibilidade no decorrer destes anos.

Ao Thiago Candido e Ângela Martins pela ajuda inicial, incentivo e preparação para enfrentar a etapa que estava por vir em minha vida.

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

À Cristina Giollo pela paciência e dedicação nas correções de minhas referências.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Na natureza, os sulfetos minerais constituem a principal fonte para extração industrial de metais, como o cobre, o chumbo, o zinco e o níquel. A calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) é um sulfeto de cobre importante, sendo o mineral de cobre mais abundante na natureza. Dentre os processos utilizados para a extração de metais está a biolixiviação, que consiste no processamento de minérios utilizando-se micro-organismos, e é reconhecida hoje como uma metodologia interessante sob os pontos de vista econômico e ambiental. Neste contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se obter consórcios oxidantes de ferro e de enxofre capazes de promover a solubilização da calcopirita. Para obtenção dos consórcios, quinze amostras minerais fornecidas pela Companhia Vale S.A. foram enriquecidas em meios de cultivo específicos. Foram obtidos 4 consórcios oxidantes de ferro e 4 oxidantes de enxofre, denominados Dep SOS-4, S3A, SO3, D1. A análise dessas amostras minerais por difração de raios X evidenciou a presença predominante de quartzo ( $\text{SiO}_2$ ) nas amostras Dep SOS-4 e S3A e nas amostras D1 e SO3 também foi observado covelita ( $\text{CuS}$ ), pirrotita ( $\text{FeS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e enxofre ( $\text{S}^0$ ). Os consórcios oxidantes de ferro foram adaptados ao crescimento em calcopirita e submetidos a ensaios de biolixiviação em calcopirita. Agrupamentos dos consórcios também foram realizados, porém sem adaptação prévia à calcopirita. Nos ensaios de biolixiviação, os valores de Eh se elevaram continuamente nos frascos inoculados, estabilizando ao redor de 550 mV, indicando o aumento da relação  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , o que afeta diretamente a solubilização dos metais pela ação oxidante do  $\text{Fe}^{3+}$ . Mesmo considerando que a calcopirita é um dos sulfetos mais refratários ao ataque oxidante, bacteriano ou químico, a extração de cobre nos ensaios inoculados com os consórcios oxidantes de ferro (individualmente e agrupados) determinou uma melhor dissolução da calcopirita em relação ao controle, ao consórcio oxidante de enxofre e a linhagem pura *At. thiooxidans* - FG01. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os consórcios e a linhagem *At. ferrooxidans* - LR. Nos ensaios respirométricos utilizando a calcopirita como substrato verificou-se que o consumo de oxigênio dos consórcios oxidantes de ferro - Dep SOS -4, S3A, SO3 e D1 comparados com o *At. ferrooxidans* - LR foi

menor. Em relação aos ensaios realizados na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  observou-se uma atividade de oxidação muito maior quando comparado à atividade de oxidação da calcopirita quando se utilizou a *At. ferrooxidans* - LR. Através da análise do gel de DGGE, verificou-se as bandas de rDNA dos consórcios oxidantes de ferro assemelham-se as bandas da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR, enquanto que as bandas do consórcio oxidante de enxofre demonstrou-se semelhante a da linhagem pura *At. thiooxidans* - FG01.

Palavras-chave: Calcopirita, biolixiviação, consórcios, *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

## ABSTRACT

In nature, sulphide minerals are the main sources for extraction of some metals for industrial uses, such as copper, lead, zinc and nickel. One of the most important and explored copper sulphide is chalcopyrite, being the most abundant copper mineral in nature. Metals can be extracted using microorganisms, leading the bioleaching to an economic and environmentally sustainable process. In this research, it was developed different iron and sulfur oxidizer consortium to promote chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ) solubilization. All consortium were obtained from previous enrichment in a specific culture of 15 ore samples provided by Companhia Vale S.A. Four iron oxidizer and four sulfur oxidizer consortium were prepared, and named Dep SOS-4, S3A, SO3 and D1. X ray diffraction of the Dep SOS-4 and S3A samples showed mainly quartz content ( $\text{SiO}_2$ ), whereas the SO3 and D1 samples showed covellite ( $\text{CuS}$ ), pyrrhothite ( $\text{FeS}$ ), chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ) and sulfur ( $\text{S}^0$ ) presence too. The iron oxidizer consortium were adapted to grow with chalcopyrite and then used in shake flasks experiments with chalcopyrite. A mix of consortiums was performed, but without a previous adaptation to the chalcopyrite. The Eh values increased during the bioleaching of the inoculated flasks, stabilizing around 550 mV, which affects metal solubilization due to an increase in the  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  ratio. The iron oxidizer consortium resulted in a better dissolution of the chalcopyrite when compare with the control, sulfur oxidizer consortium and pure strain *At. thiooxidans* - FG01. However, it was not observed any significant difference between the consortium and *At. ferrooxidans* - LR in the chalcopyrite dissolution. In the respirometric tests with chalcopyrite as substrate were observed lower consumption of oxygen to the iron oxidizer consortium (Dep SOS -4, S3A, SO3 and D1) in relation to *At. ferrooxidans* - LR. Higher oxidation activity was observed for both consortium and pure strain when the substrate was changed to  $\text{Fe}^{+2}$ . Verifying the rDNA bands using DGGE gel analysis, it was observed that all bands from iron oxidizer consortium were similar to the pure strain *At. ferrooxidans* - LR bands and, sulfur oxidizer consortium bands were similar to the pure strain *At. thiooxidans* - FG01.

Keywords: chalcopyrite, bioleaching, consortiums, *At. ferrooxidans*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura cristalina da calcopirita. Os símbolos azuis representam o cobre, os amarelos o enxofre e os vermelhos o ferro. 24
- Figura 2** - Difratoograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e Q- quartzo ( $\text{SiO}_2$ ). Os números acima da identificação dos picos indica a distância "d" (em Angstroms) característica de cada fase cristalina. 41
- Figura 3** - Esquema do enriquecimento dos micro-organismos ferro-oxidantes através de repiques sucessivos. 43
- Figura 4** - Esquema do enriquecimento dos micro-organismos enxofre-oxidantes através de repiques sucessivos. 45
- Figura 5** - Esquema básico do aparelho de Warburg. 53
- Figura 6** - Estrutura da ortofenantrolina. 55
- Figura 7** - Variação do pH em função do tempo nos ensaios de biolixiviação da *At. ferrooxidans* LR, e dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 em calcopirita (2,5% m/v). Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. As setas indicam o dia da correção da acidez. 60
- Figura 8** - Variação do pH em função do tempo nos ensaios de biolixiviação da *At. ferrooxidans* - LR, da *At. thiooxidans* - FG01 e do agrupamento dos consórcios nativos em calcopirita (2,5% m/v). Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep-SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre ( $\text{C.O.S}^0$ ): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. As setas indicam o dia da correção da acidez. 61

**Figura 9** - Variação do potencial de oxido-redução nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. OS símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 62

**Figura 10** - Variação do potencial de óxido-redução nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 63

**Figura 11** - Variação da concentração de Fe<sup>2+</sup>. **A)** Nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. **B)** Nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 64

**Figura 12** - Variação da concentração de Fe<sub>Total</sub>. **A)** Nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. **B)** Nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio

controle. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 65

**Figura 13** - Variação da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos e *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 66

**Figura 14** - Variação da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* -LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 67

**Figura 15** - Determinação da reta da velocidade de oxidação de cobre pela função logarítmica nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos oxidantes de ferro e da linhagem pura *At. ferrooxidans*. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 69

**Figura 16** - Determinação da reta da velocidade de oxidação de cobre pela função logarítmica nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* -LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 70

**Figura 17** - Difratoograma de raios X da amostra residual dos ensaios em frascos agitados. Os símbolos indicam C - calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e Q - quartzo ( $\text{SiO}_2$ ). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina. 75

**Figura 18** - Atividade respiratória do *At. ferrooxidans* - LR e dos consórcios nativos oxidantes de ferro crescidos em  $\text{Fe}^{2+}$  (150 $\mu\text{g}$  de proteína total) utilizando 0,1g de calcopirita como substrato oxidável. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 78

**Figura 19** - Atividade respiratória do *At. ferrooxidans* - LR e dos consórcios nativos oxidantes de ferro crescidos em  $\text{Fe}^{2+}$  (150 $\mu\text{g}$  de proteína total) utilizando 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  120  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. 79

**Figura 20** - Separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) dos consórcios nativos oxidantes de ferro S3A, Dep SOS-4, D1, SO3 (representados pelos número 1, 2, 3, 4), do consórcio nativo oxidante de enxofre C.O.S<sup>0</sup>- Dep SOS-4 (número 5), e das linhagens puras *At. ferrooxidans* - LR (número 6) e *At. thiooxidans* - FG01 (número 7). 82

**Figura 21** - Agrupamento hierárquico com base em matriz binária, pelo método de concordância simples (“simple matching”), com base no algoritmo Ward e distância Euclidiana. 83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Produção de concentrado de cobre no Brasil em 2010.	27
<b>Tabela 2</b> - Produção, importação e exportação de cobre (metal contido) no mercado interno brasileiro de 2007 a 2010.	28
<b>Tabela 3</b> - Características metabólicas dos Microrganismos Termofílicos.	33
<b>Tabela 4</b> - Origem e identificação das amostras de minério sulfetado de cobre fornecidas pela Vale, sendo proveniente da província mineral de Carajás (Mina do Sossego).	40
<b>Tabela 5</b> - Fases do procedimento experimental de adaptação do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> -LR e dos consórcios (Dep SOS-4, SO3, D1, S3A) ao crescimento em calcopirita.	47
<b>Tabela 6</b> - Condições experimentais testadas nos ensaios em frascos agitados	49
<b>Tabela 7</b> - Velocidade inicial - $V_0$ ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) dos ensaios respirométricos dos consórcios nativos oxidantes de ferro Dep SOS-4, S3A, SO3, D1, da linhagem pura <i>At. ferrooxidans</i> - LR e do frasco controle na presença de $100\mu\text{L}$ de $\text{Fe}^{2+}$ $120 \text{ mmol L}^{-1}$ e na presença $0,1\text{g}$ de calcopirita como substrato oxidável.	80

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>2.1 Breve história da hidrometalurgia</b>	21
<b>2.2 Biolixiviação</b>	22
<b>2.3 Sulfeto mineral - calcopirita</b>	23
<b>2.4 O cobre</b>	26
<b>2.5 Mecanismos envolvidos na oxidação dos sulfetos metálicos</b>	28
<b>2.6 Micro-organismos</b>	29
<b>2.7 fatores que afetam a biolixiviação de minerais</b>	34
2.7.1 Micro-organismos lixiviantes	34
2.7.2 Tamanho da partícula	34
2.7.3 Nutrientes	35
2.7.4 Oxigênio	35
2.7.5 pH, Eh e temperatura	35
<b>2.8 Consórcio microbiano</b>	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
<b>4.1 Micro-organismos</b>	39
<b>4.2 Amostra mineral</b>	41
<b>4.3 Obtenção dos consórcios</b>	42
4.3.1 Enriquecimento para obtenção dos micro-organismos ferro-oxidantes	42
4.3.2 Enriquecimento para obtenção dos micro-organismos enxofre-oxidantes	44

<b>4.4 Adaptações dos consórcios oxidantes de ferro</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Ensaio em frascos agitados</b>	<b>48</b>
<b>4.6 Estudos de respirometria celular</b>	<b>49</b>
4.6.1 Preparo das suspensões celulares	49
4.6.2 Dosagem de proteínas totais	50
4.6.3 Respirometria	52
<b>5. METODOLOGIA ANALÍTICA</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Medidas de pH e potencial de óxido-redução (Eh)</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Determinação de Fe<sup>2+</sup></b>	<b>55</b>
<b>5.3 Determinação de Fe<sub>Total</sub> e Cu<sub>Total</sub></b>	<b>56</b>
<b>6. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) - RESÍDUOS SÓLIDOS</b>	<b>56</b>
<b>7. ANÁLISE QUALITATIVA DA BIODIVERSIDADE DOS CONSÓRCIOS</b>	<b>56</b>
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>8.1 Obtenção dos consórcios</b>	<b>58</b>
<b>8.2 Ensaio de biolixiviação</b>	<b>59</b>
<b>8.3 Análise dos produtos da fase sólida</b>	<b>74</b>
<b>8.4 Ensaio respirométrico</b>	<b>76</b>
8.4.1 Consórcios oxidantes de ferro e <i>At. ferrooxidans</i> - LR	76
<b>8.5 Análise qualitativa da biodiversidade dos consórcios</b>	<b>81</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>86</b>
<b>10. CONCLUSÕES</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A exploração de metais no mundo ocorre há muito tempo. Com isso, a indústria mineradora está atualmente deparando-se com sérios problemas, como o esgotamento das reservas minerais, a diminuição do teor de metais para a extração, além dos problemas ambientais relacionados à extração.

Os processos de extração de metais podem ser pirometalúrgicos ou hidrometalúrgicos. Os processos pirometalúrgicos são predominantes e consistem na utilização de altas temperaturas para a recuperação do metal de interesse, requer alto gasto energético, atingindo assim elevado custo, sendo apenas economicamente viável em jazidas nas quais o metal de interesse encontra-se em alto teor. Outro aspecto negativo é referente ao problema ambiental, pois a queima de minérios sulfetados provoca a liberação de  $\text{SO}_2$  para a atmosfera, um dos gases responsáveis pela chuva ácida. Estes fatores têm induzido um crescimento no estudo de processos alternativos que visem uma exploração de minérios com baixos teores do metal, cada vez mais disponíveis, e que não acarretam significativos danos ambientais.

Dentre esses processos alternativos, a hidrometalurgia é um processo que utiliza soluções com potencialidade de recuperar metais, geralmente constituídas por ácidos ou oxidantes fortes, apresentando certas vantagens em relação à pirometalurgia, sobretudo quanto ao custo energético. Desta forma, inserida nos processos hidrometalúrgicos, a biolixiviação é uma alternativa adequada e promissora para a recuperação de metais a partir de sulfetos minerais de baixos teores. A biolixiviação é o processo pelo qual bactérias, de forma direta ou indireta, promovem a solubilização de determinados componentes presentes em uma amostra mineral. Desde que esse processo passou a ter importância comercial, vários trabalhos experimentais foram desenvolvidos para melhor entendê-lo (BALLESTER, 2005).

A biolixiviação, enfoque deste trabalho, requer pequeno gasto com insumos comparativamente aos utilizados em um processo hidrometalúrgico convencional (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos a partir de substratos presentes no referido minério. Outras

vantagens da biolixiviação são o reduzido gasto energético, se comparado a um processo pirometalúrgico, o baixo investimento de capital e baixo custo operacional devido à simplicidade das instalações requeridas na biohidrometalurgia, a reduzida mão de obra especializada na operação em relação aos demais processos de beneficiamento de metais, a ausência de poluição atmosférica, pois não ocorre emissão de SO<sub>2</sub> como nos processos pirometalúrgicos e o aproveitamento de rejeitos de minérios com teores reduzidos de metais. A utilização de micro-organismos para promover a solubilização de minérios apresenta-se como uma alternativa promissora. Assim, a lixiviação bacteriana pode ainda ser uma alternativa para jazidas de pequeno porte, e/ou longe de centros com infra-estrutura (GARCIA & URENHA, 2001).

A biolixiviação está sendo utilizada para a recuperação de metais, tais como, urânio, zinco, níquel, cobalto e vários outros, mas especialmente para a extração do cobre (GÓMEZ & CANTERO, 2005). O sulfeto de cobre mais estudado atualmente é a calcopirita e, apesar de vários estudos publicados terem demonstrado que a lixiviação bacteriana de sulfetos metálicos seja viável, a biolixiviação de calcopirita não é um processo aplicado comercialmente isso decorre do fato de que o mais abundante mineral de cobre na natureza, a calcopirita e, portanto, o de maior interesse comercial, possui uma cinética de oxidação lenta, e uma baixa extração de cobre (CÓRDOBA et al., 2008).

A biolixiviação de sulfetos metálicos ocorre a partir da oxidação destes sulfetos a íons metálicos e a sulfatos por meio da ação de bactérias ou arqueias aeróbicas, acidofílicas, oxidantes de Fe<sup>2+</sup> e/ou compostos reduzidos de enxofre. Este processo envolve reações químicas e biológicas (SCHIPPERS, 2006). Os principais micro-organismos envolvidos são do gênero *Acidithiobacillus*, sobretudo o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma espécie que obtém energia para seu crescimento através da oxidação do íon Fe<sup>2+</sup>, além das formas reduzidas de enxofre e sulfetos metálicos insolúveis (BEVILAQUA, 2003).

É interessante ressaltar que os micro-organismos podem atuar de forma satisfatória individualmente ou em conjunto sob a forma de consórcios. Quando esses micro-organismos trabalham juntos, na maioria das vezes

melhoram o rendimento dos processos de recuperação de metais. As bactérias presentes em consórcios tornam-se mais resistentes e possibilitam melhores porcentagens de extração de metais quando comparados com culturas puras. Tais características desenvolvem-se através da capacidade que os micro-organismos adquirem em adaptar-se às condições impostas pelo consórcio, que podem ser distintas de suas condições ótimas de crescimento (JOHNSON, 2008).

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar consórcios microbianos obtidos a partir de amostras retiradas do local de exploração de minérios de cobre considerando se as culturas obtidas diretamente no habitat natural destas bactérias são possíveis de serem utilizadas nos processos biohidrometalúrgicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Breve história da hidrometalurgia

As raízes da hidrometalurgia podem ser remontadas ao período dos alquimistas quando a transmutação de metais comuns em ouro era a ocupação principal. Algumas dessas operações envolviam os métodos hidrometalúrgicos. Por exemplo, quando um alquimista mergulhou um pedaço de ferro em vitríolo azul, ou seja, sulfato de cobre, o ferro foi imediatamente recoberto por uma camada de cobre metálico. Essa transmutação aparente de ferro em cobre é representada pela Equação [1] (HABASHI, 2005).



Como a transmutação de ferro ou de cobre em ouro poderia ser efetuada era a grande questão que ficou sem resposta na época. Visto que o ouro, o mais nobre metal, era insolúvel nos ácidos e bases conhecidos até o momento. A descoberta da água régia (mistura de HCl e HNO<sub>3</sub> que dissolve o ouro) por Jabir Ibn Hayyan em 1890, alquimista árabe, pode ser considerado como um marco do início da hidrometalurgia.

O surgimento da hidrometalurgia moderna iniciou-se em 1887, quando dois importantes processos foram criados. O primeiro, o processo de cianetação para o tratamento de minérios de ouro, e o segundo, o processo Bayer para a produção de alumina.

No início do século 20, numerosos processos de recuperação e lixiviação de metais foram propostos, sendo que a hidrometalurgia do cobre recebeu uma atenção especial. Minérios de óxidos foram lixiviados em larga escala por ácido sulfúrico diluído no Chile. Sulfetos de cobre também foram solubilizados devido à presença do íon férrico que atuava como agente oxidante. Em meados de 1950, os processos hidrometalúrgicos foram introduzidos para a lixiviação de concentrado de sulfetos, para lateritas

(óxidos de ferro e alumínio), para minério de tungstênio, assim como para a precipitação direta de metais a partir de uma solução.

A história inicial da biolixiviação relaciona-se as minas de carvão betuminoso que operavam na Pennsylvania (EUA), que descartavam seus efluentes no rio Ohio. Estes efluentes apresentavam uma elevada acidez que aumentava progressivamente no decorrer do tempo. Desta forma em 1940 a poluição do rio Ohio atingiu níveis tão alarmantes que foi necessário recorrer às autoridades e instituições de pesquisas para verificar a origem de tal acidez e encontrar medidas para sua eliminação (ROSSI, 1990).

Os resultados desta investigação revelaram que o ácido sulfúrico gerado era proveniente da oxidação de sulfetos de ferro associados ao carvão mineral e que a quantidade de ácido gerado era muito maior do que o esperado em condições normais (ROSSI, 1990).

Este aumento nas taxas de oxidação estava relacionado a algum catalisador ativo tanto nas minas como nos efluentes. Este catalisador foi relacionado com a flora microbiana que estava presente na mina e nas águas ácidas de drenagem. Os micro-organismos obtidos a partir deste estudo na década de 50 foram classificados como *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans* (ROSSI, 1990). Kelly & Wood (2000) reclassificou estas linhagens como *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*.

## 2.2 Biolixiviação

Existem dois processos (leito estático e tanques agitados) comumente empregados para a recuperação de metais a partir de minérios de baixos teores ou rejeitos de processos minerais ou ainda para recuperar metais de baixo valor econômico. O processo de biolixiviação em leito estático pode ser realizado nos sistemas “dump leaching” ou “heap leaching” (RAWLING; JOHNSON, 2007). Em ambos os processos, o material de interesse é empilhado e percolado por uma solução de ácido sulfúrico diluído, gerando assim uma lixívia ácida a partir da qual o metal pode ser recuperado por precipitação. A operação “dump leaching” é pouco rentável em relação à extração de metal. Na operação “heap leaching” o material é previamente

moído e empilhado em base impermeabilizada. A pilha é aerada, irrigada e ao final do processo o metal pode ser recuperado através de processos convencionais com melhor rendimento.

As operações em tanques agitados são utilizadas na produção de ouro, que possui um alto valor agregado, principalmente por se tratar de um método que exige maiores investimentos. Este método é mais dispendioso devido aos custos envolvidos no controle da aeração, no fornecimento de nutrientes, na manutenção da temperatura, do pH e do fornecimento dos gases necessários ao processo (RAWLINGS & JOHNSON, 2007).

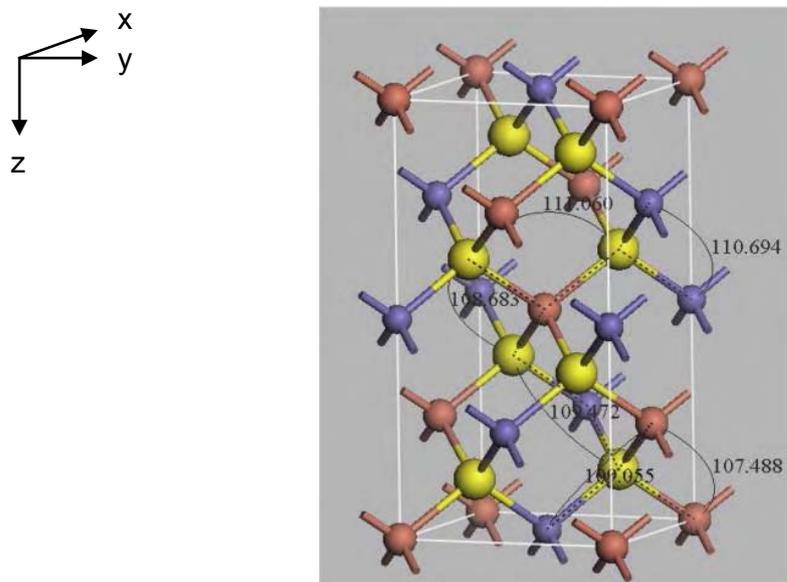
Em escala laboratorial, a biolixiviação também pode ser estudada através da utilização de reatores biológicos agitados ou colunas. A biolixiviação em frascos agitados (configurações laboratoriais dinâmicas) utiliza menor quantidade de minério, favorece uma avaliação mais rápida da capacidade oxidativa da bactéria e em caso de resultados promissores fornece parâmetros para o aumento de escala (GARCIA JÚNIOR; URENHA, 2001). Com relação às configurações laboratoriais estáticas, destacam-se os ensaios de lixiviação por percolação em colunas que são empregados quando se obtêm resultados promissores nos testes de biolixiviação em frascos.

As configurações dinâmicas envolvendo biorreatores se destacam pela utilização pela maior quantidade na proporção minério/solução lixiviante e pelo controle dos parâmetros do processo em tempo real. Este controle dos parâmetros em tempo real possibilita a obtenção de uma porcentagem economicamente viável de extração do metal (ACEVEDO, 2000).

### **2.3 Sulfeto mineral - calcopirita**

A calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) é o mineral de cobre mais amplamente distribuído e uma das principais fontes de obtenção desse metal. Este sulfeto mineral é considerado o mais estável devido às suas configurações estruturais (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura cristalina da calcopirita. Os símbolos azuis representam o cobre, as amarelas o enxofre e as vermelhas o ferro.

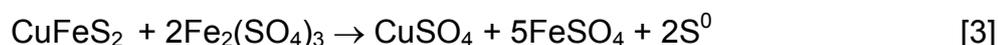


**Fonte:** KAWASHIMA et al., 2013 modificado de JONES, 2006.

A célula unitária da calcopirita é composta por quatro átomos de cobre, quatro átomos de ferro e oito átomos de enxofre, sendo que a estrutura do cristal consiste relativamente em um arranjo tetragonal simples e cada átomo de enxofre está coordenado com dois átomos de cobre e dois de ferro, de forma que os íons cobre ocupem posições alternadas ao longo do eixo z, com predominância de ligações covalentes. O estado de oxidação mais comum da calcopirita é  $\text{Cu}^+\text{Fe}^{3+}(\text{S}^{2-})_2$  (LLANOS et al., 1995, KAWASHIMA et al., 2013), com a possibilidade de variar seu estado de oxidação para  $\text{Cu}^{2+}\text{Fe}^{2+}(\text{S}^{2-})_2$  (MIKHLIN et al., 2005, KAWASHIMA et al., 2013).

Ao contrário de outros minerais, a calcopirita é conhecida por ser particularmente recalcitrante a processos hidrometalúrgicos (THIRD, 2000). A dissolução da calcopirita ocorre em uma primeira etapa, por ataque bacteriano (Equação [2]). Um ataque químico também ocorre, e o sulfato férrico que se formou inicialmente (Equação [2]), oxida diretamente a calcopirita, solubilizando mais cobre e produzindo  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{S}^0$  (Equação [3]), os

quais são oxidados pela bactéria produzindo  $\text{Fe}^{3+}$  e ácido sulfúrico (Equações [4] e [5], respectivamente) (BEVILAQUA & GARCIA, 2005).



A calcopirita apresenta uma cinética de oxidação lenta por ser muito refratária. Esse fato pode estar associado à alta energia de formação da rede cristalina do sulfeto (~ 17000 KJ/mol), bem como à formação de um filme, que limita a reação de dissolução com o meio lixiviante (HACKL et al., 1995; VILCÁEZ et al., 2008).

Esta camada limitante e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada ainda não foi totalmente esclarecida (STOTT et al., 2000; KLAUBER, 2003; KLAUBER, 2008). Entretanto, alguns autores afirmam que a formação do filme pode ser atribuída principalmente à formação de polissulfetos, de enxofre elementar e precipitados de ferro (jarositas).

Alguns pesquisadores consideram que a dissolução da calcopirita não é completamente bloqueada, mas sim dificultada por alguns produtos de seus produtos de oxidação, portanto o filme formado na superfície da calcopirita não poderia ser denominado de “filme passivante” (KLAUBER, 2008). Além disso, até o momento não foram utilizadas técnicas específicas e conclusivas para identificação dos polissulfetos, causando controvérsias sobre a presença prejudicial deste composto na dissolução da calcopirita. Assim, surge outra proposta referente ao bloqueio da oxidação da calcopirita, que leva em conta a presença de uma camada de enxofre e pelas jarositas (GÓMES et al., 1996; BEVILAQUA, 1999; KAWASHIMA et al., 2013;).

Portanto, é necessária a realização de estudos que envolvam desde os mecanismos até a cinética de lixiviação dos sulfetos para atingir melhores resultados na recuperação do cobre a partir da calcopirita.

## 2.4 O cobre

Inicialmente o cobre foi utilizado para a manufatura de ferramentas, armas e objetos de decoração. Essa versatilidade é atribuída a propriedades importantes desse metal, tais como maleabilidade, resistência à corrosão e alta condutividade térmica e elétrica uma descoberta fundamental na história da evolução humana (ALVARADO et al., 1999).

Na natureza, o cobre se encontra combinado, formando dois grupos: os minerais oxidados e os sulfetados. De forma geral, os minerais oxidados de cobre são facilmente solúveis, enquanto os sulfetados são insolúveis e necessitam de uma oxidação prévia dos sulfetos para que seja extraído o cobre (ACEVEDO & GENTINA, 2005).

A tecnologia convencional de extração de cobre compreende a moagem fina, concentração por flotação e extração de metal por pirometalurgia, e posteriormente, a oxidação dos sulfetos a  $\text{SO}_2$ , e a redução dos íons cuproso e cúprico a cobre elementar em fornos com elevadas temperaturas (ACEVEDO & GENTINA, 2005).

Segundo Ribeiro (2011), atualmente as maiores reservas de cobre encontram-se no Chile, China, Estados Unidos e Peru; tais reservas de cobre lavráveis em 2010 contêm 630 milhões de toneladas desse metal. No caso da produção de cobre, o Chile é o maior produtor com mais de 34% das 16,1 milhões de toneladas.

Em 2009 (ano base) as reservas somaram 9,8 milhões de toneladas de cobre contido no Brasil. O Pará é o maior detentor das reservas medidas de cobre no país. Entretanto, a produção brasileira de concentrado de cobre alcançou, em 2010, um total de 213.600 t (745.830 t de concentrado, com teor médio de 28,6%), repartidos nas empresas como mostra a Tabela 1, a seguir.

**Tabela 1** - Produção de concentrado de cobre no Brasil em 2010.

<b>Empresas</b>	<b>Participação (%)</b>
Vale	54,7
Mineração Caraíba	10,9
Mineração Maracá	31,7
Votorantim	1,8
Prometalica Mineração	0,9

**Fonte:** RIBEIRO, 2011.

Na Tabela 2 é mostrada a produção, importação e exportação de cobre no mercado interno brasileiro de 2007 a 2010. Observa-se que a tendência da balança comercial do minério de cobre para os próximos anos é positiva devido à evolução da produção interna, ao aumento das exportações e à estabilidade nas importações.

No Brasil as perspectivas de ampliação das aplicações da hidrometalurgia são bastante promissoras, diante dos grandes investimentos previstos para o país, em especial para o cobre e níquel. Os projetos da Companhia Vale, para o cobre, utilizando rotas bio e hidrometalúrgicas, pretendem transformar o Brasil em um dos grandes produtores mundiais do metal (CIMINELLI, 2007).

**Tabela 2** - Produção, importação e exportação de cobre (metal contido) no mercado interno brasileiro de 2007 a 2010.

	<b>Unidades</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010<sup>(*)</sup></b>
Produção	(t)	205.728	218.925	211.692	213.548
Importação	(t)	154.541	142.732	126.767	140.343
	10 <sup>3</sup> USD-FOB	1.077.660	829.801	675.685	951.629
Exportação	(t)	177.705	151.580	142.170	152.440
	10 <sup>3</sup> USD-FOB	1.032.312	1.196.341	803.013	1.237.741
Consumo Aparente <sup>(1)</sup>	(t)	182.564	209.447	196.289	201.451
Preços <sup>(2)</sup>	USD/t	3.180,0	2.192,0	3.222,0	2.198,0

**Obs:** (1) Produção + Importação - Exportação; (2) Vale; Mineração Maracá; Mineração Caraíba; (\*) preliminar.

**Fonte:** RIBEIRO, 2008; RIBEIRO, 2011 e RODRIGUES, 2009.

## 2.5 Mecanismos envolvidos na oxidação dos sulfetos metálicos

A bactéria pode interagir com sulfetos minerais através de mecanismos que ainda são controversos na literatura. São descritos três mecanismos que podem aumentar a taxa de lixiviação de metais a partir de sulfetos minerais: mecanismo direto, mecanismo indireto e mecanismo de contato indireto.

Em princípio, se entende como mecanismo direto aquele que está mediado pela ação bacteriana e as reações químicas são catalisadas enzimaticamente. Portanto, neste mecanismo se supõe que exista o contato físico dos micro-organismos com o mineral, ou seja, a bactéria ataca o sulfeto metálico de forma direta, mediante sua aderência à superfície mineral e posterior oxidação enzimática por transporte de elétrons desde a parte mais reduzida do mineral, (geralmente um sulfeto), até o oxigênio dissolvido (WATLING, 2006, SCHIPPERS & SAND, 1999).

Em comparação com o mecanismo direto, o indireto considera a ação dos íons férricos sobre o sulfeto mineral, dissolvendo-o. Nesta reação química

entre os íons férricos e o sulfeto, ocorre a produção de íons ferrosos e enxofre elementar. Essas espécies químicas são oxidadas biologicamente a  $\text{Fe}^{3+}$  e íon sulfato, respectivamente (BALLESTER, 2005, SCHIPPERS & SAND, 1999).

O mecanismo mais bem aceito atualmente é o mecanismo de contato indireto, através do qual a adesão bacteriana ocorre mediante a excreção de substâncias exopoliméricas (EPS) compostas basicamente por nitrogênio, fósforo e açúcares. A descoberta do EPS contribuiu para melhorar o conhecimento dos mecanismos da ação microbiana. No caso específico das bactérias ferro-oxidantes, o EPS contém íons férricos, fato que permite a interação entre as células bacterianas e a superfície do sulfeto mineral por ação de forças eletrostáticas (SAND et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003).

Outro mecanismo ainda importante na dissolução dos sulfetos metálicos é a formação de um par galvânico (NATARAJAN, 1990). Sabe-se que muitos sulfetos metálicos são condutores ou semicondutores. Portanto, em um sistema de biolixiviação, estes diferentes sulfetos comportam-se como eletrodos, possuindo um determinado potencial de óxido-redução. De tal modo, quando mais de um sulfeto mineral encontra-se em um mesmo sistema de biolixiviação, um deles se comporta como cátodo enquanto o outro se comportará como anodo. Desta forma ocorrerá a dissolução preferencial de um sulfeto em detrimento do outro.

## **2.6 Micro-organismos**

Sabe-se que os micro-organismos são responsáveis pela reciclagem dos elementos na biosfera, resultando em muitas transformações de compostos tanto orgânicos como inorgânicos. Devido à grande quantidade e ampla distribuição dos micro-organismos na natureza, seu papel nos ciclos dos elementos é de fundamental importância. Nestes ciclos, os elementos em maior ou menor quantidade constituem a matéria viva (C, H, O, N, S, P, Fe, etc) e formam compostos que vão sendo transformados continuamente por processos geológicos e biológicos (GÓMEZ & CANTERO, 2005).

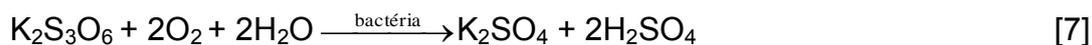
O ferro é o elemento mais abundante da terra e se encontra em dois estados de oxidação:  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . Devido ao alto potencial do par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  (0,76V), o único acceptor eletrônico capaz de oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  é o oxigênio. Assim, em pH neutro, o  $\text{Fe}^{2+}$  se oxida espontaneamente a  $\text{Fe}^{3+}$ , formando compostos insolúveis. Em pH ácido, o ferro pode permanecer na sua forma mais reduzida,  $\text{Fe}^{2+}$  e solúvel (GÓMEZ & CANTERO, 2005).

A maioria das reações de oxidação/redução que o ferro sofre ao longo de seu ciclo é catalisada biologicamente sob várias condições. Alguns micro-organismos possuem a capacidade de aproveitar o  $\text{Fe}^{2+}$  como fonte de energia disponível. Estes incluem representantes dos gêneros *Gallionella*, *Acidithiobacillus* e *Leptothrix*. Muitos destes micro-organismos estão adaptados a ambientes ácidos (onde o  $\text{Fe}^{2+}$  é mais solúvel) (GÓMEZ & CANTERO, 2005). Portanto, a utilização de micro-organismos para a extração de metais a partir de minérios e concentrados minerais possuem vantagens que se aplicam a relativamente poucos processos industriais em que os micro-organismos são utilizados como catalisadores. (RAWLINGS, 2007).

Têm sido estudados nos últimos anos os micro-organismos acidofílicos oxidantes de ferro e enxofre, envolvidos na oxidação de sulfetos minerais (NORRIS, 2007). Dentre o grupo mesofílico, destacam-se as proteobactérias, especialmente as espécies *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*, que são as mais ativas na oxidação de sulfetos minerais em temperaturas abaixo de 45°C. Espécies do gênero *Acidithiobacillus* são obrigatoriamente acidófilicas (pH<4), gram-negativas, com hastes móveis, e fixam o  $\text{CO}_2$  por meio do ciclo de Benson-Calvin (SCHIPPERS, 2006).

Existem vários subgrupos dentro do gênero *Acidithiobacillus*, por exemplo, a *At. ferrooxidans*, espécie mais conhecida (KARAVAIKO et al. 2003). Outras espécies de *Acidithiobacillus* oxidam compostos reduzidos de enxofre, tais como o enxofre elementar, tiosulfato e tetrionato, mas não ferro, dentre eles *At. thiooxidans* e *At. caldus*. Cepas de *At. thiooxidans* que têm sido isoladas a partir de diferentes ambientes ácidos, tais como o solo, depósitos de enxofre e resíduos de minas (SCHIPPERS, 2006). Entretanto estudos realizados por Bacelar-Nicolau e Johnson (1999) evidenciaram que esse micro-organismo não oxida a pirita ( $\text{FeS}_2$ ) (BEVILAQUA et al., 2002).

O *At. ferrooxidans*, o mais estudado dos micro-organismos acidofílicos, é quimiolitotrófico obrigatório, uma vez que utiliza substratos inorgânicos como fonte de energia, tais como,  $\text{Fe}^{2+}$  (Equação [4]), e vários compostos reduzidos de enxofre, por exemplo, enxofre elementar (Equação [5]), tiosulfato (Equação [6]), tritionato (Equação [7]), tetrionato (Equação [8]) e sulfetos minerais (Equação [2]) (SCHIPPERS, 2006). Consegue viver em condições ambientais extremas, como elevada acidez e altas concentrações de metais potencialmente tóxicos. Esse micro-organismo é resistente às concentrações ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) de: 370 Al, 150 Zn, 170 Co, 180 Mn, 160 Cu, 100 Cr, 1,5 As, 10 Cd, 0,1 Hg, 170 Ni e 8 U (LEDUC & FERRONI, 1994).



Além das bactérias mesofílicas do gênero *Acidithiobacillus*, merecem destaque aquelas do gênero *Leptospirillum*. A característica importante dessas bactérias é o fato de utilizarem somente íons ferrosos como fonte energética para o metabolismo. Dentre as bactérias desse gênero, pode ser citada a *Leptospirillum ferrooxidans*.

É interessante ressaltar que existem outros micro-organismos acidofílicos, além da *At. thiooxidans*, que não oxidam sulfetos metálicos. São bactérias heterotróficas e pertencem ao gênero *Acidiphilum*, *Acidocella*, *Acidomonas*, *Acidisphaera* e *Acidobacterium* (SCHIPPERS, 2006). Esses micro-organismos são gram-negativos, podem ter hastes móveis ou não, e sua morfologia apresenta-se na forma de bastonetes. Oxidam vários compostos orgânicos, mas não íons ferrosos. Algumas podem oxidar compostos de enxofre, tais como, *Acidiphilum acidophilum*, *Acidiphilium*

*cryptum*, *Acidiphilium rubrum* e *Acidiphilium sp.* cepa SJH. Entretanto esses micro-organismos não oxidantes de ferro podem viver intimamente associados aos autotróficos oxidantes de sulfetos metálicos, tal como o *At. ferrooxidans*, e são frequentemente encontrados em operações de biolixiviação ou em ambientes de mina. Juntamente com os autotróficos, proporcionam uma colaboração, uma vez que podem consumir os compostos orgânicos inibitórios gerados pelos autotróficos (SCHIPPERS, 2006).

Existem também os micro-organismos termofílicos, conforme descrito na Tabela 3, que são classificados como termofílicos moderados, termofílicos extremos, e hipertermofílicos (HAN, 1998). As espécies hipertermofílicas são capazes de viver a 90°C, com temperatura ótima de crescimento de 80°C ou acima. Os termofílicos extremos vivem entre 70°C e 90°C e os micro-organismos termofílicos moderados vivem na faixa de 50°C a 70°C (KELLY et al., 1993).

**Tabela 3** - Características metabólicas dos micro-organismos termofílicos.

Micro-organismo	pH <sub>ótimo</sub>	Temp <sub>ótima</sub> / °C	Crescimento	Fonte energética	Fonte de carbono
<i>Acidianus brierleyi</i> DSM 1651	1,5-2,0	70	Anaeróbio/ Autotrófico  Aeróbio/ Heterotrófico	Respiração anaeróbica: S <sup>0</sup> , H <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> S Respiração aeróbica: sulfetos metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> , orgânicos → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> e/ ou compostos orgânicos
<i>Acidianus infernus</i> DSM 3191	2,0	90	Aeróbia facultativa Autotrófica	Respiração anaeróbica: S <sup>0</sup> , H <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> S Respiração aeróbica: sulfetos metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> , orgânicos → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	CO <sub>2</sub>
<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348	1,7	75	Aeróbia Autotrófica	Respiração aeróbica: sulfetos metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> , orgânicos → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	CO <sub>2</sub>
<i>Sulfolobulus metallicus</i> DSM 6482	-	65	Aeróbia Autotrófica	Respiração aeróbica: sulfetos metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>
<i>Sulfolobulus acidocaldarius</i> DSM 639	2	83	Aeróbia Autotrófica facultativa	Respiração aeróbica: sulfetos metálicos, S <sup>0</sup> , Fe <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> , orgânicos → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	CO <sub>2</sub>
<i>Sulfolobulus shibatae</i> DSM 5389	3	81	Aeróbia Autotrófica facultativa	Respiração aeróbica: S <sup>0</sup> , extrato de levedura → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>

Fonte: HAN, C. J., 1998.

## **2.7 Fatores que afetam a biolixiviação de minerais (ACEVEDO & GENTINA, 2005).**

Dados os mecanismos de solubilização dos sulfetos metálicos aceitos atualmente, se pode inferir, que no caso da extração do cobre, os micro-organismos aderidos à superfície do mineral aceleram a extração do metal. A maior ou menor atividade dos micro-organismos no processo dependerá em grande parte das condições ambientais em que se encontra a pilha, onde a biolixiviação será realizada.

### 2.7.1 Micro-organismos lixiviantes

Como discutido anteriormente a biolixiviação é influenciada pela natureza da flora microbiana presente na mina e são vários os micro-organismos envolvidos nesse processo. A ação dos mesmos depende das características do meio lixiviante, pH, temperatura, concentração de íons metálicos e tipo de fonte energética presente. O item 2.6 destacou com detalhes os micro-organismos envolvidos neste processo.

### 2.7.2 Tamanho de partícula

O tamanho da partícula é um parâmetro crítico na biolixiviação, tanto por sua influência na velocidade do processo, como pelos custos associados a moagem do minério. O tamanho das partículas nos processos de biolixiviação é considerado importante porque, por exemplo, em pilhas de biolixiviação, o tamanho da partícula deve ser grande o suficiente para permitir a fácil circulação do ar e do líquido lixiviante. Operações em grande escala (pilha) utilizam tamanhos de partículas na faixa de 13 a 200 mm. Sistemas agitados requerem um tamanho de partícula normalmente inferior a 100  $\mu\text{m}$ , para facilitar a suspensão e a homogeneização do conteúdo.

A velocidade de extração do metal também está relacionada ao tamanho da partícula. Os sulfetos estão distribuídos em toda a massa da

partícula, e quanto maior a massa, maior é o conteúdo de sulfetos em seu interior.

### 2.7.3 Nutrientes

A maioria dos micro-organismos que participam da lixiviação são quimioautotróficos, sendo assim, utilizam  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono, e obtém energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{S}^{2-}$ ). Os meios de cultivos devem conter os outros elementos básicos (sais) para a nutrição destes micro-organismos.

Se o nutriente está presente em baixa concentração, o crescimento celular ocorrerá em velocidade reduzida. Esta situação é comum quando se utilizam minerais como fonte de energia.

### 2.7.4 Oxigênio

O oxigênio molecular atua como acceptor final de elétrons nas reações de metabolismo energético que ocorrem lixiviação bacteriana, durante a oxidação do íon ferroso, dos compostos reduzidos de enxofre e do enxofre elementar.

O oxigênio deve ser fornecido aos micro-organismos a uma velocidade ao menos igual a sua demanda. Se não for assim, as células podem crescer com limitação de oxigênio, e desta forma o crescimento será linear ao invés de exponencial, podendo comprometer o seu sistema de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa.

### 2.7.5 pH, Eh e temperatura

Os micro-organismos em geral apresentam um comportamento similar e independente da faixa de temperatura que crescem. Temperaturas elevadas podem ocasionar a diminuição da velocidade de transferência de oxigênio devido à diminuição da solubilidade dos gases com o aumento da temperatura.

Na biolixiviação, os micro-organismos participantes são acidofílicos, e possuem uma faixa ótima de pH entre 2,0 e 2,5. Se o pH for maior que 2,0 pode ocorrer a formação de precipitados de jarosita, dificultando a oxidação dos sulfetos minerais. A oxidação do  $\text{Fe}^{3+}$  e sulfetos reduzidos pode fazer com que ocorram variações no pH da solução, tanto por consumo de prótons como por geração dos mesmos.

A medida do potencial de óxido-redução do sistema está relacionada com a razão do par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  e o seu valor pode ser dado pela equação de Nernst [9]. Portanto, o Eh pode ser usado como uma medida indireta para monitorar o crescimento microbiano, uma vez que as bactérias acidofílicas são capazes de oxidar  $\text{Fe}^{+2}$  (Equação [4]), aumentando, desta maneira, o potencial do meio reacional (GARCIA JÚNIOR; URENHA, 2001).

$$E = E_{\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]} \quad [9]$$

Eh (potencial de óxido-redução do meio);

$E^0$  (potencial de óxido-redução padrão);

R (constante dos gases perfeitos);

T (temperatura);

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

F (constante de Faraday);

[ ] (concentração das espécies iônicas)

## 2.8 Consórcio microbiano

A seleção, o controle e o monitoramento das culturas microbianas na biomineração têm sido muitas vezes, mínimos ou inexistentes. Então, surge a

questão de se utilizar as populações microbianas agrupadas em operações comerciais, de forma a se obter os consórcios mais adequados e eficientes.

Desta forma, vários pesquisadores estudam a utilização de consórcios microbianos nos processos de biolixiviação. Por exemplo, os pesquisadores Fu et al., (2008) fizeram uma comparação entre cultura bacteriana pura, consórcio mesofílico e consórcio termofílico moderado, por meio do controle da porcentagem de recuperação de metais. Os consórcios compostos por micro-organismos de ferro e de enxofre oxidantes apresentaram vantagens em relação à linhagem pura sozinha. Entretanto o consórcio termofílico moderado (*L. ferriphilum* e *A. caldus*) foi mais eficiente do que o consórcio mesofílico e a cultura pura de *At. ferrooxidans*.

Estudos realizados em frascos agitados por Plumb, McSweeney e Franzmann (2008) demonstraram a capacidade de crescimento de consórcios bacterianos utilizando como fonte energética um minério de baixo teor. Embora tenham crescido em baixa velocidade, os micro-organismos estudados não perderam a capacidade de oxidar ferro, enxofre ou o próprio sulfeto mineral. A maior velocidade de oxidação foi alcançada pelo consórcio moderadamente termofílico, uma vez que a temperatura pode acelerar a dissolução do minério.

Ainda se tratando de consórcios, foi demonstrado que populações mistas de bactérias que oxidam ferro e enxofre (*At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*) estão presentes em sistemas de lixiviação natural, à temperatura ambiente, e são as principais responsáveis pela solubilização de sulfetos minerais (NORRIS, 1990).

O foco principal deste trabalho foi a obtenção de consórcios oxidantes de ferro e enxofre a partir de amostras minerais e compará-los a uma linhagem de nossa coleção. Foram feitas algumas tentativas de agrupamento entre os consórcios e a linhagem da coleção.

### 3. OBJETIVOS

- Obter consórcios de micro-organismos oxidantes de ferro e enxofre a partir de amostras de mina;
- Avaliar os consórcios oxidantes de ferro através de ensaios de respirometria celular;
- Analisar e comparar os consórcios obtidos com a linhagem pura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* - LR quanto à capacidade de biolixiviar um concentrado de flotação de calcopirita;
- Caracterizar os consórcios quanto à composição da microbiota natural.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as linhagens bacterianas *Acidithiobacillus ferrooxidans* - LR e *Acidithiobacillus thiooxidans* - FG01, ambas isoladas de licor de lixiviação estática de minério de urânio proveniente da mina de Lagoa Real - Bahia (GARCIA JÚNIOR 1991) e os consórcios nativos mesofílicos que foram obtidos a partir de 15 amostras de minério sulfetado de cobre fornecidas pela Vale, sendo proveniente da província mineral de Carajás (Mina do Sossego), sudeste do Pará. A origem e identificação das mesmas seguem abaixo na Tabela 4.

**Tabela 4** - Origem e identificação das amostras de minério sulfetado de cobre fornecidas pela Vale, sendo proveniente da província mineral de Carajás (Mina do Sossego).

<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>
<b>SO1</b>	Minério de transição (misto) - minério complexo contendo fases minerais oxidadas e sulfetadas
<b>SO2</b>	Amostras sulfetadas com rocha encaixante de origem mafíca, contendo calcopirita e sulfetos secundários alterados (oxidados)
<b>SO3</b>	Amostra sulfetada com rocha encaixante de origem mafíca, contendo calcopirita alterada superficialmente (oxidada)
<b>SO4</b>	Gossam - Afloramento do depósito contendo rochas, fases minerais sulfetadas completamente oxidadas devido ao intemperismo
<b>SO8</b>	Amostra de minério sulfetado contendo calcopirita parcialmente oxidada. Amostra coletada na cava do Sossego
<b>SO9</b>	Amostra de minério sulfetado contendo calcopirita parcialmente oxidada. Amostra coletada na cava do Sequeirinho
<b>S1A</b>	Drenagem de depósito oxidado verde
<b>S2A</b>	Drenagem a jusante da cava do Sossego
<b>S3</b>	Entrada da cava do Sossego
<b>S3A</b>	Drenagem de depósito misto. Grande quantidade de matéria orgânica
<b>D1</b>	Drenagem natural do depósito - Camada superficial de matéria orgânica
<b>D2</b>	Talude E da mina do Sequeirinho próximo à superfície saprolito roxo
<b>D3</b>	Sequeirinho - Talude próximo a falha de contato com minério
<b>Dep SOS-4</b>	Jusante depósito da mina do Sossego, próximo ao dique taboa
<b>Dep SOS-5</b>	Oxidado verde antigo, no pé do depósito

**Fonte:** Companhia Vale S.A.

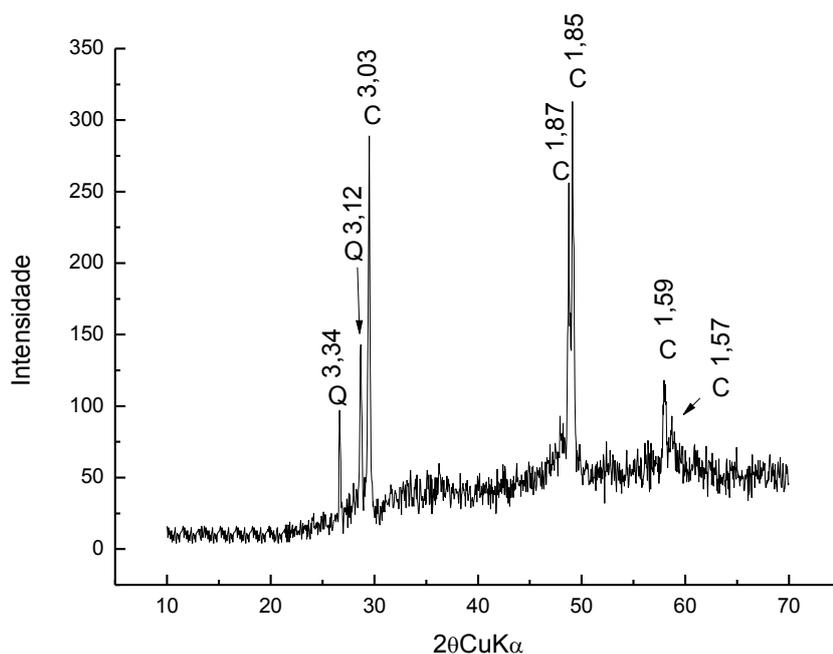
Apenas as amostras das quais foram obtidos os consórcios nativos oxidantes de ferro e enxofre (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1) foram caracterizadas por Difração de Raios X (difratômetro de raios-X D5000 - Siemens® equipado com monocromador no feixe difratado), de forma a identificar a composição mineralógica das mesmas, evidenciando a presença predominante de quartzo (SiO<sub>2</sub>) nas amostras Dep SOS-4 e S3A e nas amostras D1 e SO3 também foi observado covelita (CuS), pirrotita (FeS), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) e enxofre (S<sup>0</sup>) (Apêndice A).

## 4.2 Amostra mineral

O concentrado de calcopirita utilizado nos ensaios possui uma granulometria 100% inferior a 325 mesh e foi obtido por flotação e fornecido gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Sobral do Centro de Tecnologia Mineral do Rio de Janeiro (CETEM/RJ).

A análise de DRX da amostra fornecida pelo CETEM e utilizada nos ensaios revelou que é o único sulfeto mineral presente é a calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) além de menores quantidades de  $\alpha$ -Quartzo ( $\text{SiO}_2$ ) como representado na Figura 2.

**Figura 2** - Difratoograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e Q- quartzo ( $\text{SiO}_2$ ). Os números acima da identificação dos picos indica a distância "d" (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.



**Fonte:** Próprio autor.

A amostra foi submetida à digestão ácida (NUCLEBRÁS – modificado) para determinação de cobre e ferro total. Para isso, 2,0 g da amostra mineral foram secos em estufa a 60°C até atingir peso constante. Posteriormente,

adicionou-se 80 mL uma mistura de ácido clorídrico e ácido nítrico concentrados numa proporção de 3 partes de HCl e 1 de HNO<sub>3</sub> *overnight*.

A mistura foi então aquecida em chapa aquecedora (Nova Ética, modelo 114) com adições sucessivas de 10,0 mL de HCl até diminuição expressiva de volume, porém sem calcinar. Por fim, foi adicionada à mistura 30 mL de uma solução de HCl 50% e filtrou-se em membrana de acetato de celulose (0,45 µm de porosidade - Milipore).

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

A amostra apresentou a seguinte composição: 25,50% de cobre e 12% de ferro.

### 4.3 Obtenção dos consórcios

Todas as amostras minerais fornecidas pela Vale foram moídas e peneiradas para uma granulometria 100% <200 mesh. Estas amostras foram utilizadas para a obtenção de micro-organismos acidofílicos, tanto ferro-oxidantes como enxofre-oxidantes, de acordo com a metodologia a seguir. As culturas foram incubadas em agitador a 150 rpm e a 30°C.

#### 4.3.1 Enriquecimento para obtenção dos micro-organismos ferro-oxidantes

A Figura 3 ilustra os passos para a obtenção dos micro-organismos que oxidam ferro. O meio de cultivo T&K (TUOVINEN & KELLY, 1973) foi utilizado para este enriquecimento. A coloração inicial do meio é verde-clara (característico do íon Fe<sup>2+</sup>) e a oxidação completa dos íons ferrosos apresenta coloração vermelho-tijolo. As etapas A1, B1, C1 e D1 apresentaram oxidações parciais que podem ser associadas às colorações intermediárias.

A composição e o modo de preparo do meio de cultivo T&K utilizado para enriquecimento das bactérias oxidantes de ferro esta descrito a seguir:

Meio de cultivo T&K (TUOVINEN & KELLY, 1973).

Solução A:

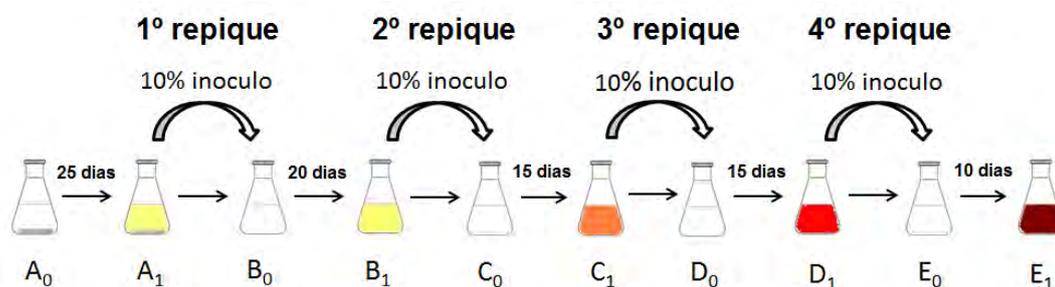
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ .....	0,5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,5g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	0,5g
Água destilada .....	800 mL
pH .....	1,8

Solução B:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	33,3g
Água destilada .....	200 mL
pH .....	1,8

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

**Figura 3** - Esquema do enriquecimento dos micro-organismos ferro-oxidantes através de repiques sucessivos.



**Fonte:** Próprio autor.

O passo A<sub>0</sub> da Figura 3 representa a adição de 5 g de cada amostra mineral moída, em frascos separados contendo 50 mL do meio de cultivo T&K

(TUOVINEN & KELLY, 1973). O pH e o potencial de óxido-redução (Eh) foram medidos semanalmente para se acompanhar o crescimento bacteriano. O pH foi ajustado a 1,8 através da adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1), de acordo com a necessidade de cada amostra durante o período de ensaio.

Após 25 dias do inóculo inicial os íons ferrosos foram oxidados parcialmente, o que pode ser observado pela alteração da coloração inicial do meio. Após este período foi realizado o primeiro repique, retirando-se 10% (v/v) de inóculo do frasco A<sub>1</sub> e transferindo-se para o frasco B<sub>0</sub> contendo meio de cultivo fresco (Figura 3).

Nova oxidação parcial dos íons ferrosos foi observada após 20 dias (frasco B<sub>1</sub>), e o segundo repique foi realizado (frasco C<sub>0</sub>). Após este passo, uma nova redução do tempo de oxidação dos íons ferrosos foi observada (frasco C<sub>1</sub>), juntamente com uma alteração na coloração do meio, e assim o terceiro repique foi realizado após 15 dias (frasco D<sub>0</sub>). Na sequência observou-se que o tempo de oxidação dos íons ferrosos manteve-se em 15 dias (D<sub>1</sub>) e ocorreu um aumento na intensidade da coloração do meio, sendo então realizado o quarto repique (E<sub>0</sub>). Neste último frasco E<sub>0</sub>, o tempo de oxidação dos íons ferrosos diminuiu para 10 dias e a coloração do meio apresentou-se vermelho-tijolo (frasco E<sub>1</sub>). O tempo para a realização destes 4 repiques descritos na Figura 3, totalizou aproximadamente 3 meses. Todas as etapas foram realizadas em duplicata.

#### 4.3.2 Enriquecimento para obtenção dos micro-organismos enxofre-oxidantes

A Figura 4 ilustra os passos para a obtenção dos micro-organismos que oxidam enxofre. O meio de cultivo 9K (SILVERMAN & LUNDGREN, 1959) foi utilizado para este enriquecimento e o enxofre elementar (representado pela cor amarela na figura) foi utilizado como fonte energética. A oxidação do enxofre produz ácido sulfúrico, por este motivo o pH foi o parâmetro monitorado semanalmente.

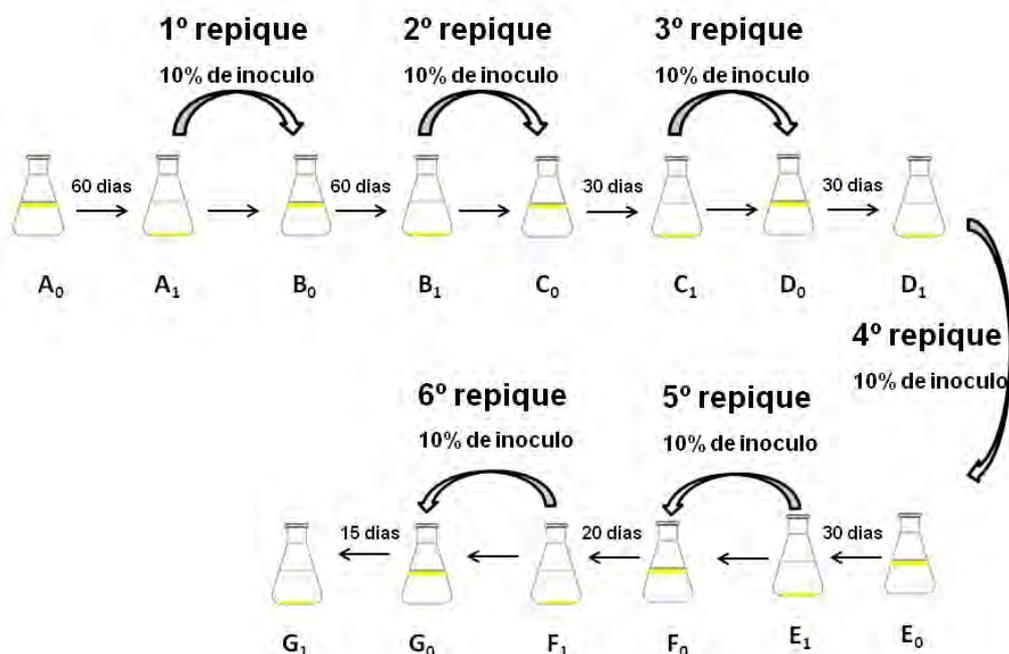
A composição e o modo de preparo do meio de cultivo 9K utilizado na para enriquecimento das bactérias oxidantes de enxofre esta descrito a seguir:

Meio de cultivo 9K (SILVERMAN & LUNDGREN, 1959).

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ .....	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,5 g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	3,0 g
KCl .....	0,1 g
$S^0$ .....	10 g
Água destilada .....	1000 mL
pH .....	2,8

A solução e o enxofre foram preparados separadamente, sendo a solução esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos, e o enxofre a 110°C por uma hora. No momento do uso a solução e o enxofre foram misturados.

**Figura 4** - Esquema do enriquecimento dos micro-organismos enxofre-oxidantes através de repiques sucessivos.



**Fonte:** Próprio autor.

No frasco A<sub>0</sub> (Figura 4) foi adicionado o meio de cultivo 9K (50 mL) contendo 5 g de cada amostra mineral moída e observou-se que após 60 dias

do inóculo inicial (frasco A<sub>1</sub>) o valor de pH manteve-se ao redor de 2,5, significando que o enxofre elementar apresentou oxidação parcial, uma vez que o pH inicial do meio é de 2,8.

Após este período foi realizado o primeiro repique, retirando-se 10% (v/v) de inóculo do frasco A<sub>1</sub> e transferindo-se para o frasco B<sub>0</sub> contendo meio de cultivo fresco (Figura 4). Decorridos mais 60 dias, observou-se que o valor de pH diminuiu para 2,3, o que representa uma continua oxidação parcial do enxofre elementar (frasco B<sub>1</sub>). O segundo repique foi realizado (frasco C<sub>0</sub>) e após mais 30 dias de enriquecimento observou-se uma diminuição no valor de pH para 2,1 (frasco C<sub>1</sub>), assim o terceiro repique foi realizado (frasco D<sub>0</sub>).

Partindo do frasco D<sub>0</sub>, após 30 dias o pH alcançou o valor de 2,0, mais uma vez evidenciando a oxidação parcial do enxofre (frasco D<sub>1</sub>).

O quarto repique sucessivo foi realizado (frasco E<sub>0</sub>), sendo necessário mais 30 dias para a obtenção de pH de 1,8 (frasco E<sub>1</sub>).

Para o quinto repique (frasco F<sub>0</sub>) em 20 dias o pH alcançou o valor de 1,5, evidenciando o progressivo aumento das micro-organismos oxidantes de enxofre.

Finalmente, no ultimo repique realizado (frasco G<sub>0</sub>), após 15 dias os valores de pH reduziram a valores próximos a 1,0, o que determinou o final da fase de enriquecimento, uma vez que este é o tempo médio de oxidação do enxofre para culturas puras.

O tempo total para a obtenção destes micro-organismos foi de aproximadamente de 8 meses e foram efetuados 6 repiques. Todas as etapas foram realizadas em duplicata.

#### **4.4 Adaptações dos consórcios oxidantes de ferro**

Uma vez obtida culturas capazes de oxidarem íons ferrosos, foi realizado um processo de adaptação dos consórcios à calcopirita, a fim de avaliá-los quanto à capacidade de oxidação deste sulfeto mineral, para os ensaios de biolixiviação em frascos agitados. Desta forma foi realizada a substituição progressiva da fonte energética (Fe<sup>2+</sup>) do meio T&K pelo sulfeto em estudo (calcopirita), conforme o procedimento esquematizado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Fases do procedimento experimental de adaptação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* -LR e dos consórcios (Dep SOS-4, SO3, D1, S3A) ao crescimento em calcopirita.

Fases	Concentração de Fe <sup>2+</sup> (mmol L <sup>-1</sup> )	Concentração do sulfeto (% m/v)
1	60	0,2
2	30	0,4
3	15	0,8

**Fonte:** BEVILAQUA, 1999.

A bactéria ferro-oxidante utiliza rapidamente (24-48 horas) o íon ferroso adicionado ao meio, e após seu consumo total, a única fonte energética disponível para o crescimento e reprodução bacteriana é o sulfeto. Assim o íon ferroso foi adicionado apenas como um indicador do processo metabólico da espécie.

Cada etapa da fase de adaptação dura no mínimo 15 dias. Ao final de cada fase foram realizados testes a fim de verificar a viabilidade bacteriana mesmo após o esgotamento do íon ferroso. Sendo assim uma alíquota do meio de adaptação foi inoculada (10% v/v) em meio T&K fresco contendo 120 mmol L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e a oxidação completa do Fe<sup>2+</sup> em apenas 48 horas é uma indicação positiva da viabilidade bacteriana. Somente após uma resposta positiva (mudança da coloração do meio) neste teste é que a fase posterior da adaptação foi iniciada. O pH foi acompanhado periodicamente durante todas as fases de adaptação. A cultura assim adaptada para crescer em calcopirita, foi utilizada como inóculo nos ensaios de biolixiviação que serão descritos a seguir.

Além dos consórcios nativos, a *At. ferrooxidans* - LR também foi adaptada à calcopirita, a fim de comparar o desempenho dos consórcios com esta cultura que já tem seu comportamento bem conhecido por estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa.

#### 4.5 Ensaios em frascos agitados

Os ensaios de biolixiviação em frascos foram realizados em mesa agitadora a 150 rpm e temperatura de 30°C. Como reatores foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo a solução A do meio T&K e 2,5% (m/v) de amostra mineral, calcopirita. O volume final no frasco foi de 150 mL e as condições experimentais testadas são descritas abaixo e resumidas da Tabela 6:

1. Meio inoculado (10% v/v) com *At. ferrooxidans* - LR previamente adaptada;
2. Meio inoculado (10% v/v) com os consórcios nativos separados, previamente adaptados:
  - 2a: Dep SOS-4
  - 2b: S3A
  - 2c: SO3
  - 2d: D1
3. Meio inoculado ( $2,26 \times 10^7$  células/mL) com os consórcios nativos ferro-oxidantes agrupados, sem adaptação prévia:
  - 3a: Agrupamento 1: S3A + Dep SOS-4;
  - 3b: Agrupamento 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR;
  - 3c: Agrupamento 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4);
- 4 Meio inoculado ( $2,26 \times 10^7$  células/mL) com consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4), sem adaptação prévia;
- 5 Meio inoculado com a *At. thiooxidans* - FG01 ( $2,26 \times 10^7$  células/mL), sem adaptação prévia;
- 6 Controle abiótico - meio não inoculado.

**Tabela 6** - Condições experimentais testadas nos ensaios em frascos agitados

AMOSTRA	CONSÓRCIO										
	1	2a	2b	2c	2d	3a	3b	3c	4	5	6
<i>At. ferrooxidans</i> - LR	X						X				
Dep SOS-4		X				X	X	X			
S3A			X			X	X	X			
SO3				X							
D1					X			X			
C.O.S <sup>0</sup>									X		
<i>At. thiooxidans</i> - FG01										X	
Controle abiótico											X

**Fonte:** Próprio autor.

É válido salientar que os agrupamentos foram realizados de forma aleatória.

Os ensaios foram acompanhados por amostragens periódicas da polpa dos frascos. A separação das fases sólida e líquida foi realizada por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos, sob refrigeração a 4°C (Centrifuge 5702R - Eppendorf). Foram realizadas periodicamente medidas de pH, potencial de óxido-redução (Eh) e determinação de Fe<sup>2+</sup>. Uma alíquota das amostras foi armazenada em ácido nítrico 2% (1:1) para determinação de Cu<sub>total</sub> e Fe<sub>total</sub> por espectrometria de absorção atômica. Este ensaio foi realizado em duplicata.

Antes de cada amostragem, a evaporação de água de cada frasco foi estimada pela perda de massa e compensada pela adição de água destilada estéril.

No final do experimento os resíduos sólidos, foram submetidos à análise de difração de raios-x (DRX).

## 4.6 Estudos de respirometria celular

### 4.6.1 Preparo das suspensões celulares

Para a realização dos ensaios de oxidação dos sulfetos metálicos e dos íons ferrosos foram preparadas suspensões celulares dos consórcios

bacterianos nativos ferro-oxidantes (Dep SOS-4, S3A, SO3 e D1) e da *At. ferrooxidans* - LR.

As suspensões celulares ferro-oxidantes foram obtidas de culturas crescidas em meio de cultura "T&K" por 48 horas. Este crescimento foi acompanhado pela oxidação do íon ferroso a íon férrico, caracterizado pela mudança da coloração do meio, do verde característico do íon  $Fe^{2+}$  ao vermelho característico do íon  $Fe^{3+}$ . Todas as culturas foram crescidas à temperatura de 30 °C em mesa agitadora com rotação de 150 rpm.

Após o crescimento centrifugou-se a solução (rotor JA-10, centrífuga Beckman Avanti J-25) à temperatura de 4 °C a 4.000 rpm por 1 hora. Após este procedimento o sobrenadante foi descartado e o "pellet" das células ferro-oxidantes foram lavadas com água acidificada pH 1,8 até a completa eliminação do precipitado característico, a jarosita que pode se formar no meio de cultivo inoculado com células ferro-oxidantes. Após este procedimento as células foram centrifugadas (Eppendorf - Centrifuge 5415-R) por 15 minutos, a 4.000 rpm, sob refrigeração de 4°C e em seguida foram ressuspensas em 5 mL de água acidificada com valor de pH correspondente aos respectivos meios de cultivo.

#### 4.6.2 Dosagem de proteínas totais (HARTREE, 1972).

Para a quantificação de proteína total da biomassa celular foram utilizados 1mL da suspensão de células, a qual foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 1mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e mantidas em ebulição por 30 minutos para a completa hidrólise das células. Para a dosagem de proteína total foram retiradas alíquotas dessa solução e a quantificação foi realizada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972).

Para esta determinação a suspensão de células hidrolisadas foi diluída apropriadamente (1:5, 1:10, 1:20) e cada diluição foi adicionada a tubos de ensaio individualmente aos quais foram adicionados 0,9 mL da solução A, incubando-se em banho-maria por 10 minutos à uma temperatura de 50 °C, e resfriando-se em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,1 mL da solução B mantendo durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por último

adicionou-se 3 mL da solução C, incubando-se os tubos por 10 minutos a 50 °C e resfriando à temperatura ambiente. Para a quantificação da proteína total, medidas da absorbância das soluções foram feitas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando-se a soroalbumina bovina para a obtenção da curva padrão.

As “proteínas totais” foram escolhidas como unidade biológica de rotina para expressar os resultados dos estudos de respirometria, pois o método utilizado é simples de ser realizado, preciso e muito sensível (15 -110 µg). Além disso, a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *At. ferrooxidans* - LR e dos consórcios como método de rotina é demorado (10 dias) e de custo muito elevado devido à utilização de agarose (GARCIA JÚNIOR et al., 1992).

As soluções utilizadas no método são descritas a seguir:

Solução de Proteína:

Soro albumina bovina.....0,025g  
 Água destilada.....q.s.p. 50mL

Solução A:

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....0,5g  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .....25g  
 NaOH 1M.....125mL  
 Água destilada.....q.s.p. 250mL

Solução B:

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....0,2g  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,1g  
 NaOH 1M.....1mL  
 Água destilada.....q.s.p. 10mL

Solução C:

Reagente de Folin - Ciocalteu.....	10mL
Água destilada.....	30mL

## 4.6.3 Respirometria

A técnica de respirometria celular permite uma avaliação rápida e bastante sensível (ordem de  $\mu\text{mol}$  de oxigênio consumido) sobre a capacidade dos micro-organismos em oxidar determinado substrato, no caso em estudo a calcopirita e o  $\text{Fe}^{2+}$ . Os ensaios respirométricos foram realizados em Aparelho de Warburg e as suspensões celulares utilizadas (desacopladas do crescimento) são descritas a seguir:

1. Consórcios ferro-oxidantes (Dep SOS-4, S3A, SO3 e D1),
2. *At. ferrooxidans* - LR

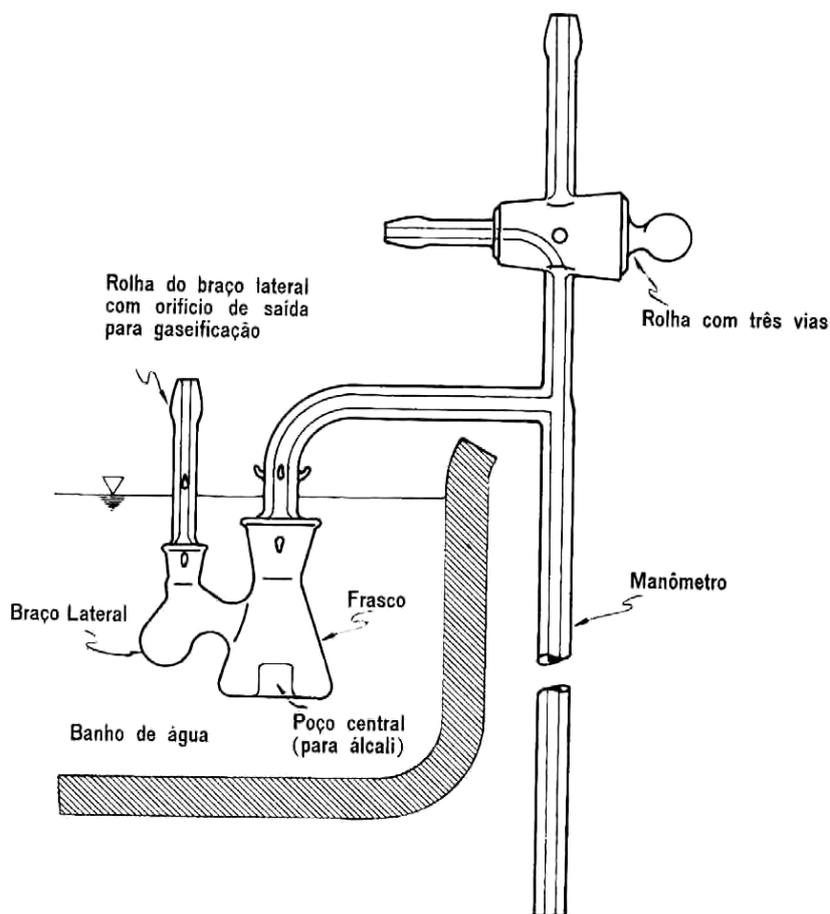
Para avaliar a oxidação da calcopirita, massa de células correspondentes a 150  $\mu\text{g}$  de proteína foi colocada na presença de 0,1g de calcopirita em tampão glicina para manter o pH do meio. Enquanto que para avaliar a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizado massa de células correspondentes a 150  $\mu\text{g}$  de proteína na presença de 120  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .

O respirômetro de Warburg ilustrado na Figura 5 (UMBREIT et al., 1972) consiste basicamente de um frasco de reação acoplado a um manômetro graduado; nesse mesmo frasco existe ainda um poço central no qual é colocado uma tira de papel de filtro embebido com 0,1 mL de solução de KOH 20% para retenção do  $\text{CO}_2$  atmosférico. Os manômetros graduados contêm um líquido de densidade conhecida, solução de Brodie.

Composição da solução de Brodie:

NaCl.....	23g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Azul de Evans.....	0,1g
Água destilada.....	q.s.p 500 mL

**Figura 5-** Esquema básico do aparelho de Warburg.



**Fonte:** UMBREIT et al., 1972.

O manômetro (Figura 5) é constituído de dois ramos intercomunicantes em suas bases através de um tubo de borracha, obturado na extremidade inferior. Um dos ramos (esquerdo) permanece constantemente aberto durante o experimento enquanto o da direita termina no frasco de reação. Quando ocorre o consumo de oxigênio há uma diminuição da pressão e o menisco da solução de Brodie no ramo da direita se eleva. Essa diferença é indicada em milímetros na escala graduada e deve ser transformada em microlitros.

Frascos de reação contendo o mesmo volume, porém sem células, foram utilizados como controles para avaliar a oxidação química natural dos substratos. Junto com o experimento também foi colocado um conjunto chamado de termo barômetro, contendo o mesmo volume do sistema

experimental, o qual indica variações de pressão causadas por mudanças de temperatura do ambiente. Essa variação é registrada no mesmo instante da leitura dos manômetros dos ensaios e descontada das medidas destes, pois tal variação não é causada pelo sistema experimental. Todo o conjunto frasco-manômetro foi mantido em um banho de água à 30°C e mantidos sob agitação constante. As leituras da variação de pressão no manômetro, realizadas a cada 10 minutos, foram então convertidas em volume de oxigênio consumido pelos micro-organismos. Para tanto, multiplica-se a variação da altura em milímetros por uma constante (K), cujo cálculo é o que se segue:

$$K = \frac{(V_T - V_f) \frac{273}{T} + V_f \cdot a}{P_0}$$

onde:

$V_T$  - volume do conjunto frasco-manômetro.

$V_f$  - volume final do sistema experimental.

$T$  - 273 + t (temperatura de trabalho).

$a$  - coeficiente de solubilidade do oxigênio na água (0,02608).

$P_0$  - pressão do fluido manométrico (10,032 mm).

As leituras da variação de pressão no manômetro foram convertidas em volume de oxigênio consumido, como mostrado abaixo:

$$\text{Consumo de oxigênio } (\mu\text{L}) = L \cdot K$$

onde L representa a leitura do manômetro e K constante do sistema frasco-manômetro.

## 5. METODOLOGIA ANALÍTICA

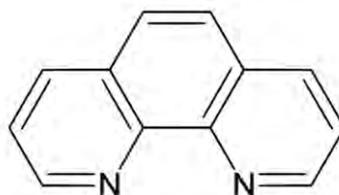
### 5.1 Medidas de pH e potencial de óxido-redução (Eh)

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

### 5.2 Determinação de $\text{Fe}^{2+}$

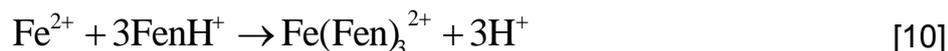
A concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  presente no meio de lixiviação foi determinada por método espectrofotométrico, utilizando-se para isto a 1,10 - fenantrolina ou ortofenantrolina (Figura 6) que forma, com o íon  $\text{Fe}^{2+}$ , íons complexos coloridos (VOGEL, 1981).

**Figura 6** - Estrutura da ortofenantrolina.



**Fonte:** VOGEL, 1981.

Para a quantificação da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  foram adicionados, em um balão volumétrico de 25 mL, uma quantidade adequada de amostra, que variou de 200  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$ , 5,0 mL de ortofenantrolina ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e 5,0 mL de tampão acetato de sódio ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ), para ajuste de pH na faixa de 2,0 a 5,0. Por causa do meio ácido, a ortofenantrolina assume a sua forma protonada, que é o íon 1,10-fenantrolínio ( $\text{FenH}^+$ ). A reação de complexação do  $\text{Fe}^{2+}$  com o  $\text{FenH}^+$  pode ser descrita pela equação [10].



O balão volumétrico foi avolumado com água destilada e a leitura da absorvância realizada a 510 nm (absorção máxima do complexo formado) em espectrofotômetro Femto 600S.

### 5.3 Determinação de Fe<sub>Total</sub> e Cu<sub>Total</sub>

A concentração de ferro e cobre totais nas amostras líquidas retiradas dos ensaios em frascos agitados foram adequadamente diluídas e analisadas por espectrometria de absorção atômica, utilizando um espectrômetro Agilent 240FS. A faixa de concentração do padrão de ferro utilizado foi de 0,375-15 ppm e para o cobre foi de 0,25-10 ppm, empregando-se um comprimento de onda de 324,7 nm para leituras do ferro e 248,3 nm para leituras do cobre.

## 6. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) - RESÍDUOS SÓLIDOS

Para a análise de raios X foi utilizado o difratômetro D5000- Siemens equipado com monocromador no feixe difratado. Para aumentar a resolução, alguns parâmetros foram considerados: corrente 30 mA e voltagem de 40 KV (valores operacionais do equipamento), linha de base inferior 0,520V, linha de base superior 1,620 V, tempo de contagem 2s, passo 0,05° (ângulo 2θ), fendas 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10 a 70° (2 θ).

O porta amostra utilizado foi um disco de teflon de 47 mm de diâmetro por 3 mm de espessura (essas medidas se ajustam ao aparelho utilizado) tendo no centro uma cavidade de 15 ou 20 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, destinada a conter a amostra para a análise.

## 7. ANÁLISE QUALITATIVA DA BIODIVERSIDADE DOS CONSÓRCIOS

A biomassa de cada um dos consórcios nativos oxidantes de ferro (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1), de um dos consórcios nativos oxidantes de enxofre -

Dep SOS-4, da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 foi submetida à análise empregando-se a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) para avaliar de forma qualitativa a biodiversidade entre os consórcios. Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de Microbiologia do Solo da USP-ESALQ.

A extração do DNA dos consórcios nativos oxidantes de ferro, do consórcio nativo oxidante de enxofre e das linhagens puras foi realizada utilizando o *Fast DNA Kit* (Qbiogene, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris, Ácido Acético, EDTA), depois de corado com *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). A concentração do DNA foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Q-bit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT™ dsDNA BR* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos)

A reação de amplificação de fragmentos do rRNA 16S foi realizada a partir do DNA extraído dos consórcios nativos oxidantes de ferro, do consórcio nativo oxidante de enxofre e das linhagens puras *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 (empregadas como controle positivo) utilizando-se o primer BC338fGC (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGGGGACTCCTACGGGAGGC3') e o UN518r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (ØVREÅS et al., 1997).

A amplificação ocorreu em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x Tampão *Taq* (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% de Tween 20), 0,75 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 µL de 5 U µL<sup>-1</sup> de *Taq* DNA Polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 µL de cada iniciador (25 pmoles µL<sup>-1</sup>) e 100 ng de DNA, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final por 10 min a 72 °C. A concentração dos amplicons também foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Q bit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT™ dsDNA BR* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). Quantidades iguais de

amplicons (500 ng) foram analisadas através de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante-DGGE (MYERS et al., 1987; MUYZER et al., 1993) 8% de acrilamida: bisacrilamida (m/v) contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (solução 100% contendo 10,5 g de uréia, 5 mL de solução acrilamida: bisacrilamida 40% e 10 mL de formamida). A eletroforese foi feita a 200 V e 60 °C, utilizando-se um sistema *DCode* (BioRad, Hercules, CA, USA), em tampão TAE 1x. Os géis foram tratados em soluções de Ácido Acético 10% (15 min), Metanol 50% (15 min) intercaladas por lavagem em água deionizada (3 a 5 minutos) e corados com *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) em sistema automatizado (*Automated Gel Stainer*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) As imagens dos géis foram adquiridas utilizando-se um densitômetro *StormTm* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Obtenção dos consórcios

Em meio de cultivo específico para bactérias oxidantes de ferro, o crescimento de uma linhagem pura ocorre em aproximadamente 48 horas e o potencial de óxido-redução (Eh) se eleva durante este período, chegando a valores próximos de 570 mV (versus Ag|AgCl).

O enriquecimento para obtenção dos consórcios nativos foi realizado em todas as amostras minerais fornecidas pela Vale. Após os repiques sucessivos, descritos anteriormente (item 4.3), em quatro amostras (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1) houve oxidação dos íons ferrosos, evidenciado pela elevação do potencial de óxido-redução, que aumentou progressivamente com o tempo de enriquecimento chegando a valores próximos a 550 mV (versus Ag|AgCl), demonstrando a ação bacteriana.

Em linhagens puras que utilizam o enxofre elementar como fonte de energia, a oxidação desta fonte energética ocorre em aproximadamente 15 dias e os valores de pH aproximam-se a 1,5 para bactérias mesofílicas oxidantes de enxofre e ferro, como por exemplo, *At. ferrooxidans*, e podem

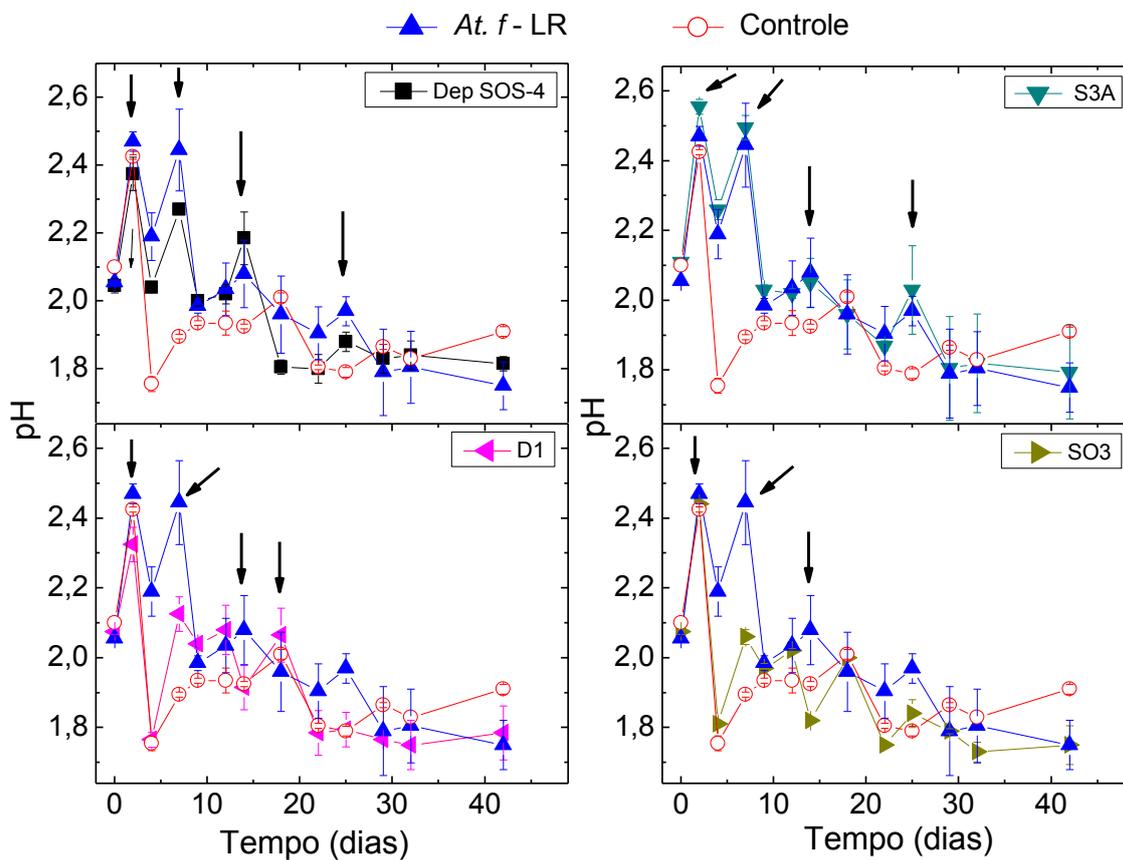
atingir valores próximos a 0,5 para bactérias oxidantes de enxofre, como por exemplo, *At. thiooxidans*.

Como já salientado, para os consórcios nativo acidofílicos oxidantes de enxofre, o crescimento foi acompanhado por medidas periódicas de pH, revelando a redução do potencial hidrogeniônico devido à geração de ácido sulfúrico. Após os repiques sucessivos, foram obtidos consórcios oxidantes de enxofre para as mesmas amostras minerais nas quais foram obtidos os consórcios oxidantes de ferro (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1).

## **8.2 Ensaio de biolixiviação**

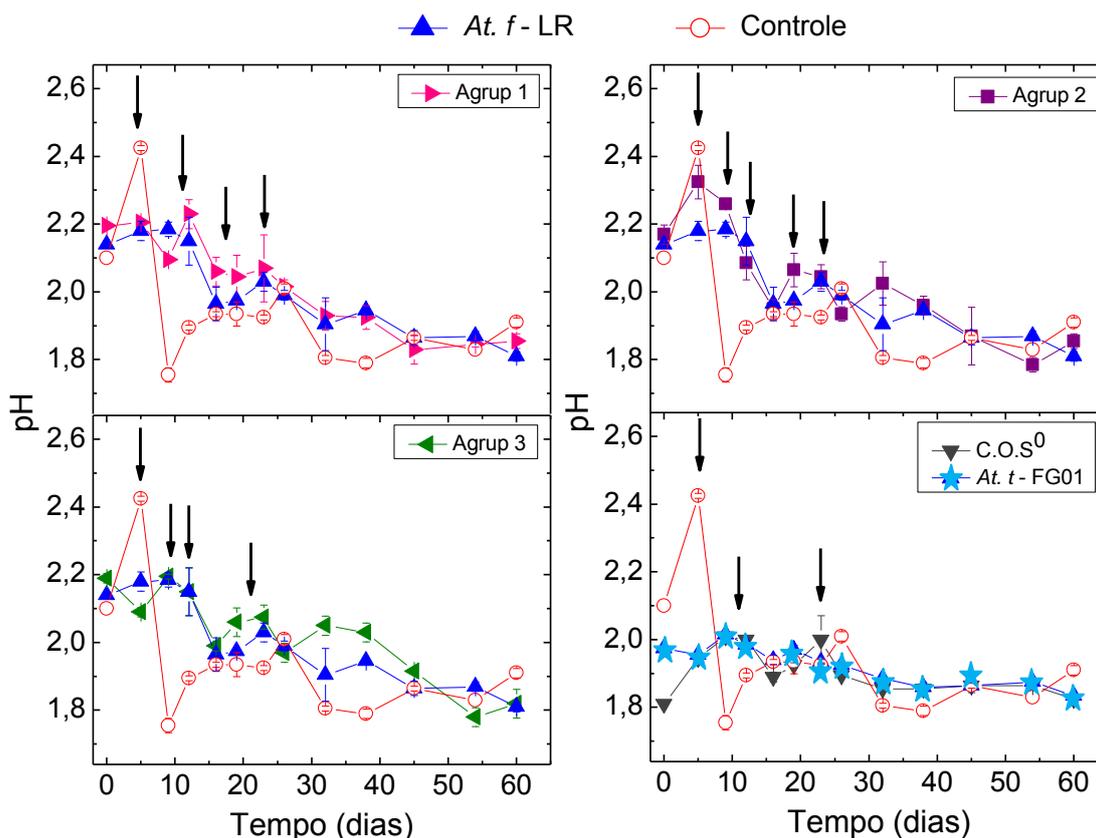
Nos ensaios em frascos agitados verificou-se a elevação do pH durante os 20 primeiros dias em todos os frascos, sendo preciso o ajuste do pH do meio para 2,0, no período inicial de incubação. Esta elevação dos valores de pH (Figura 7 e 8) pode ser atribuído ao consumo de ácido pelo próprio mineral e/ou à oxidação biológica da calcopirita que é uma reação que consome ácido, como pode ser observado nas Equações [2] e [3].

**Figura 7** - Variação do pH em função do tempo nos ensaios de biolixiviação da *At. ferrooxidans* LR, e dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 em calcopirita (2,5% m/v). Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. As setas indicam o dia da correção da acidez.



Fonte: Próprio autor.

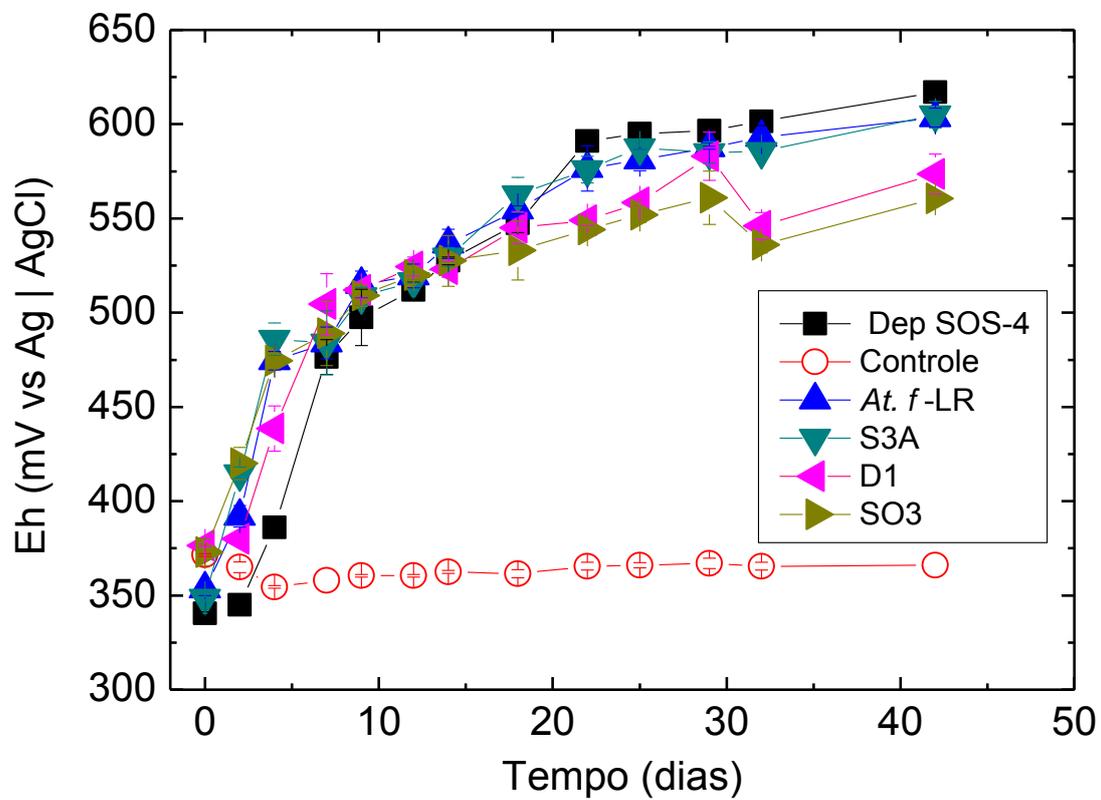
**Figura 8** - Variação do pH em função do tempo nos ensaios de biolixiviação da *At. ferrooxidans* - LR, da *At. thiooxidans* - FG01 e do agrupamento dos consórcios nativos em calcopirita (2,5% m/v). Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep-SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. As setas indicam o dia da correção da acidez.



**Fonte:** Próprio autor.

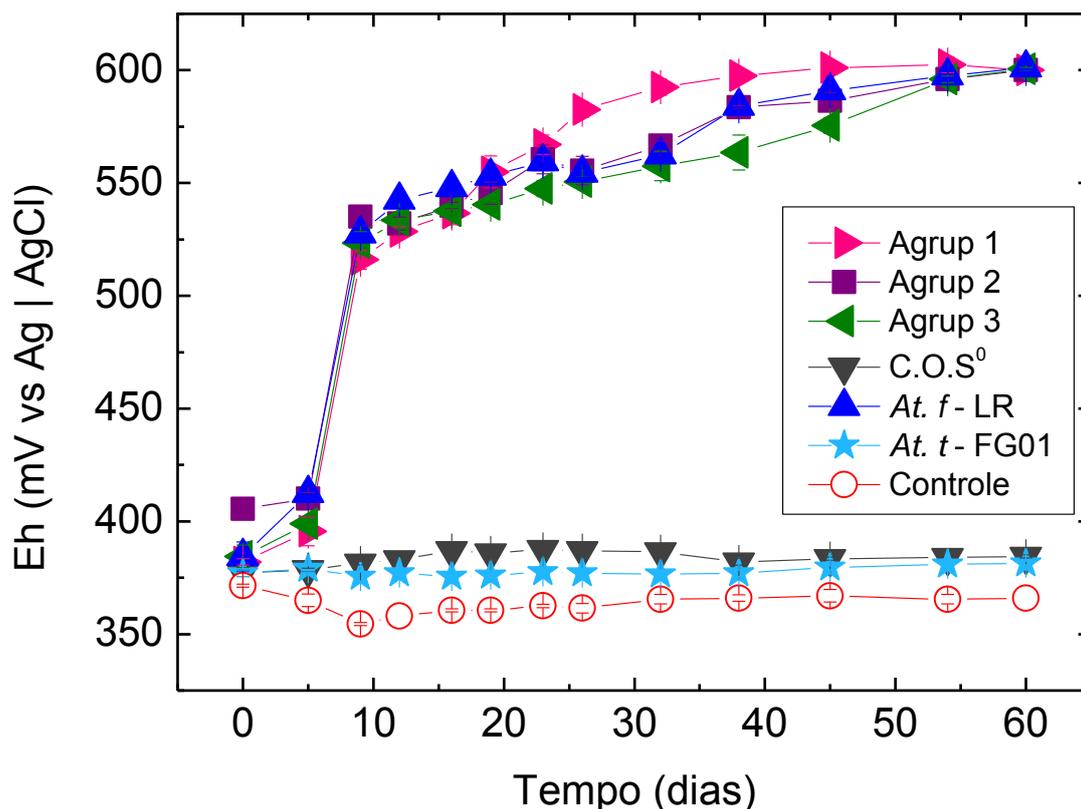
Como observado na Figura 9 e 10 os valores de Eh se elevaram continuamente com o tempo nos frascos inoculados em todas as condições testadas aproximando-se a valores entre 550 - 600 mV (versus Ag|AgCl). Como esperado, nos frascos inoculados com a linhagem pura *At. thiooxidans* - FG01 e com o C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4 (Figura 10) observou-se baixo potencial de óxido-redução, em torno de 380 mV (versus Ag|AgCl), uma vez que não houve mudança no par  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ . Para o frasco-controle o potencial de óxido-redução se manteve baixo em relação aos frascos inoculados, não ultrapassando 370 mV (versus Ag|AgCl).

**Figura 9** - Variação do potencial de óxido-redução nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. OS símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 10** - Variação do potencial de óxido-redução nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>); Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



**Fonte:** Próprio autor.

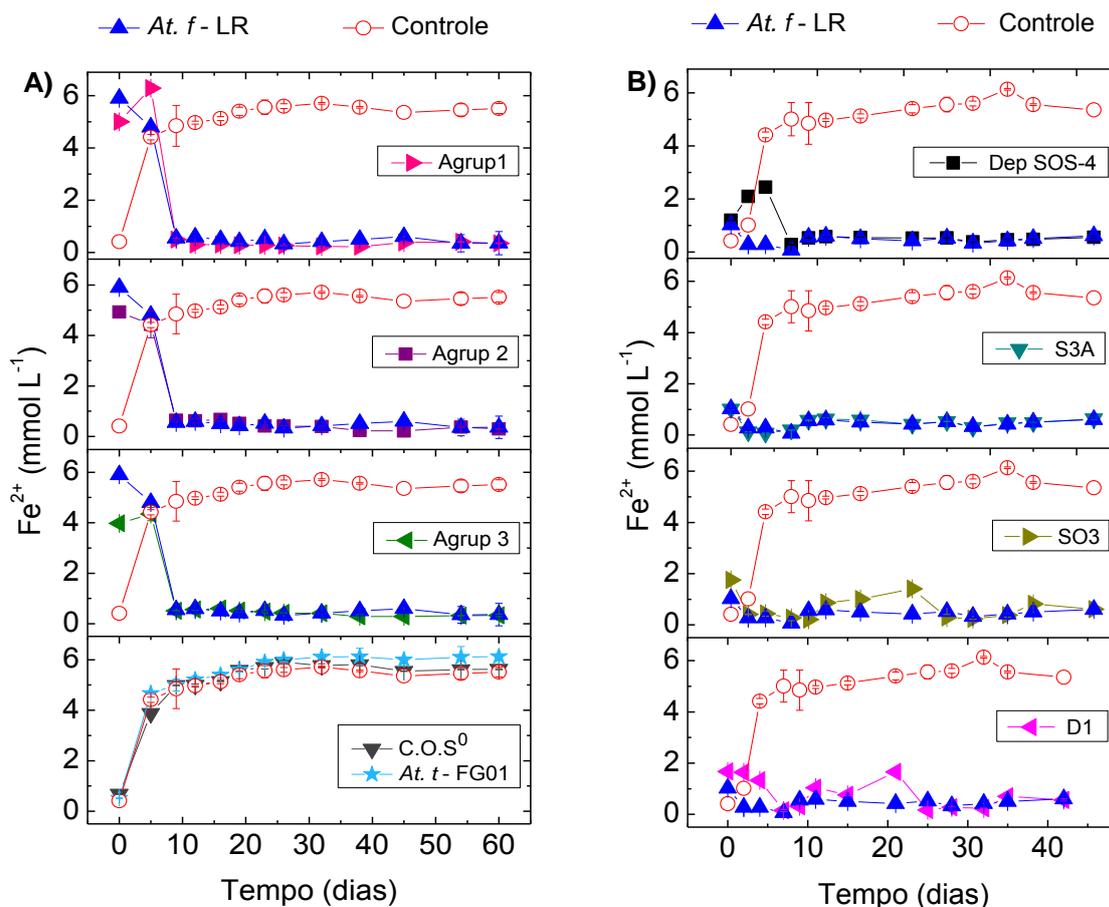
Nos ensaios inoculados com bactérias oxidantes de ferro a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  manteve-se muito baixa, especialmente após o décimo dia de ensaio, onde praticamente não foi mais detectado (Figura 11A e B).

A Figura 11A ilustra a baixa concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ , porém constante após 5 dias durante todo o ensaio (cerca de  $6 \text{ mmol L}^{-1}$ ) no frasco inoculado com a linhagem pura *At. thiooxidans* - FG01, no frasco com C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4. Esse comportamento era esperado e sugere que este consórcio não continha células da espécie *At. ferrooxidans*, que possui capacidade em oxidar  $\text{Fe}^{2+}$ .

No frasco controle o comportamento foi muito semelhante à condição descrita anteriormente para a linhagem pura de *At. thiooxidans* e o consorcio nativo oxidante de enxofre.

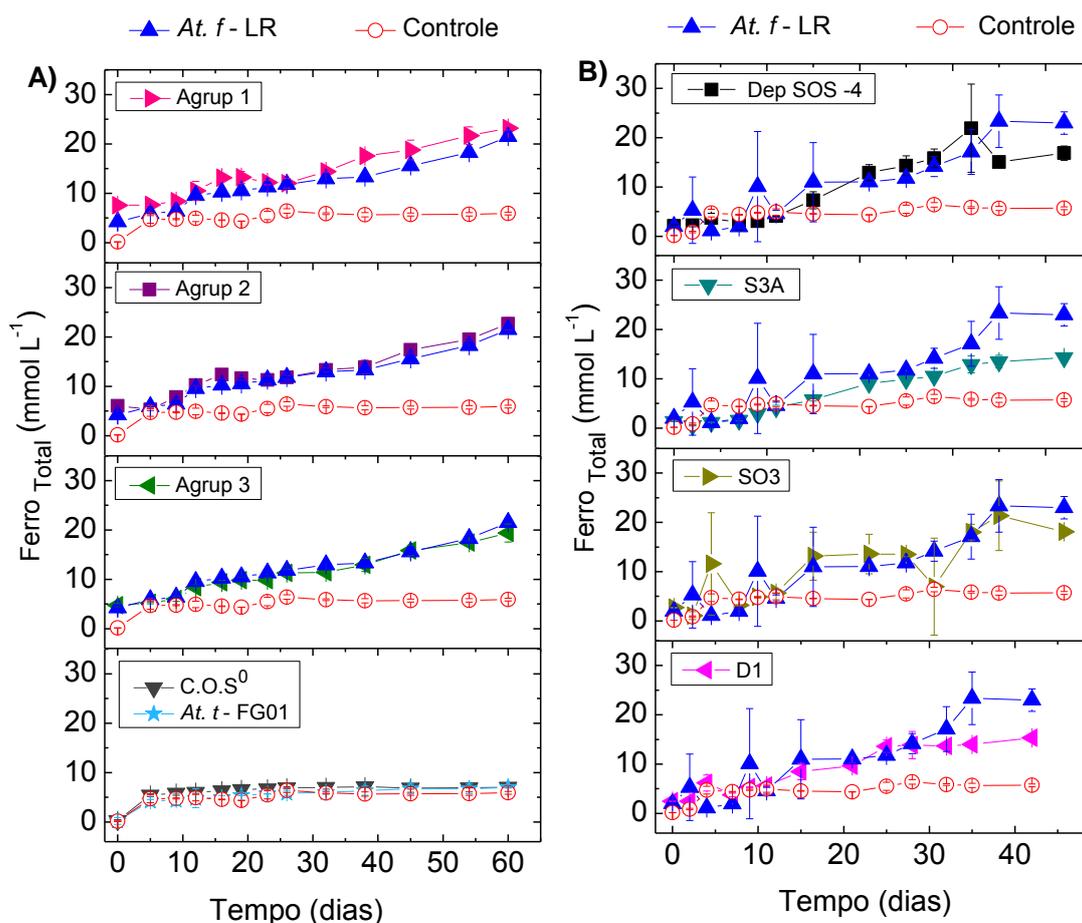
Estes resultados (Figuras 9-12) evidenciam a atividade microbiana nos ensaios inoculados, uma vez que a reação de óxido-redução implica na liberação de um elétron, que é utilizado pelos micro-organismos como suporte para seu crescimento.

**Figura 11** - Variação da concentração de  $Fe^{2+}$ . **A)** Nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. **B)** Nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 12** - Variação da concentração de  $Fe_{Total}$ . **A)** Nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* - LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio nativo oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. **B)** Nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos Dep-SOS 4, S3A, SO3, D1 e do *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



**Fonte:** Próprio autor.

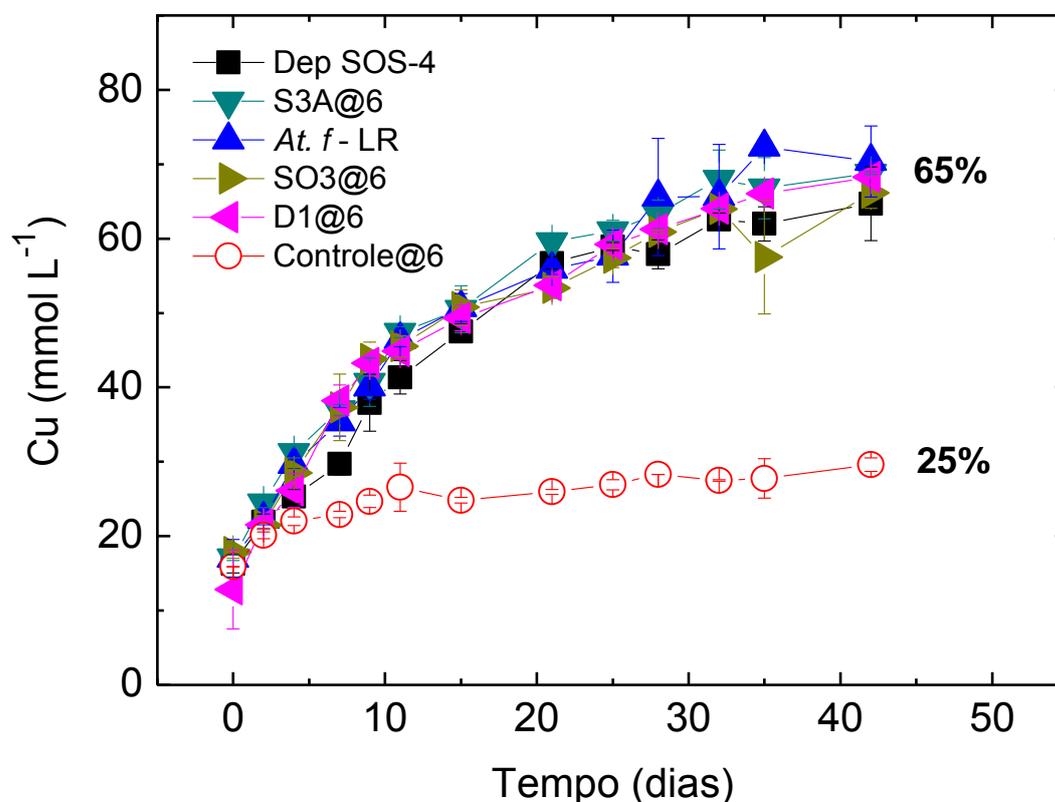
A Figura 12 ilustra que a concentração do ferro total ( $Fe^{2+} + Fe^{3+}$ ) nos ensaios em frascos agitados aumentou continuamente no decorrer do ensaio para todas as condições testadas com exceção dos frascos que continham as bactérias oxidantes de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4 e no frasco com *At. thiooxidans*. Estes resultados estão diretamente relacionados à oxidação da calcopirita que resulta na liberação de ferro, e na habilidade destes micro-organismos oxidarem este substrato, pois nos ensaios inoculados com células

ferro-oxidantes, ao contrário do controle, todo o ferro detectado foi na forma de  $\text{Fe}^{3+}$ .

A cinética de solubilização do cobre nos frascos inoculados e no controle abiótico está representada nas Figuras 13 e 14. Pode-se observar que a presença das bactérias oxidantes de ferro resultou em uma melhor dissolução da calcopirita comparado ao controle abiótico. Os frascos inoculados com C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4, e *At. thiooxidans* - FG01 apresentaram solubilização semelhante ao frasco controle, cerca de 25% (Figura 14).

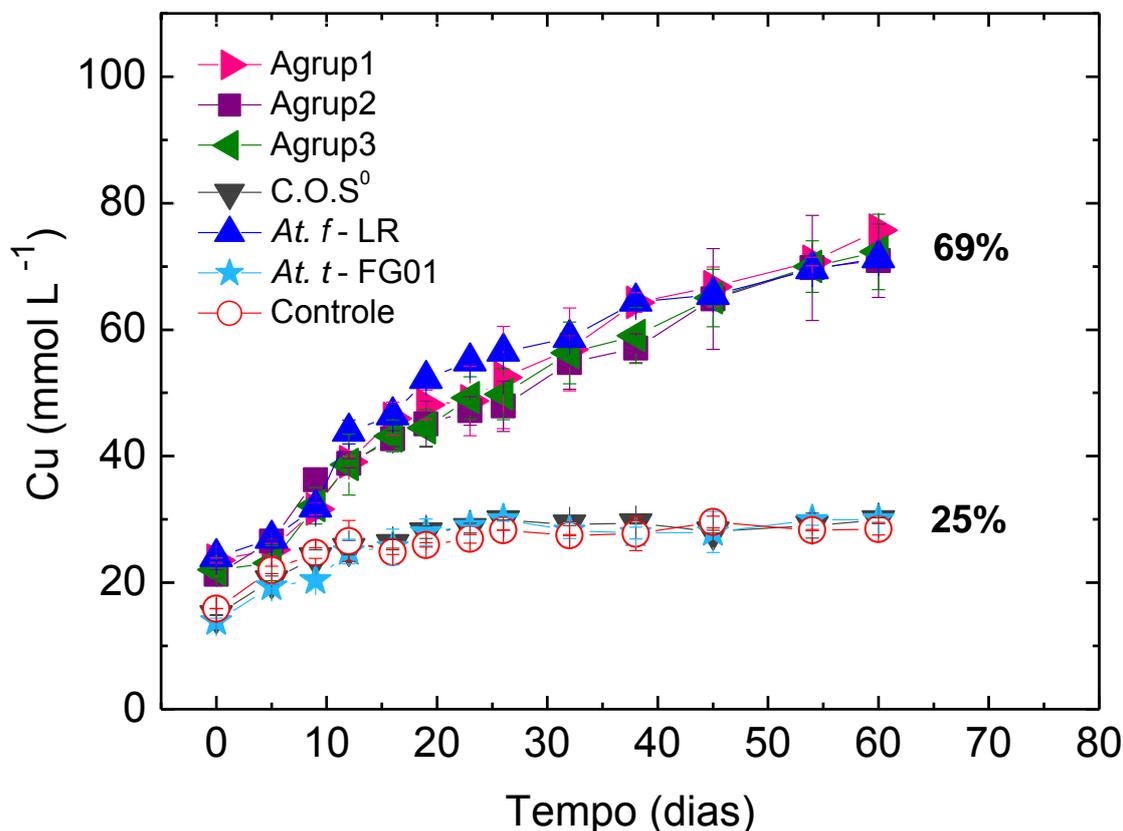
É importante ressaltar que os consórcios obtidos neste trabalho são nativos e provenientes do enriquecimento de amostras minerais ambientais, empregando-se meio de cultivo específico para os micro-organismos oxidantes de ferro e oxidantes de enxofre.

**Figura 13** - Variação da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos oxidantes de ferro e da *At. ferrooxidans* - LR. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 14** - Variação da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* -LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

Mesmo considerando que a calcopirita é um dos sulfetos mais refratários ao ataque oxidante, nas condições estabelecidas verificou-se uma dissolução significativa nos frascos que foram inoculados separadamente, com os consórcios nativos oxidantes de ferro (Figura 13) atingindo cerca de 65% de extração de cobre no decorrer de 45 dias e de 69% para os frascos inoculados com os consórcios nativos agrupados, no decorrer de 60 dias de ensaio (Figura 14).

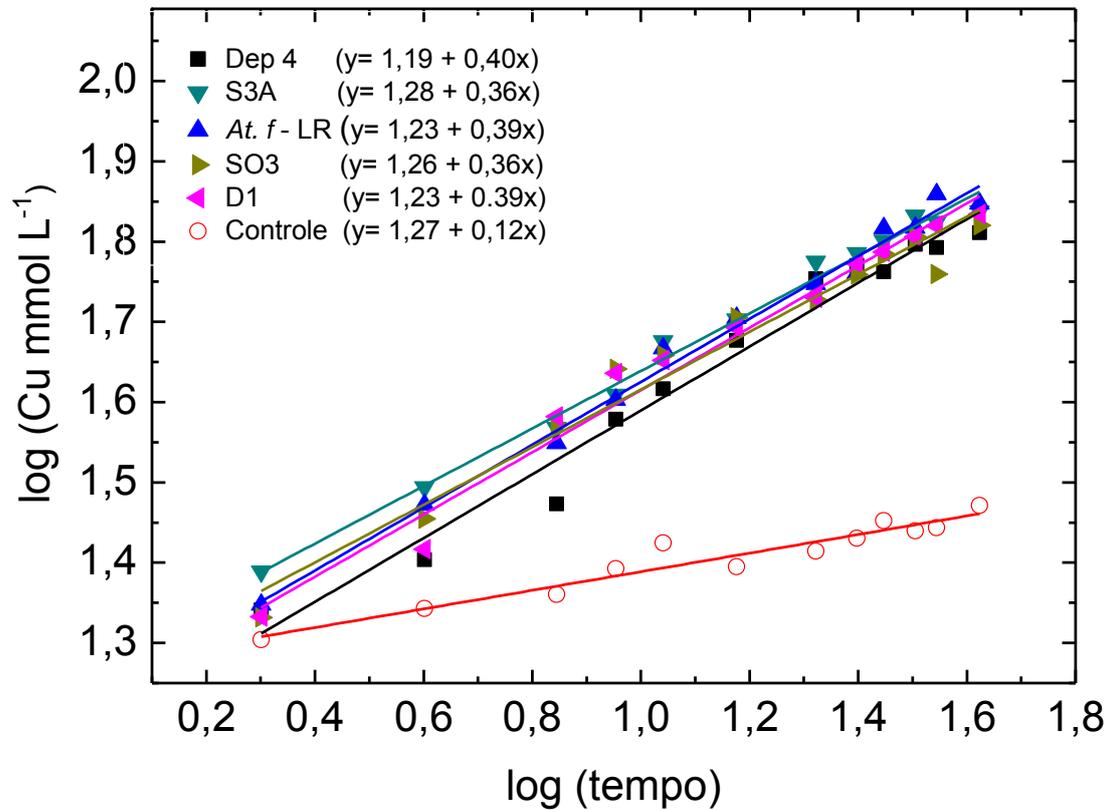
Em relação à capacidade dos consórcios microbianos nativos (ferro-oxidantes inoculados separadamente) lixivarem a calcopirita comparado com a linhagem pura, verificou-se que não houve diferenças significativas entre eles.

Os agrupamentos dos consórcios (1, 2 e 3) também não apresentaram diferença significativa na lixiviação da calcopirita quando comparado aos frascos inoculados separadamente com os consórcios ferro-oxidantes e até mesmo com a linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR (Figuras 13 e 14).

Ressalta-se que no agrupamento 3, além de células oxidantes de ferro havia a presença de células oxidantes de enxofre, que são fundamentais para a remoção da camada de enxofre sobre a superfície da calcopirita, uma vez que esses micro-organismos utilizam somente o  $S^0$  como fonte de energia (GARCIA JÚNIOR 1991) (Equações [2] e [3]), e que poderia contribuir em uma maior recuperação de cobre, no entanto verificou-se que a cinética de lixiviação e a porcentagem de recuperação de cobre do agrupamento 3 não se sobressaiu em relação aos agrupamentos 1 e 2 que continham apenas células oxidantes de ferro.

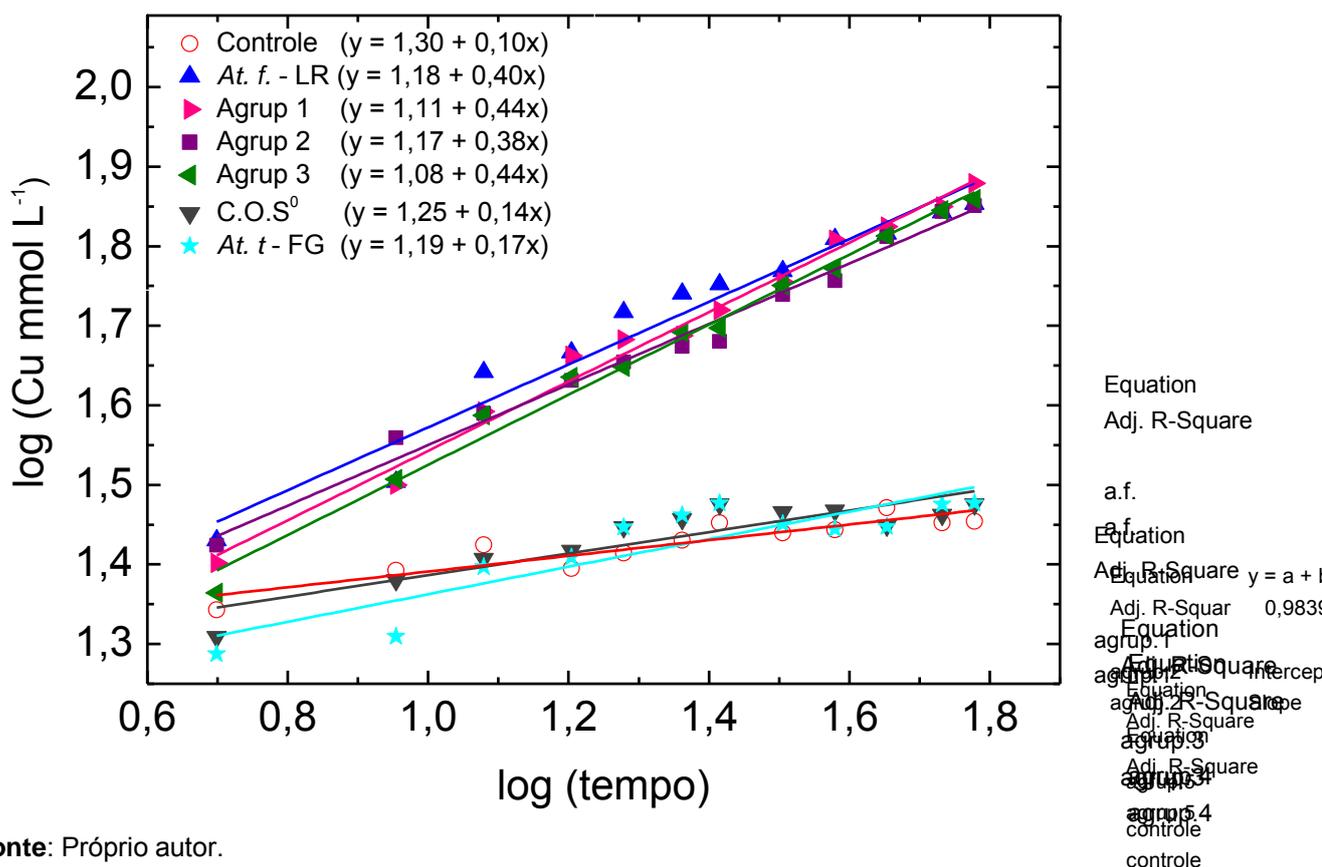
Um tratamento matemático utilizando a função logarítmica (Figuras 15 e 16) foi realizado a partir dos dados dos valores médios representados nas Figuras 13 e 14 para se observar diferenças mínimas entre os consórcios nativos oxidantes de ferro, entre a linhagem *At. ferrooxidans* - LR e entre o agrupamento dos consórcios.

**Figura 15** - Determinação da reta da velocidade de oxidação de cobre pela função logarítmica nos ensaios de biolixiviação dos consórcios nativos oxidantes de ferro e da linhagem pura *At. ferrooxidans*. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

**Figura 16** - Determinação da reta da velocidade de oxidação de cobre pela função logarítmica nos ensaios de biolixiviação da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e da *At. thiooxidans* - FG01 e dos consórcios nativos agrupados. Agrup 1: S3A + Dep SOS-4; Agrup 2: S3A + Dep SOS-4 + *At. ferrooxidans* -LR; Agrup 3: S3A + Dep SOS-4 + consórcio oxidante de enxofre (C.O.S<sup>0</sup>): Dep SOS-4. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

Pela análise matemática apresentada nas Figuras 15 e 16, observaram-se com maior precisão as diferenças na solubilização do cobre pelos diferentes consórcios. Assim foi possível determinar a variação de solubilização do cobre representado pelo coeficiente angular das retas ilustradas nas Figuras 15 e 16. A variação dos valores do coeficiente angular foi de 0,05 entre os consórcios, ou seja, matematicamente a diferença entre eles é muito sutil e o que se tornou imperceptível experimentalmente (Figuras 13 e 14).

O agrupamento dos consórcios (Figura 16) demonstrou numericamente um aumento de 0,05 no coeficiente angular das retas quando comparado ao

coeficiente angular das retas dos consórcios oxidantes de ferro inoculados separadamente.

Os consórcios obtidos neste trabalho podem ser designados como consórcios nativos, uma vez que é formado por bactérias presentes no ambiente natural. A utilização de micro-organismos nativos provenientes de ambientes ácidos de mineração quer seja na sua forma individual ou em conjunto, (consórcios) permite a visualização de suas potencialidades na recuperação do metal de interesse presente em uma amostra mineral. Mousavi e colaboradores (2006) relataram o isolamento da bactéria mesofílica oxidante de ferro, a *At. ferrooxidans* (33°) a partir de um concentrado de calcopirita proveniente de mina de cobre e da bactéria termofílica oxidante de ferro, *Sulfobacillus*, isolada (60°) a partir de um concentrado de esfarelita obtido a partir de uma mina de chumbo e zinco. Esses micro-organismos foram utilizados na lixiviação de um minério complexo de zinco de baixo teor. Os resultados demonstraram uma máxima recuperação de zinco empregando-se as culturas nativas. Sendo que a dissolução de zinco atingiu 58% com *Sulfobacillus* e 51% com a *At. ferrooxidans*.

Ainda se tratando da capacidade de lixiviar sulfetos minerais por consórcios microbianos nativos (obtidos a partir do enriquecimento de amostras minerais provenientes de drenagens ácidas de minas de cobre) Marhual e colaboradores (2008) relataram a obtenção de consórcios bacterianos mesofílicos (35°C) e termofílicos (50°C) a partir do enriquecimento de amostras provenientes de drenagens ácidas. Este estudo demonstrou que esses consórcios possuíam habilidade em lixiviar a calcopirita. O consórcio termofílico apresentou recuperação de 75% de cobre e mostrou-se ser mais eficiente quando comparado ao consórcio mesofílico, que recuperou 42% de cobre.

Outro exemplo deste mesmo tópico pode ser visto no trabalho de Keeling e colaboradores (2005) onde amostras minerais contendo calcocita/calcopirita/pirita provenientes de diferentes locais de uma pilha de biolixiviação foram enriquecidas e foram obtidos consórcios nativos bacterianos mesofílicos (30°C) e termofílicos (45°C) oxidantes de ferro e de enxofre. Os consórcios obtidos foram avaliados quanto sua capacidade de lixiviar um concentrado de calcopirita a temperaturas de 30 e 45°C e

linhagens puras de *Acidithiobacillus ferrooxidans* - DSM 583 (30°C) e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* - DSM 9293 (45°C) foram utilizadas como referencia para se comparar com a capacidade biolixivante dos consórcios. Os consórcios termofílicos apresentaram uma cinética similar entre si e, recuperaram 50% de cobre, porém a linhagem referência *S. thermosulfidooxidans* recuperou menos cobre quando comparado aos consórcios termofílicos (20%). Os consórcios mesofílicos não apresentaram diferenças entre si e recuperam mais cobre (20%) do que a linhagem de referencia *At. ferrooxidans* (5%). Houve uma menor extração de cobre da calcopirita a 30°C em comparação a temperatura de 45°C

Xia e colaboradores (2012) relataram que diferentes tipos de enriquecimento para uma mesma amostra microbiana ambiental pode resultar em taxas de recuperação de cobre distintas.

Neste trabalho, o enriquecimento de uma amostra microbiana ambiental (consórcio) proveniente de uma mina de cobre foi realizado em cinco condições diferentes. O consórcio foi inoculado em frasco contendo somente sais minerais e também foi inoculado em frascos com sais minerais na presença: A) 1% de calcopirita; B) 2% sulfato ferroso e 1% de calcopirita; C) 0,5% de enxofre e 1% de calcopirita e D) 0,5% de enxofre 2% de sulfato ferroso e 1% de calcopirita. Os consórcios demonstraram performances diferentes na biolixiviação para cada tipo de enriquecimento. Observou-se que o consórcio enriquecido na condição B inicialmente, extraiu mais cobre (40%) e estabilizou-se no final recuperando 50%, ao contrário das outras condições de enriquecimento A, C e D que mantiveram a taxa de recuperação de cobre maior em torno de 67%, 71%, 75%, respectivamente. O consórcio enriquecido somente com sais minerais extraiu menos cobre (28%) em comparação as outras culturas (XIA et al., 2012).

São vários os trabalhos que propõem a otimização dos processos de biolixiviação, como por exemplo, a utilização de cultivos mistos a partir de culturas isoladas, formulados especialmente com o intuito de melhorar a recuperação de cobre de um mineral de baixo teor de metal frente a uma linhagem pura. O tipo de enriquecimento e a adaptação dos consórcios microbianos ambientais pode proporcionar uma melhor recuperação de cobre

nos processos de biolixiviação. Alguns trabalhos relacionados são descritos seguir.

Qiu e colaboradores (2005) demonstraram que a extração do cobre na presença de culturas mistas (*At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*) foi maior em relação às culturas puras de *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*. É importante ressaltar que nesse caso o consórcio era composto por micro-organismos oxidantes de ferro e também de enxofre.

A capacidade de culturas puras e consórcios sintéticos mesofílicos em biolixiviar um mineral de baixo teor foi avaliada e demonstrou que a cultura pura de *At. ferrooxidans* possui maior habilidade biolixivante em relação às culturas puras de *L. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*, esta última possui capacidade limitada de biolixiviar sulfetos minerais. Entretanto a cultura mista sintética composta por *At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* e a cultura composta por *L. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* demonstraram maior habilidade na recuperação de cobre em relação às culturas puras (AKCIL et al., 2007).

Culturas mistas sintéticas termofílicas compostas por *L. ferriphilum* e *At. caldus* são mais eficientes na recuperação de metal do que a cultura pura de *At. ferrooxidans* e as culturas mistas sintéticas mesofílicas compostas por *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* (FU et al., 2008).

A eficiência dos consórcios sobre uma cultura pura (*At. ferrooxidans*) foi descrito por Zhang et al., (2008), que realizaram a biolixiviação da calcopirita utilizando uma cultura pura e uma cultura mista sintética composta por *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *L. ferriphilum* e *L. ferrooxidans*. Este estudo relatou que essa maior eficiência em relação à cultura pura pode ser devido à presença de células enxofre-oxidantes que contribuem de forma positiva para que ocorra um aumento na velocidade de solubilização e na recuperação de cobre a partir da calcopirita.

Segundo Norris (1990), no contexto da oxidação mineral por populações mistas sintéticas, onde uma co-cultura de *L. ferrooxidans* e oxidantes de enxofre *A. thiooxidans* ou *A. caldus* (termófilas moderadas) foram utilizadas observou-se uma maior dissolução de calcopirita em comparação com a cultura pura.

Recentemente foram realizados ensaios em fracos agitados utilizando consórcios sintéticos de micro-organismos mesofílicos (*Leptospirillum sp*, *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans*), termofílicos moderados (*S. thermosulfidooxidans*, *At. caldus*, *Ac. ferrooxidans*, *S. acidophilus*) e extremos (*Ac. brierleyi*, *Ac. infernus*, *Metallosphaera sedula*, *S. metallicus*, *S. acidocaldarius*, *S. shibatae*) para estudar a influência de cada um dos consórcios na dissolução/oxidação de um minério de cobre. O consórcio que demonstrou melhor desempenho na dissolução de cobre foi o dos micro-organismos termofílicos extremos. Esse resultado pode ter sido influenciado pela temperatura, pois a taxa de oxidação química é maior nesses casos (BARRETO, 2012).

A diversidade da população bacteriana parece estar intimamente relacionada com as condições de biolixiviação e pode mudar de acordo com os fatores aplicados no sistema (JOHNSON, 1998). Sendo assim, a compreensão do papel das cepas bacterianas e das interações dentro das populações bacterianas pode melhorar o entendimento dos processos de biolixiviação e suas eficiências (AKCIL et al., 2007).

Apesar de estar descrito na literatura que a associação de dois ou mais micro-organismos acidófilos pode resultar em atividades complementares mais eficientes (sinergismo, por exemplo, em termos de formação de produto) do que qualquer organismo isoladamente (JOHNSON, 1998), no presente estudo isto não foi verificado de forma significativa.

Como salientado, vários trabalhos descrevem o enriquecimento de amostras minerais e/ou microbianas ambientais provenientes de ambientes ácidos de minas e avaliam a capacidade oxidativa frente a um sulfeto mineral (MARHUAL et al, 2008; KEELING et al., 2005; MOUSAVI et al., 2006; XIA et al., 2012). Como já destacado, no presente estudo os consórcios foram obtidos a partir de amostras minerais naturais através do enriquecimento com meio de cultivo contendo como substrato íons ferrosos e enxofre, sendo possível a obtenção de micro-organismos nativos e ainda, testa-los quando as suas habilidades oxidativas frente a calcopirita.

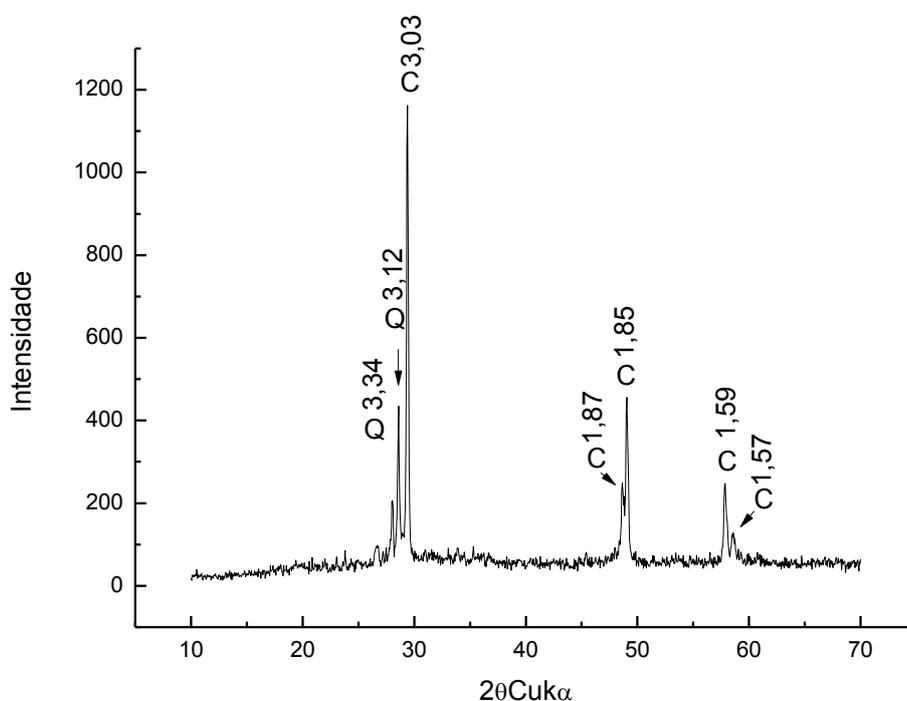
### **8.3 Análise dos produtos da fase sólida**

Os resíduos sólidos obtidos ao final dos ensaios em frascos agitados foram submetidos à análise de difração de raios-X (DRX). Os difratogramas das amostras mostraram-se semelhantes, portanto apenas um está sendo ilustrado pela Figura 17. Comparando-se com o difratograma de raios X da amostra original de calcopirita (Figura 2) observou-se que não houve a formação de novas fases cristalinas.

O aparecimento de novas fases cristalinas como enxofre elementar, precipitados de ferro e covelita nos ensaios de solubilização da calcopirita com adição suplementar de  $\text{Fe}^{2+}$  foi descrito por Bevilaqua e colaboradores. (2002; 2010). Na condição sem adição suplementar de íons ferrosos não foi observado à formação de novas fases cristalinas no meio reacional.

Desta maneira, os resultados obtidos nos difratogramas de raios-X no presente estudo eram esperados, uma vez que nenhuma solução foi adicionada aos ensaios de biolixiviação em frascos agitados.

**Figura 17** - Difratograma de raios X da amostra residual dos ensaios em frascos agitados. Os símbolos indicam C - calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e Q - quartzo ( $\text{SiO}_2$ ). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.



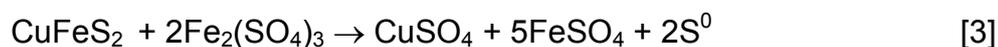
**Fonte:** Próprio autor.

## 8.4 Ensaios respirométricos

### 8.4.1 Consórcios oxidantes de ferro e *At. ferrooxidans* - LR

O objetivo deste ensaio foi avaliar a capacidade de oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e calcopirita dos consórcios microbianos e compara-los com uma linhagem estudada previamente nas mesmas condições. Este ensaio apresenta a vantagem de ser simples e de curta duração, poucas horas, enquanto o ensaio de biolixiviação em frascos pode durar semanas.

De acordo com as equações abaixo, as Equação [2] e [3] que indicam a oxidação da calcopirita, e a Equação [4] representando a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ , pode-se notar que as mesmas ocorrem concomitante ao consumo de oxigênio e à formação de sulfato,  $\text{Fe}^{3+}$  e Cu (II) respectivamente. Então, as medidas do consumo de oxigênio obtidas a partir dos ensaios respirométricos estão diretamente relacionadas à oxidação do referido sulfeto metálico ( $\text{CuFeS}_2$ ) ou do  $\text{Fe}^{2+}$



A Figura 18 demonstra o consumo de oxigênio da *At. ferrooxidans* - LR na presença de calcopirita como substrato. Em ambos os substratos testados (calcopirita e  $\text{Fe}^{2+}$ ) foi observado um maior consumo de oxigênio nos frascos inoculados do que na condição abiótica, evidenciando a atividade bacteriana nestas condições. A linhagem de *At. ferrooxidans* - LR foi utilizada em trabalhos anteriores de nosso grupo nas mesmas condições e por isso foi utilizada como controle positivo (BEVILAQUA et al., 2002; BEVILAQUA, 1999).

Os consórcios apresentaram em ambas as condições consumos de oxigênio menores que a linhagem utilizada como controle. Na presença de

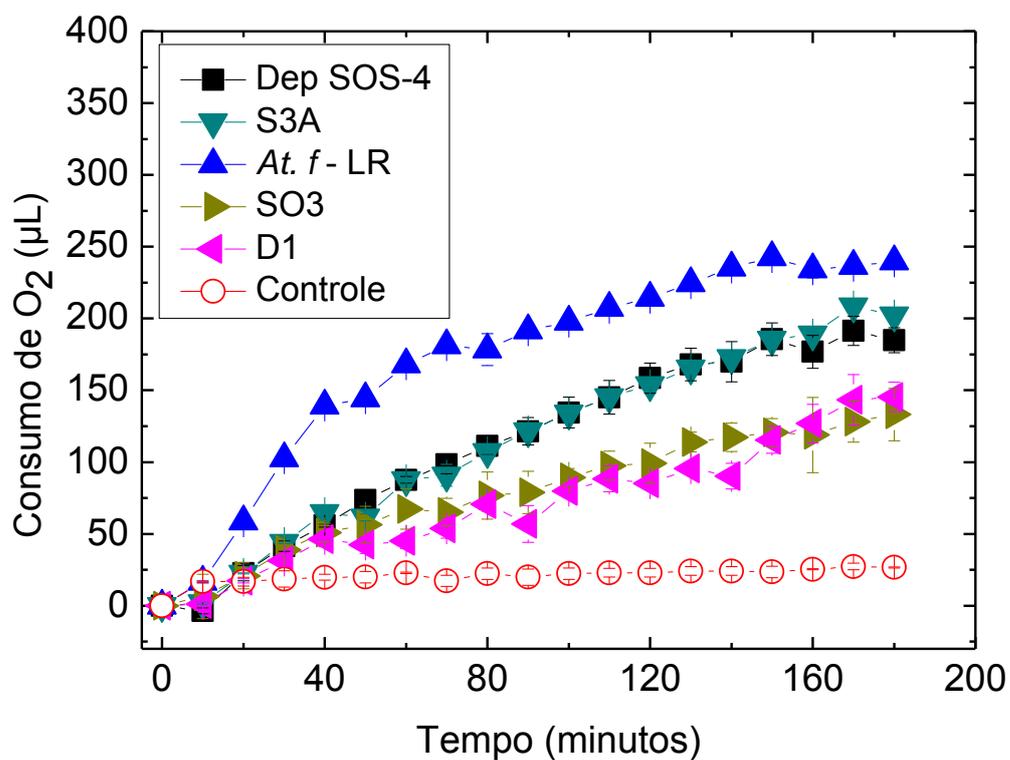
calcopirita observou-se que não houve diferenças significativas no consumo de oxigênio entre os consórcios Dep SOS-4 e o S3A, porém eles apresentaram maior consumo de oxigênio em relação aos consórcios SO3 e D1, que também não apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao consumo de oxigênio.

Na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 19) os consórcios Dep SOS-4 e S3A não apresentaram diferenças em relação ao consumo de oxigênio, entretanto observou-se que estes consórcios tiveram uma capacidade oxidativa superior que os consórcios SO3 e D1 conforme ilustrado pela Figura 18. O consórcio D1 consumiu mais oxigênio que o consórcio SO3.

O consumo de oxigênio na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  é significativamente maior que na presença de calcopirita. Esta diferença é explicada pela natureza diferente de ambos os substratos, enquanto  $\text{Fe}^{2+}$  é solúvel, na calcopirita se encontra na rede cristalina e, portanto inicialmente insolúvel.

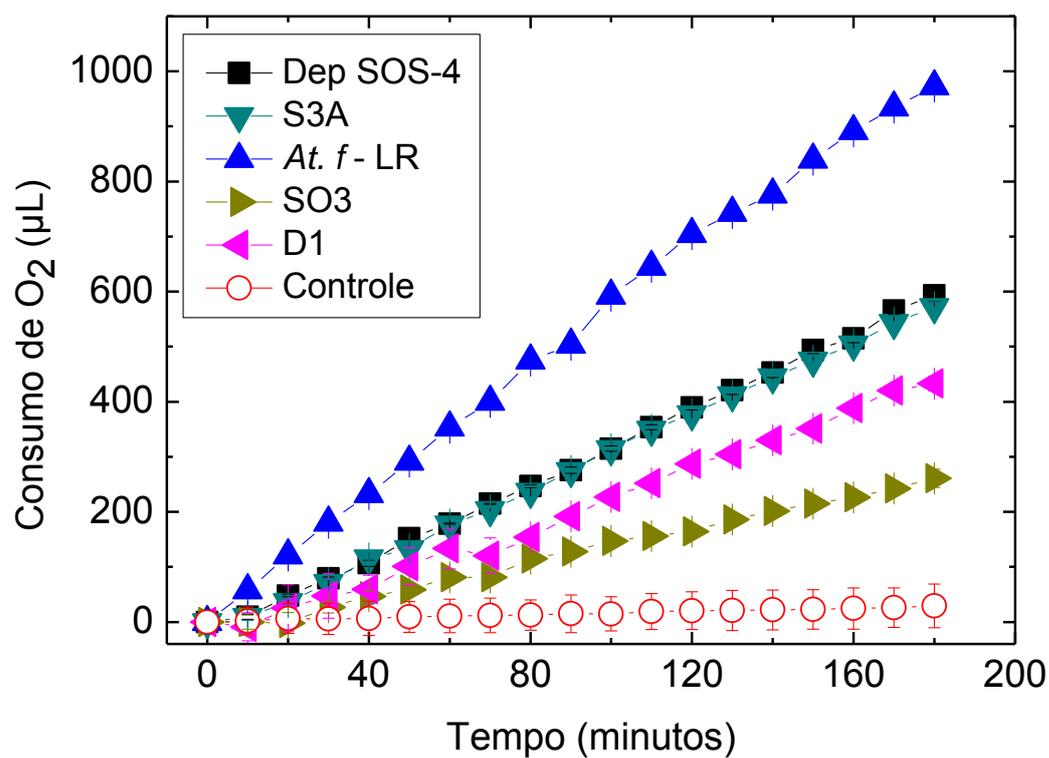
A *At. ferrooxidans* - LR consumiu mais oxigênio na presença de calcopirita do que os consórcios oxidantes de ferro. Este resultado ratifica os estudos anteriores que demonstraram a capacidade desta linhagem oxidar ambos os substratos. E comparativamente às outras culturas avaliadas apresentou maior capacidade de oxidação dos substratos.

**Figura 18** - Atividade respiratória do *At. ferrooxidans* - LR e dos consórcios nativos oxidantes de ferro crescidos em  $\text{Fe}^{2+}$  (150 $\mu\text{g}$  de proteína total) utilizando 0,1g de calcopirita como substrato oxidável. Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle



Fonte: Próprio autor.

**Figura 19** - Atividade respiratória do *At. ferrooxidans* - LR e dos consórcios nativos oxidantes de ferro crescidos em  $\text{Fe}^{2+}$  (150 $\mu\text{g}$  de proteína total) utilizando 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  120  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os símbolos cheios representam os ensaios inoculados e o símbolo vazio o ensaio controle.



Fonte: Próprio autor.

**Tabela 7** - Velocidade inicial -  $V_0$  ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) dos ensaios respirométricos dos consórcios nativos oxidantes de ferro Dep SOS-4, S3A, SO3, D1, da linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR e do frasco controle na presença de  $100\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}^{2+}$   $120 \text{ mmol L}^{-1}$  e na presença  $0,1\text{g}$  de calcopirita como substrato oxidável.

Amostras	Velocidade inicial - $V_0$ ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	
	$\text{Fe}^{2+}$	Calcopirita
Dep SOS-4	3,03	1,56
S3A	3,47	1,83
SO3	1,59	1,35
D1	2,47	1,25
<i>At. ferrooxidans</i> - LR	5,84	3,72
Controle	0,18	0,16

Fonte: Próprio autor.

Com a finalidade de determinar a capacidade oxidativa dos consórcios oxidantes de ferro aos meios reacionais ( $\text{Fe}^{2+}$  e calcopirita), além do consumo de oxigênio no tempo experimental total, foi determinado a velocidade inicial ( $V_0$ ) do consumo de oxigênio (Tabela 7).

Através da análise da Tabela 7, verificou-se que na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  como substrato os consórcios Dep SOS-4 e S3A apresentaram maior  $V_0$  quando comparados com os consórcios SO3 e D1. Portanto em um processo comercial, por exemplo, uma pilha de biolixiviação em que a regulação da disponibilidade de oxigênio é difícil e flutuações em suas concentrações podem ocorrer, os consórcios Dep SOS-4 e o S3A seriam os mais indicados, pela sua flexibilidade no consumo de oxigênio, desde que não houvesse disponibilidade de  $\text{CO}_2$ , como na condição dos ensaios respirométricos.

A  $V_0$  dos consórcios na presença de calcopirita como substrato relevou uma pequena diferença entre os consórcios. E novamente os consórcios Dep SOS-4 e o S3A demonstraram uma  $V_0$  maior quando comparado aos consórcios D1 e SO3.

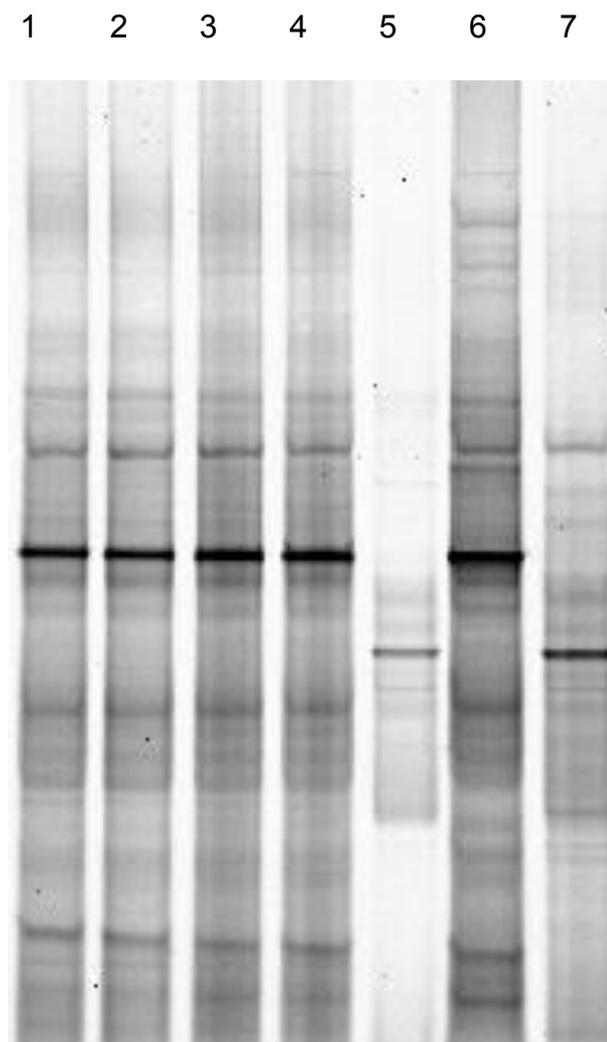
A *At. ferrooxidans* - LR tanto na presença do  $\text{Fe}^{2+}$  como na presença da calcopirita como substrato, demonstrou uma  $V_0$  no consumo de oxigênio entre duas a três vezes maiores em comparação ao  $V_0$  dos consórcios. Desta forma fica evidente o maior desempenho da linhagem pura nos ensaios de respirometria celular.

### 8.5 Análise qualitativa da biodiversidade dos consórcios

Na análise do gel de DGGE (Figura 20) observou-se a presença de várias bandas de rDNA. As linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são correspondentes aos consórcios oxidantes de ferro S3A, Dep SOS-4, D1, SO3, consórcio oxidante de enxofre Dep SOS-4, *At. ferrooxidans* - LR e *At. thiooxidans* - FG01, respectivamente. As bandas de rDNA dos consórcios oxidantes de ferro assemelham-se as bandas da linhagem *At. ferrooxidans* - LR, e as bandas de rDNA do consórcio oxidante de enxofre apresentam-se similar as bandas da linhagem pura *At. thiooxidans* - FG01. Estes resultados sugerem que os consórcios oxidantes de ferro sejam compostos pela espécie de *At. ferrooxidans*, e que a espécie *At. thiooxidans* esteja presente no consórcio oxidante de enxofre.

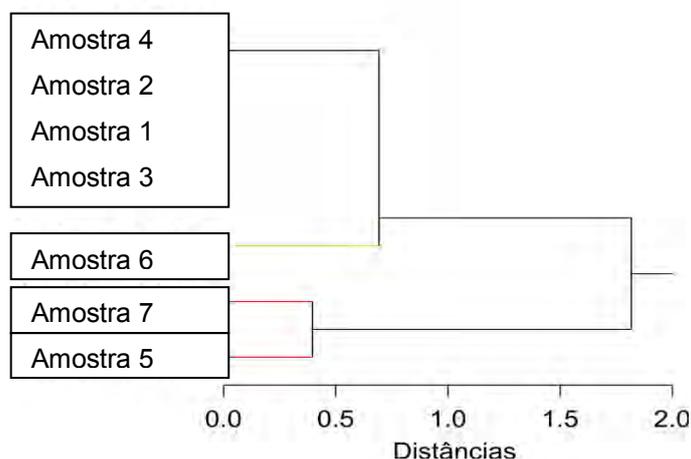
O dendrograma (Figura 21) com base na separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) revelou a divisão das amostras em dois clados principais: o primeiro inclui os consórcios oxidantes de ferro e a linhagem pura *At. ferrooxidans* - LR; e o segundo engloba o consórcio oxidante de enxofre (C.S.O<sup>0</sup>: Dep SOS-4) e a linhagem pura de *At. thiooxidans* - FG01.

**Figura 20** - Separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) dos consórcios nativos oxidantes de ferro S3A, Dep SOS-4, D1, SO3 (representados pelos número 1, 2, 3, 4), do consórcio nativo oxidante de enxofre C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4 (número 5), e das linhagens puras *At. ferrooxidans* - LR (número 6) e *At. thiooxidans* - FG01 (número 7).



**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 21** - Agrupamento hierárquico com base em matriz binária, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com base no algoritmo Ward e distância Euclidiana.



**Fonte:** Próprio autor.

Para caracterização genética de bactérias, têm sido utilizados os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA). As moléculas de rRNA são empregadas para determinar a inter-relação filogenética dos micro-organismos. A grande maioria dos estudos filogenéticos tem-se centrado no rRNA 16S e existe um vasto conhecimento de sequências comparativas da subunidade menor do rRNA (MENDOZA et al., 1998).

A caracterização da biodiversidade de micro-organismos utilizando a amplificação da região do gene rRNA 16S está ilustrado na Figura 20. É possível a visualização de mais de uma banda nas diferentes amostras (linhas 1, 2, 3, 4, 5,) e até mesmo quando se emprega linhagem pura (linhas 6 e 7). Este fato pode estar relacionado ao alto nível de conservação dos genes rRNA entre a maioria das espécies de procariotos, e portanto é esperado que existam múltiplas cópias e que essas geralmente se diferenciem quanto ao tamanho e composição. Quando os produtos de amplificação apresentam apenas um fragmento existe a possibilidade de que no genoma deste micro-organismo haja apenas uma sequência alvo ou que, pelo menos, o tamanho das múltiplas cópias seja semelhante (DOLZANI, 1995).

Estudos da estrutura de comunidades e diversidade de bactérias oxidantes de ferro e forma reduzidas de enxofre se concentram, em sua maioria, em ambientes de drenagens ácidas e biorreatores (FERRERA et al., 2007; HE et al., 2007; TAN et al., 2007). O emprego de técnicas moleculares, como o DGGE, permite a visualização da presença, por exemplo, de várias espécies bacterianas como a *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. caldus*, *L. ferrooxidans*. A presença de arqueias oxidantes de ferro e/ou enxofre como *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfurisphaera*, e *Ferroplasma* também tem sido relatadas (FUCHS et al., 1995, 1996; EDWARDS et al., 2000).

Demergasso e colaboradores (2005) fizeram uma análise da comunidade microbiana através da utilização da Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) e sequenciamento da região rRNA 16S de bactérias presentes em uma pilha de biolixiviação contendo sulfeto de cobre de baixo teor. Neste estudo foi detectado a presença da *At. ferrooxidans*, *L. ferriphilum*, *Ferroplasma acidiphilum* e também alguns micro-organismos do gênero *Sulfurisphaera* e *Sulfobacillus*.

Ainda se tratando de análise de comunidades microbianas presentes em ambientes ácidos de mina empregando técnicas moleculares, os pesquisadores Xiao et al. (2009) relataram a presença de bactérias *alphaproteobacteria* (*Acidiphilum* sp, *Hypomicrobium vulgare*), *bethaproteobacteria* (*Acidovorax* sp, *Gallionella ferruginea*), *gamaproteobacteria* (*Acinetobacter* sp, *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. albertensis*), *Firmicutes* (acidófilicos ferro-oxidantes Gram-positivos, *S. thermotoleran*), *Actinobacteria* (*F. acidiphilum*) e *Nitrospira* (*L. ferriphilum*, *L. ferrooxidans*). Entretanto neste estudo, os micro-organismos não foram submetidos à etapa de enriquecimento em meios de cultivos líquidos, o DNA dos micro-organismos foi extraído a partir das amostras em seu estado bruto (hiper filtração a vácuo em membrana 0,22µm). Desta forma a grande diversidade de espécies encontradas neste estudo pode estar relacionada a este fator.

A ausência de uma grande variedade de espécies no presente estudo pode estar relacionada às condições de crescimento fornecidas aos consórcios, empregando-se meios de cultivos específicos para os micro-

organismos oxidantes de ferro e para os oxidantes de enxofre, assim os consórcios podem ter ficado restrito apenas aos micro-organismos capazes de sobreviver nos meios de cultivos empregados. A fim de se testar o desempenho dos consórcios em condições ótimas de biolixiviação em escala laboratorial, o enriquecimento foi necessário. Assim como demonstrado pelos autores Xia et al. (2012) o tipo de enriquecimento empregado para a obtenção dos consórcios influencia na seleção dos micro-organismos e também em suas capacidades oxidativas.

É válido destacar que a *At. ferrooxidans* é um micro-organismo que possui capacidade de oxidar tanto  $\text{Fe}^{2+}$  como o  $\text{S}^0$  e utiliza-los como de fonte de energia para seu crescimento celular, perante isso este micro-organismo de forma geral predomina nos ensaios de biolixiviação.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com dados de literatura descritos, salienta-se a detecção das espécies *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* em ambos os casos.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção dos consórcios a partir de amostras minerais ambientais é um processo lento e muito laborioso. O enriquecimento dos consórcios oxidantes de ferro foi relativamente mais rápido quando comparado com o enriquecimento dos consórcios oxidantes de enxofre devido ao fato da cinética de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  ser mais rápida do que a do  $\text{S}^0$ .

Foram realizados agrupamentos dos consórcios com o propósito de avaliar a eficiência destes em relação à extração de cobre frente aos consórcios oxidantes de ferro inoculados separadamente.

Em relação ao comportamento dos consórcios agrupados (agrupamento 1, 2, 3), quando comparados com os consórcios oxidantes de ferro inoculados separadamente, não se observou diferenças significativas na recuperação de cobre, podendo ser confirmado pela análise do gel de DGGE, que evidenciou a probabilidade dos consórcios oxidantes de ferro (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1) serem compostos pela mesma espécie.

Observou-se que não houve a formação de nenhuma outra fase cristalina, incluindo enxofre elementar, nos resíduos finais dos ensaios de biolixiviação e, portanto este fato pode explicar a indiferença quando foram utilizados os micro-organismos oxidantes de enxofre nos ensaios de biolixiviação em frascos agitados.

As bactérias oxidantes recolhidas das fontes minerais naturais demonstraram capacidade em biolixiviar um sulfeto de cobre em escala de bancada. Sendo assim, pode-se seguir para uma etapa posterior, por exemplo, uma pilha de biolixiviação.

Os consórcios oxidantes de ferro foram avaliados quanto as suas capacidades oxidativas frente a um substrato ( $\text{Fe}^{2+}$  e calcopirita) e comparados com a *At. ferrooxidans* - LR.

A análise qualitativa da biodiversidade microbiana empregando o DGGE foi a última etapa experimental a ser realizada para finalização do presente estudo devido a restrições de uso do equipamento. Esta análise

corroborou com os resultados das etapas experimentais realizadas previamente.

A biodiversidade dos consórcios foi comparada com a espécie *At. ferrooxidans* - LR, espécie que predomina nos ambientes de biolixiviação devido à capacidade que possui de oxidar tanto o  $\text{Fe}^{2+}$  como o  $\text{S}^0$ , e com a *At. thiooxidans*. Nestas análises não foram empregadas outras espécies devido à grande dificuldade em obtê-las, visto que o laboratório de Biohidrometalurgia do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, SP, é pioneiro e o único detentor da coleção da espécie *At. ferrooxidans* e *At. thiooxidans* no Brasil.

## 10. CONCLUSÕES

- Dentre 15 amostras de minério sulfetado de cobre fornecida pela Vale, foi possível a obtenção de consórcios oxidantes de ferro e de enxofre, entretanto, somente de quatro amostras (Dep SOS-4, S3A, SO3 e D1).
- Comparando-se a extração de cobre dos consórcios com a linhagem pura de *At. ferrooxidans* não foi observado diferenças significativas entre eles no tempo e nas condições de ensaio. Portanto, os consórcios não mostraram maior eficiência na solubilização de cobre em relação à linhagem pura.
- O agrupamento dos consórcios não revelou maior eficiência na recuperação de cobre em relação à linhagem pura (*At. ferrooxidans* LR) e nem aos consórcios inoculados separadamente.
- Não se observou a formação de novas fases cristalinas nos resíduos sólidos dos ensaios em frascos agitados.
- Os resultados da atividade respiratória evidenciaram uma diferença do *At. ferrooxidans* - LR em relação aos consórcios oxidantes de ferro, na presença de calcopirita e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ .
- A biodiversidade dos consórcios oxidantes de ferro (Dep SOS-4, S3A, SO3, D1) e do C.O.S<sup>0</sup>: Dep SOS-4 foi analisada utilizando o DGGE sugerindo que os consórcios oxidantes de ferro sejam compostos pela espécie *At. ferrooxidans* e que o consórcio oxidante de enxofre seja composto pela espécie *At. thiooxidans*.

## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, F. The use of reactors in biomining processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 184-194, 2000.

ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. Biooxidación del ion ferroso. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. v. 1, cap. 3, p. 45-61.

AKCIL, A.; CIFTCI, H.; DEVECI, H. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. **Minerals Engineering**, v. 20, p. 310-318, 2007.

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

BACELAR-NICOLAU, P.; JOHNSON, D. B. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 585-590, 1999.

BALLESTER, A. Mecanismo de la biolixiviación. In: ACEVEDO, F. E.; GENTINA, J. C. M. (Ed.). **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. v. 1, cap. 1, p. 09-24.

BARRETO, J. G. **Beneficiamento de um minério primário de cobre mediante o uso de micro-organismos**: biolixiviação e cominuição bio-assistida. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Programa de Pós-Graduação em Geologia, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) bornita (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>) por *Acidithiobacillus ferrooxidans***. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) e bornita (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub>)**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidación de sulfuros de cobre por A. ferrooxidans: análisis de los productos de las fases líquidas y sólidas. In: ACEVEDO, F. E.; GENTINA, J. C. M. (Ed.). **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. v. 1, cap 4, p. 63-77.

- BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidative dissolution of bornite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 101-106, 2010.
- BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 587-592, 2002.
- CIMINELLI, V. S. T. Hidrometalurgia. In: FERNANDES, F. R. C. (Ed.). et al. **Tendências tecnológicas Brasil 2015: geociências e tecnologia mineral**. Rio de Janeiro: CETEM, 2007. Cap. 4, p. 157-174.
- CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: general aspects. **Hydrometallurgy**, v. 93, p. 81-87, 2008.
- DEMERGASSO, C. S.; GALLEGUILLOS, P. A. P.; ESCUDERO, L. V. G.; ZEPEDA, V. J. A.; CASTILLO, D.; CASAMAYOR, E. O. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 241-253, 2005.
- DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; BRAGADIN, C. M. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S- 23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1108-1113, 1995.
- EDWARDS, K. J.; BOND, P. L.; GIHRING, T. M. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. **Science**, v. 279, p. 1796-1799, 2000.
- FERRERA, I.; SÁNCHEZ, O.; MAS, J. Characterization of a sulfide-oxidizing biofilm developed in a packed-column reactor. **International Journal of Microbiology**, v. 10, p. 29-37, 2007.
- FU, B.; ZHOU, H.; ZHANG, R.; QIU, G. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus ssp* and *Leptospirillum ferriphilum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 109-115, 2008.
- FUCHS, T.; HUBER, H.; BURGGRAF, S. 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order Sulfolobales and reclassification of *Desulfurobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 56-60, 1996.
- FUCHS, T.; HUBER, H.; TEINER, K.; BURGGRAF, S.; STETTER, K. O. *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, p. 560-566, 1995.

GARCIA JUNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 20, p. 1-6, 1991.

GARCIA JUNIOR, O. ; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, p. 485-512.

GARCIA JUNIOR, O.; MUKAI, J.; ANDRADE, C. B. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, p. 179-282, 1992.

GÓMEZ, J. M.; CANTERO, D. Biooxidación del ion ferroso. In: ACEVEDO, F. E.; GENTINA, J. C. M. (Ed.). **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, 2005. Cap. 2, p. 25-43.

GÓMEZ, E.; BLÁZQUEZ, M. L.; BALLESTER, A.; GONZÁLEZ, F. Study by SEM and EDS of chalcopyrite bioleaching using a new thermophilic bacteria. **Minerals Engineering**, v. 9, p. 985-999, 1996.

HABASHI, F. A short history of hydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 79, p. 15-22, 2005.

HACKL, R. P.; DREISINGER, D. B.; PETERS, E.; KING, J. A. Passivation of chalcopyrite during oxidative leaching in sulfate media. **Hydrometallurgy**, v. 39, p. 25-48, 1995.

HAN, C. J. **Physiological studies of extremely thermoacidophilic microorganisms under normal and stressed conditions**. 1998. 220 f. Dissertation (Degree in Microbiology) - Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 1998.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HE, Z.; XIAO, S.; XIE, X.; ZHONG, H.; HU, Y.; LI, Q.; GAO, F.; LI, G.; LIU, J.; QIU, G. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. **Extremophiles**, v. 7, p. 305-314, 2007.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 307-317, 1998.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and interactions of acidophiles: key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 18, p. 1367-1373, 2008.

JONES, R. T. **Electronic structures of the sulfide minerals sphalerite, wurtzite, pyrite, marcasite, and chalcopyrite**. 2006. 256 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Applied Science) - Ian Wark Research Institute, University of South Australia, Adelaide, 2006.

KAWASHIMA, Y.; LI, N.; CHANDRA, J.; LI, A. P.; GERSON, A. R. A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite. **Advances in Colloid and Interface Science**, doi:10.1016/j.cis.2013.03.004.

KLAUBER, C. Fracture reconstruction of a chalcopyrite CuFeS<sub>2</sub> surface. **Surface and Interface Analysis**, v. 35, p. 415-428, 2003.

KLAUBER, C. A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopyrite with regards to hindered dissolution. **International Journal of Mineral Processing**, v. 86, p. 1-17, 2008.

KARAVAIKO, G. I.; TOUROVA T. P.; KONDRAT'EVA, T. F.; LYSENKO, A. M.; KOLGANOVA, T. V.; AGEEVA, S. N.; MUNTYAN, L. N.; PIVOVAROVA, T. A. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 113-119, 2003.

KEELING, S. E.; PALMER, M. L.; CARACATSANIS, F. C.; JOHNSON, J. A.; WATLING, H. R. Leaching of chalcopyrite and sphalerite using bacteria enriched from a spent chalcocite heap. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 1289-1296, 2005.

KELLY, R.; BROWN, S. Enzymes from high temperature microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, p. 188-193, 1993.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov. *Haliothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, v. 50, p. 511-515, 2000.

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

LLANOS, J.; BULJAN, A.; MUJICA, C.; RAMÍREZ, R. Electron transfer in the insertion of alkali metals in chalcopyrite. **Materials Research Bulletin**, v. 30, p. 43-48, 1995.

MARHUAL, N. P.; PRADHAN, N.; KAR, R. N.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8331-8336, 2008.

MIKHLIN, Y.; TOMASHEVICH, Y.; TAUSON, V.; VYALIKH, D.; MOLODTSOV, S.; SZARGAN, R. A comparative X-ray absorption near-edge structure study

of bornite,  $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ , and chalcopyrite,  $\text{CuFeS}_2$ . **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 142, p. 83-88, 2005.

MENDOZA, M.; MEUGNIER, H.; BES, M.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Identification of *Staphylococcus aureus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 48, p. 1049-1055, 1998.

MOUSAVI, S. M.; YAGHMAEI, S.; VOSSOUGH, M.; JAFARI, A.; ROOSTAAZAD, R. Zinc extraction from Iranian low-grade complex zinc-lead ore by two native microorganisms: *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Sulfobacillus*. **International Journal of Mineral Processing**, v. 80, p. 238-243, 2006.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MYERS, R. M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 501-527, 1987.

NATARAJAN, K. A. Electrochemical aspects of bioleaching of base-metal sulfides. In: ERLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. (Ed.). **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. v. 2, cap. 3, p. 79-106.

NORRIS, P. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. v. 1, cap. 5, p. 3-27.

NORRIS, P. R. Acidophile diversity in mineral sulfide oxidation. In: RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. (Ed.). **Biomining: theory, microbes and industrial processes**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. v. 1, cap. 10, p. 199-212.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PLUMB, J. J.; McSWEENEY, N. J.; FRANZMANN, P. D. Growth and activity of pure and mixed bioleaching strains on low grade chalcopyrite ore. **Minerals Engineering**, v. 21, p. 93-99, 2008.

RAWLINGS, D. E. Relevance of cell physiology and genetic adaptability of biomining microorganisms to industrial processes. In: RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. (Ed.). **Biomining: theory, microbes and industrial processes**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. v. 1, cap. 9, p. 177-195.

- RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. **Microbiology**, v. 153, p. 315-324, 2007.
- RIBEIRO, J. S. **Cobre**. Departamento Nacional de Produção Mineral, 2008. Disponível em: <[www.dnpm.gov.br/assets/galeriaDocumento/SumarioMineral2007/cobre\\_SM2007.doc](http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriaDocumento/SumarioMineral2007/cobre_SM2007.doc)>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- RIBEIRO, J. S. **Cobre**. Departamento Nacional de Produção Mineral, 2011. Disponível em: <[https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra\\_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=6367](https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=6367)>. Acesso em: 10 abr. 2013.
- RODRIGUEZ, A. Mineração de metais não-ferrosos. In: \_\_\_\_\_. **Economia mineral do brasil-2009**. 7. ed. Brasília, DF: Diretoria de Desenvolvimento e Economia Mineral, 2009. Cap. 4, p. 175-178.
- RODRÍGUEZ, Y.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, F.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J. A. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 37-46, 2003.
- ROSSI, G. Historical background. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Biohydrometallurgy**. New York: McGraw-Hill, 1990. Cap. 1, p. 1-14.
- SAND, W.; GEHRKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry biofilm, and the indirect attack mechanism, a critical evaluation of bacterial leaching. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 961-996, 1995.
- SCHIPPERS, A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: DONATI, E. R.; SAND, W. (Ed.). **Microbial processing of metal sulfides**. Dordrecht: Springer, 2006. v.1, cap. 1, p. 3-33.
- SCHIPPERS, A.; SAND, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p. 319-21, 1999.
- SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* 1: an improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields. **Journal Bacteriology**, v. 77, p. 642-647, 1959.
- STOTT, M. B.; WATLING, H. R.; FRANZMANN, P. D.; SUTTON, D. The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite using bioleaching. **Minerals Engineering**, v. 13, p. 1117-1127, 2000.

TAN, G. L.; SHU, W. S.; HALLBERG, K. B.; LI, F.; LAN, C. Y.; HUANG, L. N. Cultivation dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, p. 118-126, 2007.

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

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison  $^{14}\text{CO}_2$  - fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F. In: \_\_\_\_\_. **Manometric & biochemical techniques**. 5th ed. Minneapolis: Burgess, 1972. v.1, cap. 12, p. 290-305.

VILCÁEZ, J.; SUTO, K.; INOUE, C. Bioleaching of chalcopyrite with thermophiles: temperature-pH-ORP dependence. **International Journal of Mineral Processing**, v. 88, p. 37-44, 2008.

VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. p. 268.

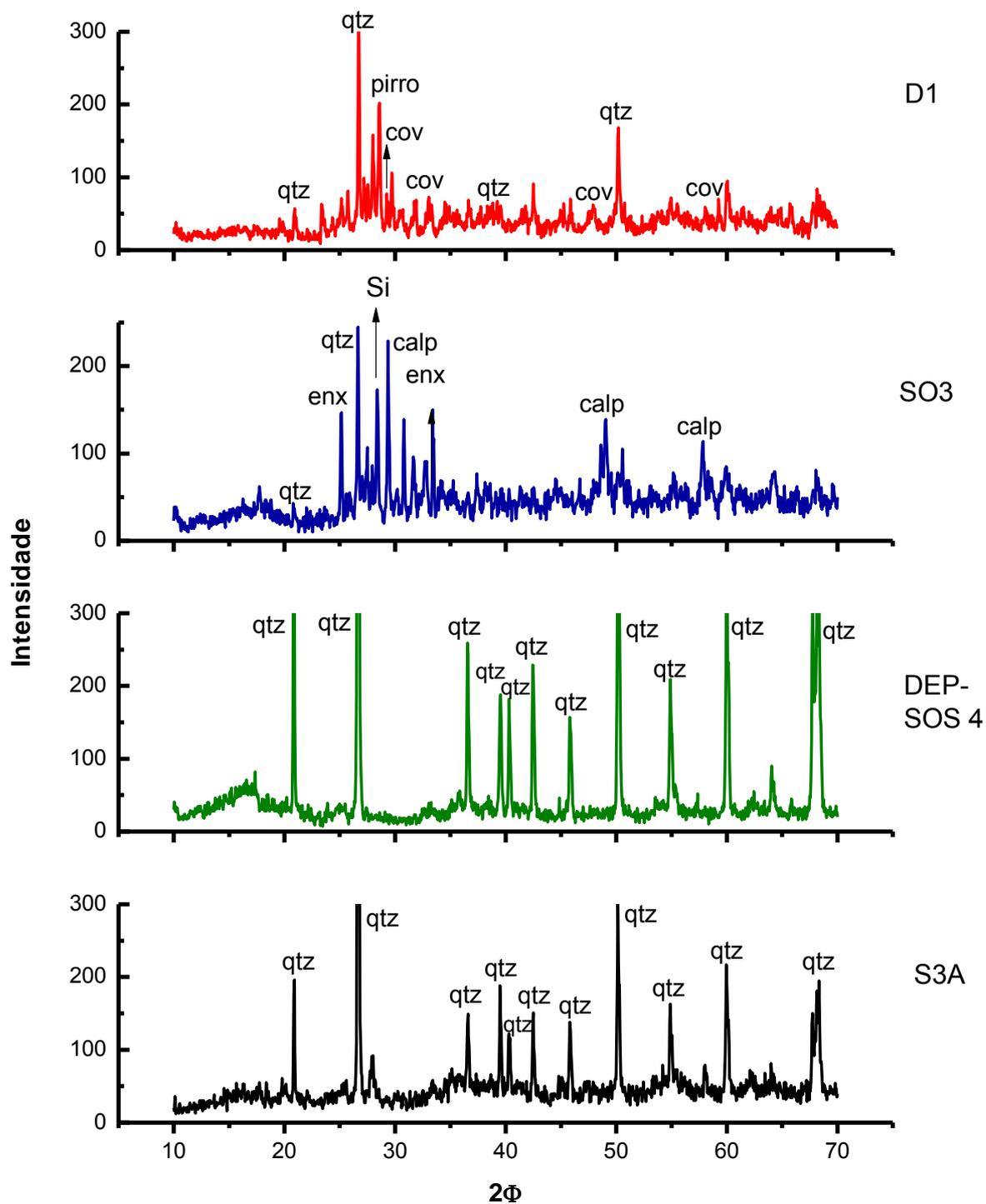
WATLING, H. R. The bioleaching of sulfide minerals with emphasis on copper sulphides - a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, p. 81-108, 2006.

XIA, L.; URIBE, P.; LIU, X.; YU, C.; CHAI, L.; LIU, J.; QIU, W.; QIU, G. Comparison of chalcopyrite bioleaching after different microbial enrichment in shake flasks. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, doi 10.1007/s11274-012-1179-y.

XIAO, S.; XIE, X.; LIU, J. Microbial communities in acid water environments of two mines, China. **Environmental Pollution**, v. 157, p 1045-1050, 2009.

ZHANG, Y. S.; QIN, W. Q.; WANG, J.; ZHEN, S. J.; YANG, C. R.; ZHANG, J. W.; NAI, S. S.; QIU, G. Z. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 18, p. 1491-1496, 2008.

**APÊNDICE A** - Difratoograma de raios X das amostras ambientais. Os símbolos indicam calp – calcopirita, qtz – quartz, enx – enxofre, pirro – pirrotita, cov – covelita e Si – sílica.



Fonte: Próprio autor.