

STELLA MARIS FIRMINO

BIOSSOLUBILIZAÇÃO DA CALCOPIRITA (CuFeS₂) NA PRESENÇA DE ÍONS CLORETO

Dissertação de Mestrado a ser apresentado ao Instituto de Química-Campus de Araraquara da Universidade Estadual – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Araraquara-SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

F525b Firmino, Stella Maris
 Biossolubilização da calcopirita na presença de íons
 cloreto / Stella Maris Firmino. – Araraquara : [s.n], 2013
 114 f. : il.

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

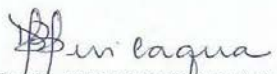
 1. Biotecnologia. 2. Biolixiviação. 3. Micro-organismos.
I. Título.

STELLA MARIS FIRMINO

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

Araraquara, 04 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. DENISE BEVILAQUA (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Dr.^a. FABIANA ALEXANDRINO
Proteobras - Desenvolvimento Biotecnológico / PROTEOBRAS / Paulínia



Prof. Dr. VERSIANE ALBIS LEÃO
Escola de Minas da Universidade Federal de Ouro Preto / UFOP / Ouro Preto.

DADOS CURRICULARES

STELLA MARIS FIRMINO

1. Dados Pessoais

Nascimento: 05 de agosto de 1975

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Carlos-SP

Filiação: Geraldo Antonio Firmino

Antoninha de Lourdes Passador Firmino

Estado civil: solteira

Profissão: Farmacêutica-Bioquímica

Documento de identidade: 25040520-9 SSP/SP

Cadastro de Pessoa Física: 200476998-09

Endereço: Rua Benjamin Constante, 1214, Bairro Bela Vista

CEP: 13574-004, São Carlos-SP

e-mail: stella.maris.f@hotmail.com

2. Formação Acadêmica

Bacharel em Farmácia, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas, MG, concluído em 23 de julho de 1999.

Especialização em Bioquímica, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas, MG, concluído em 24 de julho de 2000.

3. Produção Bibliográfica

3.1 Resumos apresentados em congressos

FIRMINO, S. M.; BEVILAQUA, D. Comportamento de diferentes linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans* na presença de íons cloreto e na biolixiviação da calcopirita. 2012. In: XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM. **Resumos...** Santos 2012.

BRESSAN, J.A. ; FIRMINO, S. M.; BEVILAQUA, D. OXIDAÇÃO DE ÍONS FERROSOS NA PRESENÇA DE CLORETO POR LINHAGENS DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2012. **Resumos...** Araraquara 2012.

FIRMINO, S. M.; BEVILAQUA, D. Biosolubilization of chalcopyrite (CuFeS_2) in the presence of chloride ions. In: QUIMICUBA 2012 Simposio Bioquímica y Biología Molecular, 2012, **Resumos...** Havana. QUÍMICA Cuba 2012, 2012. p. G-O-12.

FIRMINO, S. M.; ROSA, T.; BEVILAQUA, D. Biossolubilização da calcopirita na presença de íons cloreto. In: VII CONGRESSO DO MEIO AMBIENTE DA AUGM, 2012, La Plata. **Resumos...** La Plata. AUGM Argentina, 2012.

4. Participação em eventos

XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia – ALAM, Santos-SP, 2012.

2ª escola Nano Mundo, UFSCAR, São Carlos-SP, 2012.

Congresso Farmacêutico da UNESP-58ª Jornada Farmacêutica (FCFAR UNESP-ARARAQUARA). 2011.

I Workshop on Bioprocess for mining Industry and Environment (IQ UNESP - ARARAQUARA). 2011.

“Eu gostaria de expressar meus agradecimentos a minha orientadora, Dra. Denise Bevilaqua pela sua orientação, incentivo, apoio e ajuda inestimável durante todo este projeto.

Eu também gostaria de agradecer as amigas de laboratório Renata, Íris, Mariana, Ana Laura, Josi, Maurício, Wal e Fabi pela assistência técnica e emocional durante todo nosso tempo de convívio.

Agradeço aos meus colegas por seus comentários, incentivos, alegria e amizade. Eu também gostaria de expressar os meus agradecimentos a Sheila, a Glau e a Josiani por seus irrestritos momentos de descontração e amizade agradável.

Um agradecimento especial a minha mãe Antoninha por seu amor incondicional e apoio. Finalmente, gostaria de agradecer aos meus irmãos em especial minha irmã, Ligia, pela paciência, compreensão e amor. E ao meu irmão Marcel pelo carinho, amor e apoio de pai que sempre me ofereceu. Dedico ainda exclusivamente esse trabalho a meu filho, Victor, que muitas vezes me questionava porque eu só estudava, mas me compreendia e perdoava por eu não lhe dar a devida atenção. Agradeço por toda a compreensão, carinho e apoio em mais essa etapa da minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por tudo. ”

“Amo vocês.”

RESUMO

A recuperação de cobre a partir de calcopirita usando bactérias é o grande desafio da indústria mineradora atualmente. A biohidrometalurgia é um processo de exploração mineral bem estabelecido para a recuperação de cobre, no entanto não existe ainda um processo sendo aplicado comercialmente no mundo para a extração de cobre a partir de mineral calcopirítico. São inúmeras as alternativas que vem sendo estudada para o aumento da recuperação de cobre neste processo, a adição de cloreto é uma destas alternativas. No entanto, uma das limitações é a reconhecida inibição dos organismos acidofilicos em meio contendo cloreto. A principal bactéria envolvida neste processo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta espécie é acidofílica, mesofílica e obtém energia a partir da oxidação de íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos, como por exemplo, calcopirita. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar as linhagens da coleção do laboratório de Biohidrometalurgia na presença de íons cloreto. Para tanto as linhagens foram avaliadas quanto à capacidade de oxidarem Fe^{2+} , enxofre elementar e calcopirita na presença de íons cloreto. Foi observada uma variação grande quanto à cinética de oxidação de íons ferrosos na presença de diferentes concentrações de cloreto. Uma ordem crescente de halotolerância foi proposta: S < SSP < V3 < LR < PCE < ATCC < SJ22 < CMV < PCEL < AMF. Quando enxofre foi utilizado como fonte de energia, todas as linhagens foram inibidas quando a produção de ácido, com exceção da linhagem PCEL. A capacidade de oxidação de calcopirita pelas linhagens também foi verificada através de ensaios respirométricos na presença de íons cloreto. Foi possível estabelecer uma ordem crescente de porcentagem de inibição das linhagens na presença de 50 mmol L^{-1} de cloreto e calcopirita: (AMF \approx LR \approx V3) < ATCC < PCEL < SJ22 < S < SSP < CMV < PCE. Com exceção das linhagens AMF, LR e V3 que não apresentaram inibição por cloreto nas condições de ensaio, as outras linhagens apresentaram relativa porcentagem de inibição na presença de cloreto. A recuperação de cobre, pH, Eh, Fe^{2+} e Fe^{3+} foram monitorados em ensaios de lixiviação em frascos sob agitação em dois ensaios distintos: na presença de 50 mmol L^{-1} e com adições sucessivas de 10 e 20 mmol L^{-1} de íons cloreto. As linhagens apresentaram diferenças quanto à solubilização de cobre na presença e na ausência de íons cloreto. No entanto, essas diferenças não parecem estar relacionadas à tolerância ao cloreto observado nos ensaios precedentes. As diferenças entre as solubilizações de cobre na presença e na ausência de cloreto poderiam ter sido mais significativas se o período de adaptação destas bactérias tivesse sido mais longo.

Palavras-chave: Calcopirita. Íons Cloreto. Biossolubilização.

ABSTRACT

Nowadays, the biggest challenge for mineral companies is recover copper from chalcopyrite. Biohydrometallurgy is a well-established mineral process for copper recovery, however there is no commercial process been applied for copper recovery from chalcopyrite ore. A number of alternatives have been studied; the addition of chloride is one of them. Nevertheless, one of the restrictions is the recognized chloride inhibition of acidophilic organisms. The main bacterium involved in this process is *Acidithiobacillus ferrooxidans*. This specie is acidophilic, mesophilic and obtains energy from oxidation of ferrous ions and reduced sulphur compounds, including metal sulphides, like chalcopyrite. This work studied the strains of Biohydrometallurgy laboratory's collection in the presence of chloride ions. The strains were evaluated for their ability to oxidize ferrous ions, elemental sulphur and chalcopyrite in the presence of chloride ions. It was observed a wide discrepancy in the kinetics of ferrous ions oxidation in the presence of different chloride concentrations. A crescent order of halotolerance was proposed: S < SSP < V3 < LR < PCE < ATCC < SJ22 < CMV < PCEL < AMF. When sulphur was utilized as energy source, all strains were inhibiting regarding acid production, with exception for PCEL strain. The capacity of chalcopyrite oxidation was evaluated in respirometric assays in the presence of chloride ions. It was possible to establish a crescent order of percentage of inhibition in the presence of 50 mmol L⁻¹ of chloride and chalcopyrite: (AMF ≈ LR ≈ V3) < ATCC < PCEL < SJ22 < S < SSP < CMV < PCE. The exception were the strains AMF, LR and V3, the others one presented some degree of inhibition. Copper recovery, pH, Eh, Fe²⁺ and Fe³⁺ were monitored in shake flasks experiments in two different sets: in the presence of 50 mmol L⁻¹ and with successive additions of 10 and 20 mmol L⁻¹ of chloride ions. The strains presented differences about copper solubilization in the presence and absence of chloride ions. However these differences do not seem to be related to different chloride tolerance observed previously. Biosolubilization of copper in the presence or absence of chloride ions could be more significant if the bacterial adaptation had been extended.

Keywords: Chalcopyrite. Chloride ions. Biosolubilization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Acidithibacillus ferrooxidans</i>	16
2.2 Sulfetos minerais- calcopirita	19
2.3 Influência dos íons Cl ⁻	24
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos gerais	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Linhagem bacteriana	30
4.2 Amostra mineral	30
4.3 Meio de cultura	32
4.3.1 Meio T&K	32
4.3.2 Meio 9K	33
4.4 Metodologia analítica	34
4.4.1 Medidas de pH e potencial de óxido-redução	35
4.4.2 Determinação de Fe ²⁺	35
4.4.3 Determinação da acidez nos ensaios de cinética de oxidação enxofre	39
4.4.4 Determinação de cobre e Fe _{total}	39
4.5 Adaptação das células bacterianas	39
4.5.1 Adaptação das linhagens selecionadas ao crescimento em calcopirita na presença de cloreto	40
4.6 Estudo com íons cloreto	41
4.6.1 Ensaio de cinética de oxidação do Fe ²⁺ na presença de cloreto para a seleção de linhagens halotolerantes	41
4.6.2 Ensaios de respirometria na presença de cloreto	41
4.6.3 Ensaios de cinética de oxidação de enxofre na presença de cloreto	42
4.6.4 Ensaios de biolixiviação em frascos agitados	43
4.6.5 Ensaios de biolixiviação da calcopirita com adições sucessivas de íons cloreto (10 mmol L ⁻¹ e 20 mmol L ⁻¹)	43
4.7 Difração de Raios X (DRX)- resíduos sólidos	44

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 Estudos com cloreto	45
5.1.1 Cinética de oxidação dos íons ferrosos	45
5.1.2 Ensaio de respirometria celular na presença de calcopirita e 50 mmol L ⁻¹ de íons cloreto	61
5.1.3 Ensaio da cinética de oxidação do enxofre na presença de cloreto	67
5.1.4 Ensaio de biolixiviação em frascos agitados	69
5.1.5 Ensaio de biolixiviação da calcopirita com adições sucessivas de íons cloreto (10 mmol L ⁻¹ e 20 mmol L ⁻¹)	92
5.2 Análise dos Resíduos sólidos finais dos ensaios de biolixiviação da calcopirita	100
6 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE	113

1 INTRODUÇÃO

A humanidade e a mineralogia estão ligadas há séculos, uma vez que os minerais são fontes essenciais para o desenvolvimento tecnológico. Dentre eles, os metais dos minerais de cobre são de grande interesse comercial devido à utilização em novas tecnologias e materiais. Com o progresso científico de alto nível, as indústrias aumentaram o consumo de cobre nas últimas décadas (ALVARADO et al., 1999; ACEVEDO; GENTINA, 2005).

Cerca de 70% das reservas mundiais de cobre são provenientes da calcopirita (CuFeS_2). As outras fontes provem de outros minerais como a bornita (Cu_5FeS_4), covelita (CuS), calcocita (Cu_2S) (BRANTLEY, 2003; THOMAS, 2009).

O Brasil, devido à sua ampla capacidade de recursos naturais, geológicos e minerais, além da crescente produção de minérios de ferro, dentre outros, tem se mantido entre um dos maiores captadores de investimentos mineralógicos (CIMINELLI et al., 2007).

Com relação ao cobre, o Chile é o maior produtor mundial desse metal, com 34% do total de produção, seguido do Peru, EUA e China. O Brasil é o 15º no ranking de produção. Segundo dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Mineração, a balança comercial para o cobre nos próximos anos é positiva, devido tanto ao aumento na produção interna quanto às exportações, além da diminuição nas importações. O objetivo é que até 2013 o Brasil alcance a condição de autossuficiência na produção de cobre devido ao crescimento contínuo na indústria metalúrgica, principalmente na área de construção civil (projetos governamentais de habitação) e nas indústrias de cabos e fios, devido à realização da Copa do Mundo e dos Jogos Olímpicos no país. O investimento na produção/extração desse metal se torna cada vez mais necessário, mas ainda se investe pouco na pesquisa mineral. Em 2009 e em 2010, apenas cerca de 3% de todo o investimento privado mundial foi investido em pesquisa no Brasil, ficando atrás de países territorialmente bem menores como Peru e Chile (IBRAM, 2011).

Segundo Ribeiro (2011) no sumário mineral 2012 do DNPM (Departamento Nacional de Produção Mineral), a produção de cobre no Brasil correspondeu a 1,3% da produção mundial como podemos observar na Tabela1.

Tabela1. Reserva e produção mundial

Discriminação Países	Reservas ⁽¹⁾ (10 ³ t)	Produção ⁽²⁾ (10 ³ t)		
		2010 ^(r)	2011 ^(p)	(%)
Brasil	11.063	214,0	213,8	1,3
Chile	190.000	5.418,6	5.243,8	32,7
Peru	90.000	1.247,2	1.233,8	7,7
Estados Unidos da América	35.000	1.129,3	1.136,6	7,1
China	30.000	1.156,0	1.299,3	8,1
Austrália	86.000	870,3	957,9	6,0
Outros países	247.937	6.000,6	5.949,8	37,1
TOTAL	690.000	16.036,0	16.035,0	100

Fonte: DNPM\DIPLAM; ICSG; USGS: *Mineral Commodity Summaries - 2012*; Vale; Mineração Caraíba S.A.; BNDES; Mineração Maracá; Votorantim Metais Níquel; Caraíba Metais S.A. Sindicel-ABC. Dados em metal contido: (1) reserva lavrável; (2) concentrado; (r) revisado; (p) preliminar. Disponível em: <https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7382>. Acesso: 12 fev 2013.

Os sulfetos minerais são encontrados na natureza e constituem a principal fonte de metais não ferrosos para o uso industrial, dentre eles: cobre, chumbo, zinco e níquel. A calcopirita é um dos sulfetos mais importante, porque além de ser um dos mais abundantes na natureza é também o mais explorado para extração de cobre. A calcopirita provém de rochas ígneas e metamórficas ou de veios metálicos (McGRAW-HILL, 1998).

O interesse das maiores mineradoras do mundo que exploram cobre é encontrar um processo em que seja possível extrair esse metal dos sulfetos primários (por exemplo, calcopirita) ou de minerais de baixo teor que sejam economicamente viáveis para produção industrial.

Os processos mais utilizados, nas últimas décadas, pela indústria metalúrgica e empregados em todo mundo com a finalidade de se extrair o cobre da calcopirita são a pirometalurgia e hidrometalurgia.

O método mais tradicional é a pirometalurgia: que envolve a aplicação de várias tecnologias, entre elas britagem, moagem, flotação, fundição, refino e eletro-refino. Para que este método seja economicamente viável, ele é aplicado a concentrados minerais, geralmente obtidos por flotação, que possuem altos teores do metal de interesse econômico (BRAVO, 2006).

O segundo método é a hidrometalurgia. Essa técnica consiste na moagem, lixiviação, extração com solvente e eletrólise. O processamento hidrometalúrgico é efetivamente aplicado tanto para óxidos metálicos (CuO, Cu₂O), carbonatos e alguns silicatos, além dos sulfetos minerais como a calcopirita (BRAVO, 2006).

A hidrometalurgia também utiliza concentrados de flotação em seu processo, no qual o sulfeto metálico é dissolvido (lixiviado) numa solução aquosa (BERGH; YIANATOS, 2001). Nesse processo a recuperação dos metais é realizada através do tratamento mineral com soluções ácidas ou básicas, através de tanques estáticos ou agitados, obtendo assim a recuperação dos metais de interesse econômico. Porém este processo também apresenta desvantagens, destacando-se o elevado consumo de reagentes lixivantes, requerimento frequente de altas pressões e temperaturas, além da geração de resíduos sólidos e efluentes aquosos que, em função de sua natureza, composição e disposição, também podem levar a sérios impactos ambientais, através da contaminação dos recursos hídricos da região (BABA et al., 2012).

Dessa forma, se tornam necessários desenvolvimentos de métodos alternativos para o tratamento de minérios, especialmente para aquele que contem baixos teores do metal de interesse. A biohidrometalurgia surge como uma alternativa econômica para o processamento metalúrgico desses minerais (NDLOVU, 2008).

Essa técnica tornou-se apropriada aos olhos dos técnicos e empresários do setor da indústria metalúrgica, devido aos avanços biotecnológicos. O aperfeiçoamento e a ampliação dos estudos nesta tecnologia fez com que a lixiviação bacteriana se tornasse uma alternativa industrial promissora para recuperação de metais a partir de sulfetos minerais de baixo teor e de ocorrências polimetálicas. Ultimamente a indústria de mineração tem se deparado com diversos problemas tais como: aumento dos custos para a extração de metais, preços baixos e instáveis no mercado internacional, a crescente preocupação com o impacto ambiental das atividades mineradoras. Essa

situação é agravada pelo progressivo esgotamento das reservas minerais com altos teores, afetando ainda mais os custos do processo. Dessa forma a indústria tem concentrado esforços no sentido de obter novas tecnologias que possam reduzir custos e se adequar às leis governamentais quanto à emissão de gases liberados na atmosfera, é o que se tem explorado com a biohidrometalurgia (GAHAN et al., 2012).

A lixiviação bacteriana é uma técnica interessante sob os pontos de vista econômico e ambiental, visto que apresenta algumas vantagens frente aos processos convencionais, como: economia de insumos utilizados em um processo hidrometalúrgico convencional (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos a partir de substratos presentes no sulfeto mineral; baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico, e mesmo a um processo hidrometalúrgico em que se utilizam agitadores. Além disso, necessita de baixo investimento de capital inicial, baixo custo operacional e reduzida mão de obra especializada. Esta técnica utiliza rejeitos minerais (minérios de teores reduzidos) e ocorrências minerais complexas, podendo ser uma alternativa para o aproveitamento de jazidas de pequeno porte (GARCIA JUNIOR; URENHA, 2001).

As principais aplicações comerciais da lixiviação bacteriana concentram-se no processamento de sulfetos minerais para extração de metais. Em escala industrial esses minérios levam a recuperação de cobre, urânio, níquel e ouro. Conforme o Plano Nacional de Mineração 2030 (BRASIL, 2012), vários países estão aplicando esta técnica, destacando-se os países produtores de cobre, dentre eles o Chile, EUA, Indonésia, Austrália, Peru e Rússia.

As pesquisas na área de biolixiviação da calcopirita convergem no sentido de entender os mecanismos deste processo, destacando-se problemas como a precipitação de jarosita e a formação da camada de passivação, que segundo alguns autores (WATLING, 2006; CÓRDOBA et al., 2008c) inibem a recuperação de cobre e a lixiviação da calcopirita por métodos biológicos. Hoje, os cientistas são capazes de entender vários desses mecanismos que envolvem a biolixiviação, mas ainda há muitos aspectos a serem compreendidos que passam primeiro por estudos em escala de bancada, até operações em grande escala, com a otimização dos processos e eventual aplicação em escala industrial.

O futuro da biolixiviação é um desafio, porque além de oferecer as vantagens já assinaladas e ser mais aceito ambientalmente, essa técnica apresenta vários mecanismos envolvidos não esclarecidos até o momento.

A biolixiviação hoje não é mais uma tecnologia promissora, mas uma alternativa econômica real para o tratamento de minérios com minerais específicos. No entanto, viabilizar micro-organismos que se adaptem e que demonstrem melhor desempenho nesse processo ainda é uma constante busca pelos estudiosos para que no futuro possam ser empregados comercialmente (ACEVEDO, 2002).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Os principais micro-organismos envolvidos no processo são espécies quimiolitotróficas e acidofílicas do gênero *Acidithiobacillus*, sobretudo o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma bactéria quimioautotrófica que obtém energia para seu crescimento através da oxidação do íon Fe^{2+} , além das formas reduzidas de enxofre e sulfetos metálicos insolúveis (BEVILAQUA, 2003).

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* é presente nos processos de biolixiviação e caracterizam-se por sua capacidade de evoluir em condições agressivas como baixos níveis de pH; por serem acidófilos estritos tem o pH ótimo de crescimento situado em torno de 2,0 (ocorrendo, porém, numa faixa entre 1,5 e 4,5), e quanto a temperatura, algumas linhagens foram isoladas com crescimento entre 2 °C e 37 °C. Os micro-organismos isolados dos minérios geralmente são separados em três grupos de acordo com sua temperatura ótima de crescimento: mesófilos (até aproximadamente 40°C), termófilos moderados (entre 40°C e 55°C), e termófilos extremos (a partir de 55°C até 80°C) (SCHIPPERS, 2007).

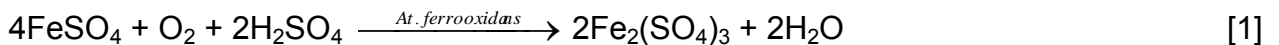
Esses micro-organismos do gênero *Acidithiobacillus* são obrigatoriamente quimiolitotrófico, pois utilizam como fonte de energia para seu crescimento substratos estritamente inorgânicos, necessitando basicamente, além da fonte energética (Fe^{2+} ou formas reduzidas de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos), suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (GARCIA; URENHA, 2001). Essa espécie obtém seu carbono celular pela fixação de gás carbônico.

Em condições aeróbias, essas bactérias utilizam como doadores de elétrons íons ferrosos e compostos de enxofre que são oxidados a íons férrico e ácido sulfúrico, respectivamente. Em condições anaeróbias são capazes de crescer e utilizam o íon férrico comoceptor final de elétrons, substituindo o oxigênio. Esta via produz menos energia do que em condições aeróbicas, mas a energia ainda é suficiente para produzir o crescimento bacteriano (SUGIO et al., 1992; LEDUC; FERRONI, 1994; HEDRICH et al., 2011). Foi estudada a capacidade de *At. ferrooxidans* em oxidar diferentes sulfetos metálicos como arsenopirita (FeAsS), bornita (Cu_5FeS_4), calcocita (Cu_2S), calcopirita

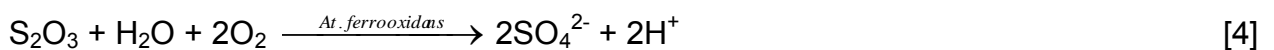
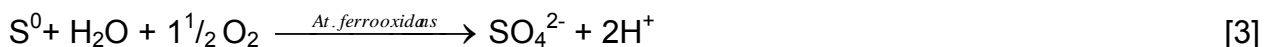
(CuFeS₂), esfarelita (ZnS), galena (PbS), pirita (FeS₂), além de outros, por isso a importância de utilizá-la nos processos mineralógicos, como na lixiviação bacteriana (BEVILAQUA, 2003; SCHIPPERS, 2007).

Entre as características do *At. ferrooxidans* que os tornam interessantes no desenvolvimento de processos industriais em atividades hidrometalúrgicas, destaca-se: crescimento em condições ambientais extremas; e significativa resistência a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos o que confere a esses microorganismos uma característica fisiológica marcante, que é a capacidade de resistir às concentrações de metais como Cu²⁺ (10 g L⁻¹), Cr³⁺ (0,4 g L⁻¹), Cd²⁺ (10 g L⁻¹), Zn²⁺ (40 g L⁻¹) e Ni²⁺ (15 g L⁻¹) (CABRERA et al., 2005).

O *At. ferrooxidans* é provavelmente condicionado por um sistema genético altamente especializado; capaz de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao metabolismo oxidativo no qual produz eficientes agentes de lixiviação ácida (BEVILAQUA; GARCIA JUNIOR, 2008). Como já salientado, em condições ácidas e aeróbias essa bactéria oxida os íons ferrosos equação [1]:

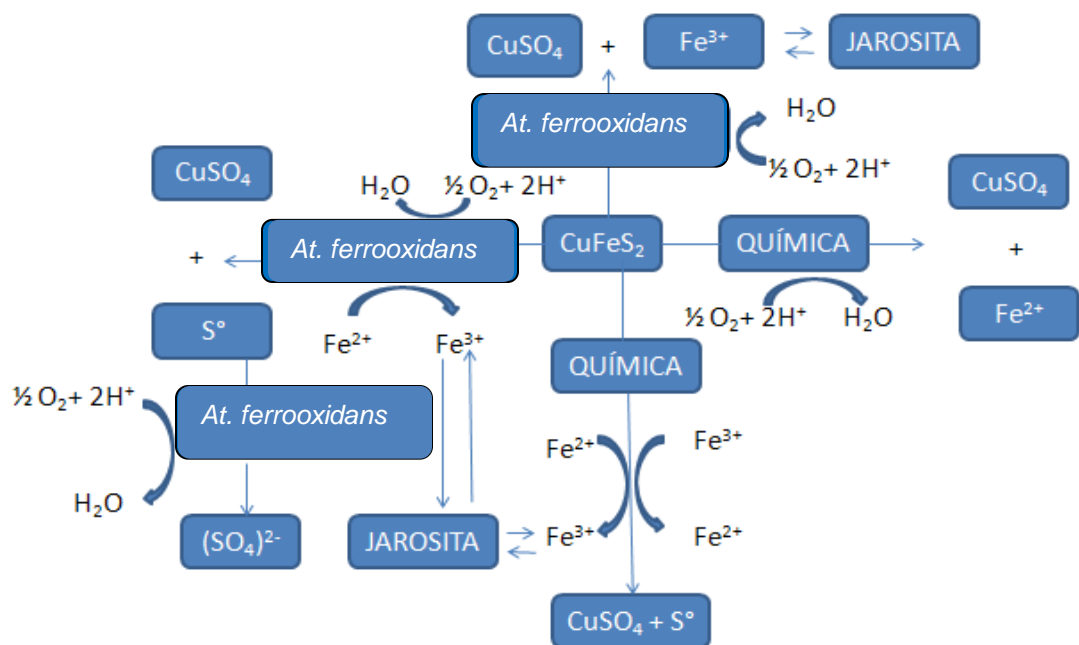


As equações 2, 3 e 4 apresentadas a seguir demonstram as reações de oxidação biológica dessas espécies quando utilizam os compostos reduzidos de enxofre como fonte energética para o crescimento bacteriano nas formas de H₂S, S⁰ e S₂O₃²⁻:



Bevilaqua e Garcia Junior (2005) propuseram um modelo dos possíveis mecanismos envolvendo *At. ferrooxidans* e o sulfeto mineral (calcopirita) representado na Figura 1.

Figura 1. Modelo dos possíveis mecanismos (direto e indireto) involuntários na dissolução química e biológica da calcopirita

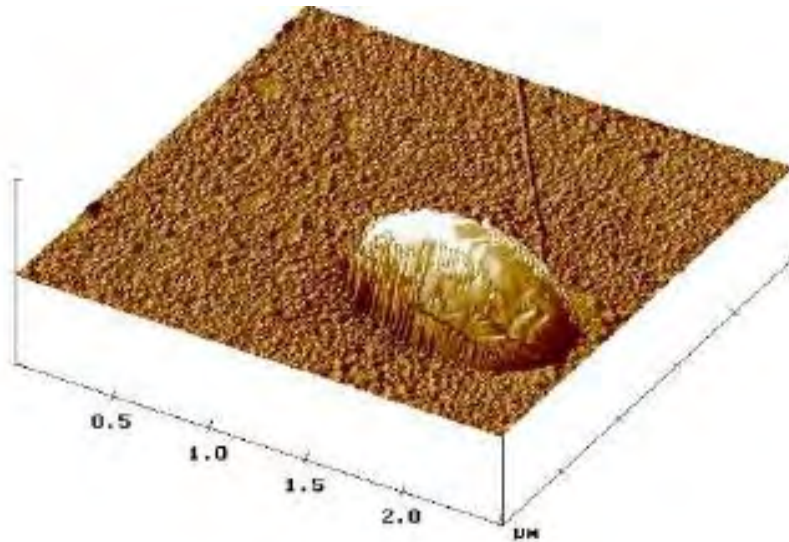


Fonte: BEVILAQUA; GARCIA JUNIOR, (2005).

Os elétrons transferidos das reações de oxidação dos íons ferrosos, das formas reduzidas de enxofre, e de outros substratos inorgânicos, através da cadeia respiratória, liberam energia necessária para que ocorra a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) e como consequência a produção do trifosfato de adenosina (ATP) (BEVILAQUA; GARCIA JUNIOR, 2008).

Na figura 2, abaixo está representado o *At. ferrooxidans* aderido a grafite, imagem obtida por AFM.

Figura 2: Imagem de *At. ferrooxidans* aderido sobre grafite, obtida por AFM.



Fonte: BEVILAQUA, (2003).

2.2 Sulfetos minerais - calcopirita

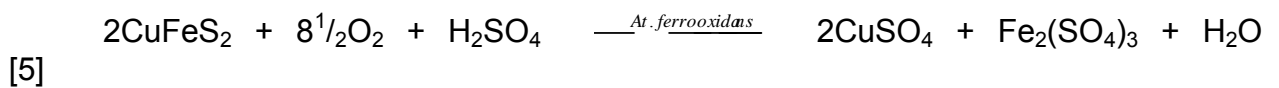
A calcopirita é o mais abundante mineral de cobre encontrado na natureza. A fórmula química da calcopirita é CuFeS_2 (Figura 3), porém uma representação mais adequada seria $\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{Fe}_2\text{S}_3$, destacando desta maneira, que o cobre neste mineral está principalmente no estado cuproso enquanto o ferro está predominantemente em seu estado férrico (HABASHI, 1978).

Figura 3. Calcopirita.

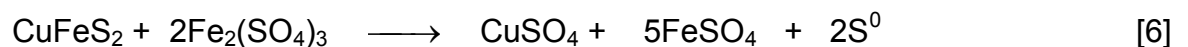


Fonte: © www.johnbetts-fineminerals.com – All Rights Reserved. Disponível em: <<http://www.minerals.net/mineral/chalcopyrite.aspx>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

A dissolução desse mineral ocorre numa primeira etapa, por ataque bacteriano, conforme a equação 5 descrita abaixo (BEVILAQUA; GARCIA, 2005):

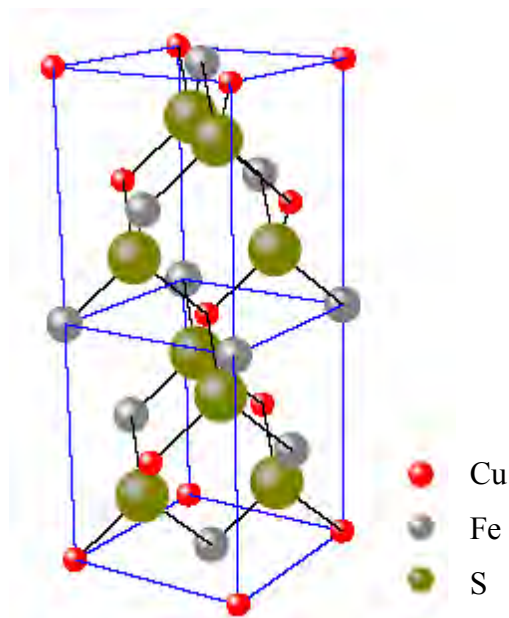


Um ataque químico (equação 6) também ocorre, pois o sulfato de ferro (III) que se forma inicialmente oxida diretamente a própria calcopirita, solubilizando mais cobre e produzindo Fe^{2+} e enxofre elementar, os quais também são oxidados pela bactéria produzindo Fe^{3+} e ácido sulfúrico (equação 1 e 3) (BEVILAQUA; GARCIA, 2005).



A estrutura cristalina da calcopirita é tetragonal (Figura 4). Em cada metade da célula unitária da calcopirita, um átomo de enxofre está rodeado por dois átomos de cobre e dois átomos de ferro, de forma que cobre e ferro ocupam posições alternadas em relação ao eixo z. Cada átomo metálico está coordenado por um tetraedro de átomos de enxofre (HABASHI, 1978).

Figura 4: Estrutura cristalina calcopirita.



Fonte: Adaptada pelo próprio autor. Disponível em:

<http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000000561/03_chapter01.pdf?hosts=>. Acesso em: 20 fev. 2013.

Embora a calcopirita esteja classificada como um mineral solúvel em meio ácido, ela é bastante refratária tanto ao ataque químico quanto bacteriano. Este caráter é em parte justificado pela alta energia de rede da calcopirita quando comparada com outros sulfetos minerais como demonstrado na Tabela 2 (HABASHI, 1978).

Tabela 2. Energia de rede da calcopirita comparada a outros sulfetos minerais.

Sulfeto	Energia de rede (KJ)
CuFeS ₂ (calcopirita)	17500
FeS ₂ (pirita)	4260
CuS(covelita)	3785
HgS(cinábrio)	3525
PbS(galena)	3065
Cu ₂ S(calcocita)	2935

Fonte: HABASHI, (1978).

Na tentativa de otimizar a taxa de dissolução da calcopirita, estudos com a adição de íons cloreto à solução lixiviante tem sido realizados por acreditar-se que tais íons possam romper essa camada bloqueadora superficial, tornando o minério mais poroso e susceptível a uma corrosão mais acelerada (LU et al., 2000a,b; LIDDICOAT, 2007; YOO et al., 2010; BEVILAQUA et al., 2013). Adicionalmente, têm-se procurado maneiras para diminuir a formação da jarosita com o intuito de obter uma maior porcentagem de extração do cobre (DAOUD, 2006). De acordo com esse estudo o bloqueio parcial da calcopirita pode estar relacionado com a precipitação de jarosita. Isso ocorre devido à formação de alguns produtos sólidos que também interferem na cinética de oxidação dos sulfetos minerais são os precipitados de íons férricos, chamados de jarositas. As jarositas $[XFe_3(SO_4)_2(OH)_6]$ são compostos formados pela precipitação do íon férrico em meios contendo sulfato, onde X pode ser K^+ , Na^+ , NH_4^+ , H_3O^+ , os quais são comumente encontrados durante processos de lixiviação bacteriana de sulfetos minerais contendo ferro (AHONEN; TUOVINEN, 1992). São produtos comuns da fase sólida em processos de lixiviação, além do enxofre elementar.

O enxofre elementar, assim como os polissulfetos e os hidróxidos ou óxidos hidratados de ferro são mencionados como possíveis produtos sólidos de lixiviação que poderiam constituir a camada passiva formada sobre a calcopirita (STOTT, 2000). Esta camada passiva e as condições nas quais ela foi formada têm sido bastante investigadas, porém a natureza dela ainda não foi totalmente esclarecida (THIRD et al., 2000).

Bevilaqua et al. (2004) demonstraram através de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) a formação de uma camada passivadora na superfície do eletrodo de calcopirita, observada após 71 horas. Essa camada de adsorção formada de células, biomoléculas e enxofre aparecem sobre a superfície mineral e dificulta a difusão de moléculas e íons para a superfície do eletrodo.

A taxa de lixiviação da calcopirita depende do potencial de óxido redução determinado pela razão entre as concentrações dos íons Fe^{3+} (oxidantes) e Fe^{2+} (redutores), em solução (HIROYOSHI et al., 2000; BEVILAQUA et al., 2002)

Cordoba et al. (2008 a,b) concluíram que quando a solução de lixiviação contém sulfato ferroso/férrico ocorre um equilíbrio desses íons no meio o que proporciona um potencial crítico em torno de 650 mV (SHE). Assim à medida que se aumenta o potencial redox inicial desse meio, ocorre um equilíbrio no sistema fazendo com que se favoreça a precipitação de íons férricos na forma de jarosita, no qual acabam passivando a calcopirita.

Foi observado por Carranza et al. (1990) e García et al. (1989) que em meios com valores de pH inferiores a 1,8 são eficazes por limitarem a formação de precipitados de íon férrico.

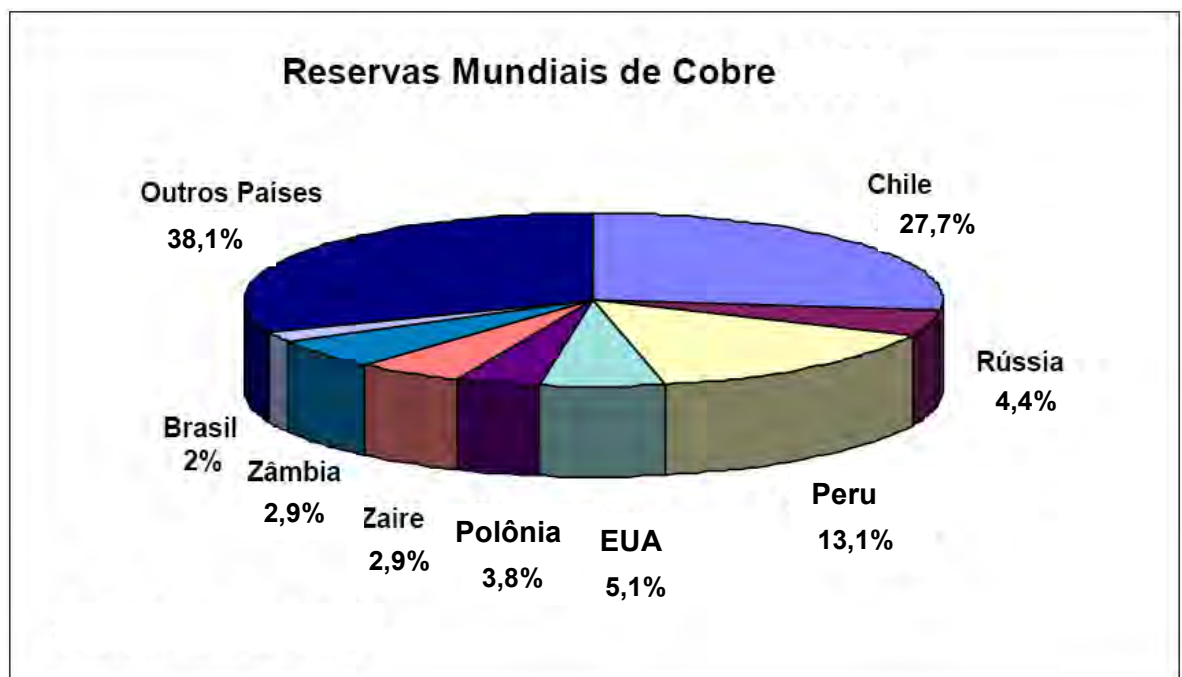
Mousavi et al. (2005) utilizando biorreatores aerados com reciclagem de fluxo avaliaram diversos parâmetros. A temperatura e a densidade de polpa foram os parâmetros que mais afetaram a recuperação de cobre. A máxima recuperação de cobre foi obtida utilizando bactérias termofílicas (85%) e mesofílicas (70%) com 10% de densidade de polpa.

Muitos dos países em desenvolvimento apresentam significativas reservas minerais e a mineração tornou-se umas das principais fontes de renda. O processo aplicado nestes países é simples e com baixo investimento de capital. Como exemplos podem citar Chile, Indonésia, México, Peru e Zâmbia, os quais representam juntos mais de 50% da produção de cobre no mundo (ACEVEDO et al., 1993).

Na figura 5, estão indicadas as principais reservas mundiais de cobre na forma de sulfeto mineral, de minério oxidado ou em ocorrências mistas, com presença de sulfetos, óxidos, hidróxidos e carbonatos (ROCIO et al., 2011). Dessas reservas, cerca de 80% são de minério sulfetado, e normalmente, são reservas de grande significado

econômico pelo volume de minério, podendo ser lavradas a céu aberto e apresentando baixo teor de cobre, até 1,5%, visto que este se encontra disseminado em rochas. As reservas mundiais de alto teor encontram-se esgotadas, sendo que as mais ricas atualmente apresentam teores de cerca de 4% de cobre (ANDRADE et al., 1996).

Figura 5. Reserva de cobre mundial 2011



Fonte: Adaptada pelo próprio autor. Disponível em: <http://www.bndespar.com.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3611.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2013.

2.3 Influência dos íons Cl^-

Algumas substâncias têm sido investigadas para melhorar a dissolução da calcopirita, entre elas os íons cloreto (CÓRDOBA et al., 2009). Os estudos que envolvem esses íons, juntamente com bactérias, avaliam a influência destes na atividade bacteriana, porém estudos tem demonstrado que os íons cloreto conseguem

ao mesmo tempo otimizar a dissolução da calcopirita, mas podem levar à inibição do metabolismo bacteriano.

Segundo Carneiro e Leão (2007) a melhoria na cinética de lixiviação da calcopirita na presença de cloreto está relacionada com os seguintes fatores:

- formação de complexos com cloreto e cobre,
- aumento da corrente anódica durante a lixiviação da calcopirita,
- mudanças na forma da superfície e propriedades dos produtos da reação.

Carneiro e Leão (2005) estudaram o aumento na velocidade de dissolução da calcopirita, que estão relacionados com a formação do complexo solúvel CuCl_2 , representado esquematicamente pela equação 7:



O cloreto pode atuar tanto sobre a camada de enxofre elementar, como também sobre a solubilidade dos complexos de cobre formados no sistema. De acordo com Winand (1991) ocorre a formação de complexos entre íons cloreto e cobre que aumentam a taxa de lixiviação melhorando a solubilização de cobre quando o íon cloreto esta presente no meio de lixívia. A formação desses complexos é dependente da concentração desses íons em solução. Desse modo, demonstrou-se que em altas concentrações de íons Cl^- há formação predominante de CuCl_3^- e CuCl_4^{2-} , e na presença de íons Cu^+ , os complexos CuCl_4^{3-} ou $\text{Cu}_2\text{Cl}_4^{2-}$. Enquanto os complexos CuCl_2^- , CuCl_3^{2-} , CuCl_4^{3-} podem ser formados em baixas concentrações de íons Cu^+ com íons Cl^- .

Yoo et al. (2010) também demonstraram o efeito do cloreto na lixiviação da calcopirita, utilizando um reator magnético e diferentes tipos de soluções lixiviantes (0,1 mol L^{-1} de solução HCl; 0,1 mol L^{-1} de solução de H_2SO_4 e uma mistura (1:1) de 0,1 mol L^{-1} de HCl e H_2SO_4), essas foram testadas seguindo o modelo de Hiroyoshi, (Hiroyoshi et al. (2007)), no qual sugere uma zona rápida de lixiviação entre o potencial crítico (E_c) e o potencial de oxidação (E_{ox}). Segundo os autores o E_c é o potencial de equilíbrio na redução da CuFeS_2 para Cu_2S e E_{ox} é o potencial de equilíbrio para a oxidação de Cu_2S , isso ocorre em potenciais entre E_c e E_{ox} , na qual a calcopirita é reduzida a

calcocita e, em seguida, lixiviada a íons cúpricos, ao mesmo tempo. Os resultados obtidos mostraram que a presença de 100 mmol L^{-1} de íons cloreto aumentaram significativamente a cinética de lixiviação da calcopirita devido à elevação do E_c causado pela formação de complexos entre íons clorocuprato (I) (CuCl^+) no sistema. A formação dessas espécies de cobre aparece na forma de íons cúpricos e cobre metálico em baixas concentrações de cloreto. No entanto, como o aumento da concentração de Cl^- , espécies de íons cuprosos são formados como CuCl^- , CuCl_2^- , CuCl_3^{2-} , e CuCl_4^{3-} , além de formar CuCl^+ e CuCl_2 . O potencial na formação desses íons varia de 410-445 mV (SHE) e o potencial crítico fica em torno de 600 mV (SHE). Os resultados foram obtidos sob condições restritas como: concentração de Cu total e potencial de óxido-redução constante, mostrando que o potencial crítico das espécies de íons cuprosos é maior do que o das espécies de íons cúpricos, em alta concentração de cloreto, levando a uma melhora na taxa de lixiviação da calcopirita.

Nicol et al. (2010) avaliaram a lixiviação de diferentes concentrados de calcopirita na presença de íons cloreto controlando a temperatura, o potencial crítico, entre 550 e 600 mV (SHE), e o oxigênio dissolvido. Os estudos mineralógicos dos resíduos da lixiviação evidenciaram a formação de covelita (CuS), a potenciais inferiores ao potencial crítico.

A introdução de cloreto em processos de mineração pode ser descrito por três maneiras: com dissolução direta em ganga; com adição de água salina e por adição de íons cloreto no meio lixiviante para aumentar a taxa de dissolução (ZAMMIT et al., 2009).

Lu (1982) avaliou o efeito dos íons cloreto na dissolução do mineral em meio ácido e oxigenado, e concluiu que a presença do cloreto de sódio (NaCl) na solução de lixivia promovia a formação de uma camada porosa de enxofre, na qual favorecia a difusão dos reagentes lixiviantes através dessa camada melhorando a reação de oxidação na superfície do mineral.

Recentemente Liang et al. (2012) demonstraram que a biolixiviação na presença de íons cloreto acelera a dissolução da calcopirita reduzindo a camada de enxofre elementar superficial de 25,4% para 3%, além de melhorar a solubilização de cobre passando de uma concentração de $2,37 \text{ g L}^{-1}$ a $2,67 \text{ g L}^{-1}$. Essa influência de cloreto

numa concentração de $11,3 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre a dissolução da calcopirita e da superfície de especiação do enxofre durante a biolixiviação com *Acidianus manzaensis* YN-25, termófilo extremo, foram avaliadas empregando-se técnicas como: a de estrutura fina da absorção de raios-X próxima à borda do enxofre (XANES), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e difração de raios-X (DRX).

Ruiz et al (2011) demonstraram em resultados experimentais que a lixiviação da calcopirita em meios $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-NaCl}$ na presença de oxigênio, é mais rápida, quando comparada a lixiviação sem cloreto, isto ocorre porque existe uma relação entre a temperatura e a cinética de oxidação. Utilizando-se uma energia de ativação de $91,2 \text{ kJ/mol}$, $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$ e uma temperatura entre $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e $100 \text{ }^\circ\text{C}$, houve uma melhor dissolução de cobre a 100°C chegando a 90% de recuperação destes íons.

As elevadas concentrações de íons cloreto inibem o crescimento de microrganismos acidófilos utilizados na Biomineração. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos que essas bactérias adotam para tolerar altas concentrações desses íons. A alteração provocada pelo cloreto em espécies bacterianas quando cultivadas na presença ou na ausência desse íon Cl^- foram avaliados por Zammit et al., (2012). Os proteomas de acidófilos gram-positivos *Acidimicrobium ferrooxidans* e do gram-negativo *Acidithiobacillus caldus* cultivados na presença ou na ausência de íons cloreto foram investigados. Esses micro-organismos acidófilos adotaram diversas mudanças em seus proteomas sugerindo diferentes estratégias para combater o stress osmótico, desde adaptação da membrana celular, acúmulo de aminoácidos como uma forma osmoprotetora, e a expressão de uma proteína da família Ycel envolvida no stress ácido e osmótico.

Em estudos respirométricos na presença de íons cloreto utilizando células crescidas em diferentes fontes de energia, íons ferrosos ou enxofre, as bactérias apresentaram diferenças na sensibilidade aos íons cloreto (HARACUC et al., 2000). As células crescidas em ferro apresentaram maior sensibilidade a presença dos íons cloreto.

Segundo Kinnunen e Puhakka (2004) a presença de íons cloreto ao meio de lixívia pode levar a uma diminuição do potencial redox em torno de 60 mV (Ag/AgCl), isso se deve a formação de compostos de enxofre parcialmente oxidados que se

acumulam na forma de tiosulfato e politionato solúveis, evitando a precipitação do enxofre na forma elementar, diminuindo com isso a passivação causada pelo enxofre sobre a superfície mineral.

A utilização dos íons cloreto em processos biohidrometalúrgicos apresenta grande relevância em locais onde há escassez de água, como por exemplo, as minas de biolixiviação no oeste da Austrália e as minas Chilenas. No entanto, é sabido da grande sensibilidade dos organismos acidofílicos nestas condições.

A seleção e obtenção de linhagens acidofílicas mais halotolerantes torna-se uma alternativa interessante no sentido de aumentar a biosolubilização de cobre dos sulfetos minerais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da adição de íons cloreto na biolixiviação da calcopirita, utilizando distintas linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (AMF, SSP, S, PCE, PCEL, LR, SJ22, V3, CMV e ATCC 23270).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de oxidação dos íons ferrosos em diferentes concentrações de íons cloreto para todas as linhagens acima.
- Avaliar a cinética de produção de ácidos em diferentes concentrações de íons cloreto para todas as linhagens acima.
- Estudar o consumo de oxigênio na presença de diferentes concentrações de íons cloreto, através de ensaios respirométricos.
- Através de ensaios em frascos sob agitação verificar diferenças entre as linhagens na oxidação da calcopirita na presença de íons cloretos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem bacteriana

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram previamente selecionadas do banco da coleção do Grupo de Biohidrometalurgia do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química (UNESP, Araraquara). As linhagens avaliadas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Linhagens bacterianas de *At. ferrooxidans* e suas origens

Linhagem	Origem
*AMF	Mina de carvão de Figueira da Companhia Carbonífera, Cambuí-PR *
*CMV	Efluente de mina de ouro da Companhia, Morro Velho-MG
*LR	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Lagoa Real-BA *
*PCE	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Poços de Caldas-MG *
*PCEL	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Poços de Caldas-MG *
S	Mina de cobre de Surubim, Caraíba-BA
*SJ22	Pirita, mina Cae Coch, Trefriw, Wales (EUA, cedida por B. Jonson)
SSP	Efluente de mina de carvão de Siderópolis-SC
*V3	Mina de cobre de Sofia, Bulgária (cedida por S. Groudev)
ATCC (23270)	Linhagem <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Temple and Colmer) (Kelly and Wood) deposited as <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> (Leathen and Braley)

Fonte: GARCIA JUNIOR, (1991).

*Linhagens isoladas por O. Garcia Jr.

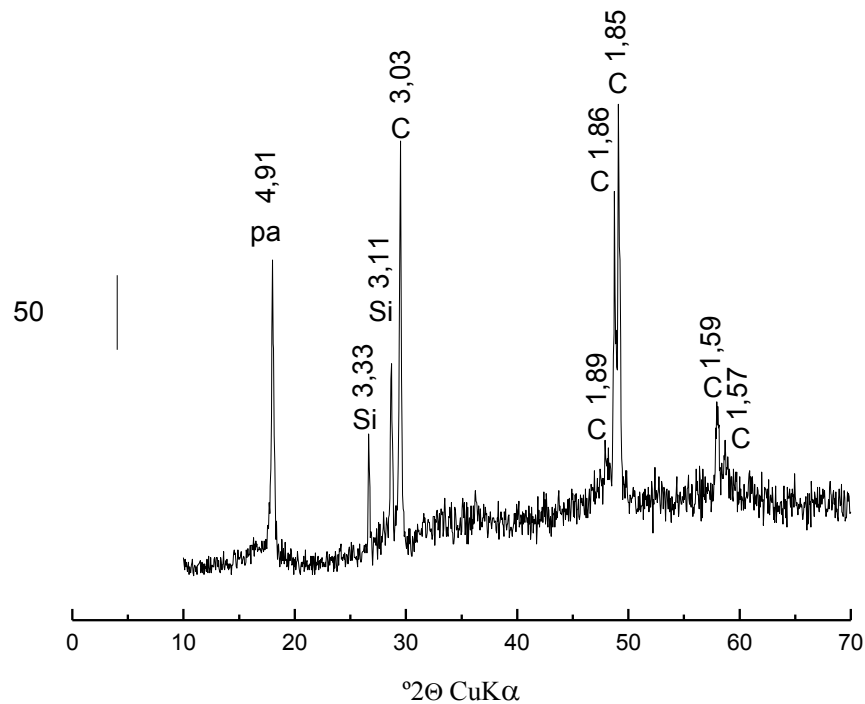
As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio T&K modificado (TUOVINEN; KELLY, 1973) e incubadas a 30°C e 150 rpm em mesa agitadora (New Brunswick Scientific). Após crescimento bacteriano, as culturas foram mantidas em geladeira e repicadas a cada dois meses, para manter as culturas frescas. Nos ensaios realizados o inóculo de bactérias foi padronizado em 10^8 células, através de contagem em microscopia eletrônica.

4.2 Amostra mineral

A amostra mineral de calcopirita (CuFeS_2) foi fornecida pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Sobral do Centro de Tecnologia Mineral do Rio de Janeiro (CETEM/RJ). Para a execução dos ensaios a amostra analisada possuía uma granulometria igual ou menor que 325 mesh.

Esta amostra foi caracterizada por difração de raios X em um equipamento Bruker-D4 Endeavor, nas seguintes condições de operação: radiação Co K α (35 kV/40 mA); velocidade do goniômetro de 0,020 2 θ por passo com tempo de contagem de 1 segundo por passo e coletados de 4 a 80° 2 θ que corresponde à análise semi-quantitativa das espécies mineralógicas presentes na amostra de concentrado de flotação. O difratograma da amostra está apresentado na Figura 6.

Figura 6: Difratograma do concentrado de flotação de calcopirita. Os símbolos indicam C- calcopirita, Si-Sílica e pa-porta amostra.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

De acordo com o difratograma mostrado na Figura 6, e pela Tabela 4, verificou-se que o principal constituinte mineralógico da amostra era a calcopirita (CuFeS₂) e em menores porcentagens, coesita (SiO₂).

Tabela 4. Composição química dos elementos constituintes do concentrado de flotação realizado no CETEM/RJ, e utilizado nos ensaios de biolixiviação.

Espécie química	Teor (%m/m)
Al₂O₃	2,58
CaO	0,90
CuO	25,50
Fe₂O₃	15,90
NiO	0,12
SiO₂	15,00
SO₃	26,47

Fonte: CETEM/RJ

4.3 Meio de cultura

4.3.1 Meio T&K

Para manutenção periódica da linhagem bacteriana nos experimentos de crescimento e obtenção de inóculo para os experimentos de biolixiviação da calcopirita, utilizou-se o meio de cultura T&K modificado (TUOVINEN; KELLY, 1973). A composição e o modo de preparo estão descritos a seguir:

A. Reagentes

Solução A:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
pH (H ₂ SO ₄ concentrado).....	1,8
água destilada qsp.....	800 mL

Solução B:

FeSO ₄ .7H ₂ O	33,3 g
--	--------

pH (H₂SO₄ concentrado).....1,8
 água destilada qsp..... 200 mL

B. Procedimento

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

As linhagens bacterianas de *At. ferrooxidans*: AMF, CMV, PCE, S, SJ22, PCEL, V3, ATCC, LR e SSP foram inoculadas em meio líquido contendo T&K completo, utilizando íons Fe²⁺ como fonte de energia. O pH foi corrigido para 1,8. O volume de ensaio foi de 200 ml com 5% de inóculo, sendo o crescimento realizado a 30°C e 150 rpm em mesa agitadora (*New Brunswick Scientific*). Após crescimento bacteriano, as culturas foram mantidas em geladeira e repicadas a cada dois meses, para manter a cultura pura e fresca.

4.3.2 Meio 9K

Para a realização de experimentos com as linhagens selecionadas de *At. ferrooxidans* em meio contendo enxofre como fonte energética, utilizou-se o meio de cultivo 9K (SILVERMAN; LUDGREN, 1959). O meio 9K é composto da seguinte maneira:

Reagentes

(NH₄)₂SO₄3,0 g

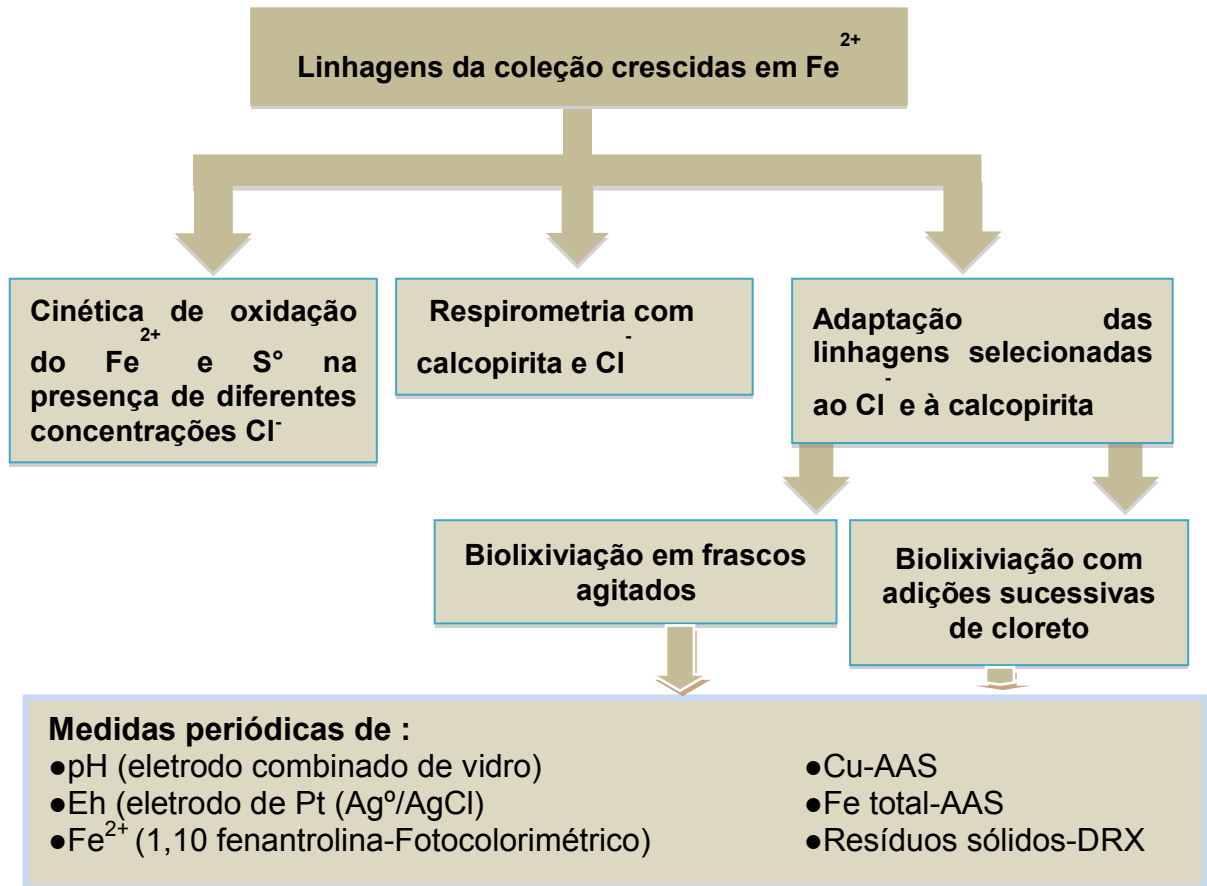
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl.....	0,1 g
pH (H ₂ SO ₄ concentrado).....	2,8
água destilada qsp.....	1000 mL
S ⁰	1%

O enxofre foi esterilizado separadamente da solução, em autoclave a 110 °C por uma hora. A solução foi preparada e esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos. O enxofre foi adicionado à solução no momento do uso.

4.4 Metodologia analítica

O procedimento das metodologias aplicadas nos ensaios está representado no fluxograma da Figura 7:

Figura 7. Representação geral de todos os ensaios realizados no trabalho.



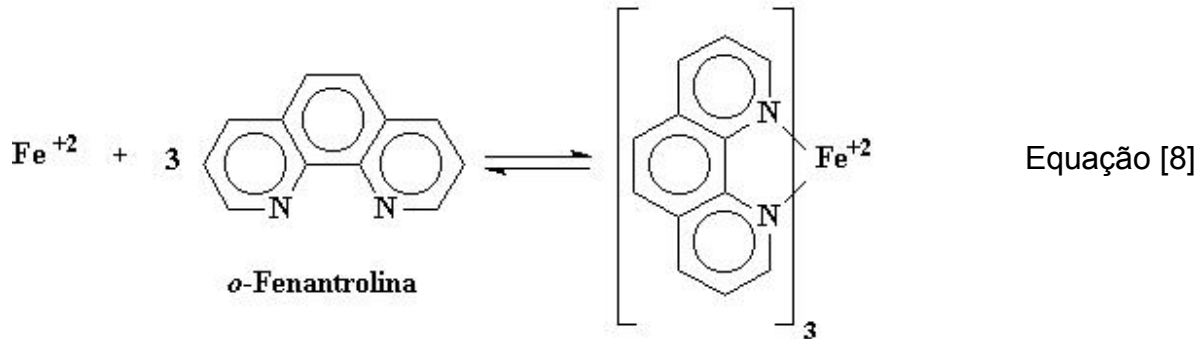
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.4.1 Medidas de pH e potencial de óxido-redução

O pH e o potencial redox das amostras foram medidos utilizando-se um eletrodo combinado de vidro e um eletrodo de Pt (contra Ag⁰/AgCl), respectivamente.

4.4.2 Determinação dos íons ferrosos

Essa análise foi realizada através da técnica de complexação da 1,10-ortofenantrolina com os íons ferrosos (equação [8]). Esse método espectrofotométrico é



mais sensível quando comparado à titulação, uma vez que erros inerentes a técnica titulométrica são diminuídos consideravelmente. De acordo com o descrito por Sandell (1959), a concentração dos íons Fe^{2+} é determinada através de medidas de absorvância da solução do complexo Fe (II)-fenantrolina, de coloração vermelho-alaranjada.

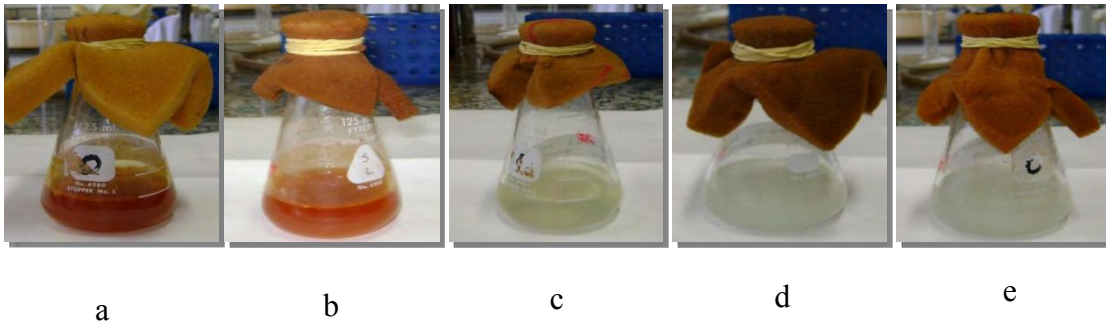
O agente cromogênio (1,10-fenantrolina) foi adicionado em excesso, de modo a promover o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do complexo.

Para a obtenção da curva analítica, foram preparadas soluções com concentrações crescentes de Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A estas soluções foram adicionados 5,0 mL de ortofenantrolina (2 g L^{-1}) e 4,0 mL de tampão acetato (2 mol L^{-1}). Completou-se o volume de todas as soluções para 25 mL com água destilada.

Nos ensaios de cinética de oxidação dos íons ferrosos e nos ensaios de biolixiviação em frascos agitados esse método Fotocolorimétrica foi realizado para determinar Fe^{2+} , para isso utilizou-se uma alíquota de 10 μL da cultura de *At. ferrooxidans* com adição de 20,0 mL de ortofenantrolina e 16,0 mL de tampão acetato, obtendo um volume total de 100 mL de solução com água destilada. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro 600S Femto, utilizando comprimento de onda de 510 nm.

Na Figura 8 representa o aspecto final das soluções com a oxidação dos íons ferrosos no meio na presença de *At. ferrooxidans* e íons cloreto em diferentes concentrações.

Figura 8. Linhagem *At. ferrooxidans* em meio líquido (T&K completo) na presença de íons Cl^- nas seguintes concentrações (mmol L^{-1}) (a) 0; (b) 100; (c) 200; (d) 400; (e) 500.



Demonstrou-se na Figura 9 a coloração do complexo formado entre Fe (II)-fenantrolina, de cor vermelho-alaranjado.

Figura 9. Demonstração das diferentes intensidades de cor, dependendo da concentração do complexo Fe(II)-fenatrolina



Para a realização desta metodologia Fe(II)-ortofenantrolina foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução A

$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$	0,1 g
Água destilada.....	100 mL

Solução B

$NH_2OH \cdot HCl$	2,0 g
Água destilada.....	20 mL

Solução C

CH_3COONa anidro.....	10 g
Água destilada.....	100 mL

Solução padrão de íons Fe^{2+}

$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0,07 g
H_2SO_4 concentrado.....	2,5 mL
Água destilada.....	1000 mL

Para a obtenção da curva analítica, foram preparadas soluções com concentrações crescentes de Fe^{2+} . A estas soluções foram adicionados 0,5 mL da solução B, 5,0 mL da solução A e 4,0 mL da solução C. Completamos o volume de todas as soluções para 25 mL com água destilada.

Para o monitoramento do crescimento bacteriano (e oxidação do íon ferroso presente), foi retirada amostras de 10 μL da cultura de *At. ferrooxidans*. Foram adicionados 20,0 mL da solução A e 16,0 mL da solução C, utilizando um balão volumétrico de 100 mL, completando-o com água destilada. Nas amostras a solução B (hidroxilamina) não foi adicionada, pois a função da hidroxilamina é reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , para determinar ferro total, o que não se aplica neste caso. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro 600S Femto, utilizando comprimento de onda de 510 nm.

4.4.3 Determinação da acidez nos ensaios de cinética de oxidação do enxofre

A determinação de ácido foi realizada por meio de titulometria de neutralização. Uma alíquota (1 mL) da amostra foi diluída em 50 mL, com água destilada. A seguir foram adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína e a amostra foi titulada com uma solução padrão de hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até viragem da coloração rósea permanente (VOGEL, 1981).

4.4.4 Determinação de Cobre e Fe_{total}

As amostras provenientes dos ensaios de biolixiviação foram centrifugadas e armazenadas em HNO_3 2% na proporção de 1:1 para subsequente análise de cobre e ferro total.

Entre as técnicas espectro analíticas, a AAS ocupa uma posição de destaque devido à elevada sensibilidade, seletividade, à pequena quantidade de amostra necessária para realizar a análise, tornando possível introduzir amostras na forma sólida ou em suspensão.

A concentração de cobre e de Fe_{total} nas amostras líquidas foram analisadas por espectrometria de absorção atômica, utilizando o espectrômetro Agilent 240FS multielementar. O comprimento de onda para os dois elementos estudados foi de 324,8 nm.

4.5 Adaptações das células bacterianas

Os inóculos foram crescidos em frascos com meio fresco de T&K para posteriormente serem aplicados aos ensaios descritos a seguir, esperava-se um tempo de no máximo 72h para o crescimento e verificação da mudança de coloração do meio devido a oxidação do Fe^{2+} , com o exceção do ensaio de cinética oxidação do enxofre no qual os inóculos foram crescidos em meio 9K e deixados por no mínimo 15 dias até que atingissem um pH em torno de 1,2 para a posterior utilização nos testes.

4.5.1 Adaptação das linhagens selecionadas ao crescimento em calcopirita na presença de cloreto

Foi realizada uma adaptação de todas as linhagens bacterianas em meio contendo calcopirita como fonte energética na presença de íons cloreto. Através de etapas sucessivas de substituição da fonte energética (Fe^{2+}) pelo sulfeto mineral e pela adição de quantidades crescentes do íon cloreto, objetivando-se adaptar a linhagem nestas novas condições conforme o procedimento esquematizado na tabela 5.

Tabela 5. Fases do procedimento experimental da adaptação das linhagens de *At. ferrooxidans* ao crescimento em calcopirita e íons cloreto.

Etapas	Concentração de Fe^{2+} (mmol L⁻¹)	Concentração de Cl^- (mmol L⁻¹)	Concentração de CuFeS_2 (% m/v)
1	60	50	0,2
2	30	100	0,4
3	15	100	0,8

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

A bactéria 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 é utilizado somente como um iniciador do processo metabólico da espécie (BEVILAQUA, 1999). Cada etapa teve um tempo mínimo de incubação de 15 dias. Antes de iniciar a nova etapa, foram realizados testes de viabilidade da espécie, retirando-se uma alíquota de 1 mL do frasco em adaptação e inoculando-se em 10 mL de meio T&K fresco, nas mesmas condições de crescimento apresentadas anteriormente. A viabilidade era considerada positiva quando a oxidação ocorria no prazo máximo de 72 horas.

Foram feitos também a adaptação ao crescimento em enxofre (meio 9K) de algumas das linhagens de *At. ferrooxidans* (SJ22, S, PCEL, AMF e ATCC) que tiveram melhor resultado nos ensaios de respirometria celular. Foram realizados 3 repiques sucessivos dessas linhagens em meio 9K contendo enxofre e pH 2,8. A água perdida por evaporação foi repostada periodicamente e o pH foi medido de 7 em 7 dias, levando

aproximadamente 15 dias até atingirem pH próximos a 1,2, o que indica crescimento bacteriano nesse meio. Depois de adaptadas foram submetidas a ensaios em frascos agitados na presença de cloreto, para verificar a capacidade dessas linhagens a oxidação do enxofre na presença deste íon, com consequente medida da produção de ácido.

4.6 Estudo com os íons cloreto

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos resultados obtidos calculou-se a média e o desvio padrão.

4.6.1 Ensaio de cinética de oxidação do Fe(II), na presença de cloreto para a seleção de linhagens halotolerantes

As linhagens foram submetidas à incubação em meio T&K completo, contendo diferentes concentrações de íons cloreto, a fim de se selecionar as espécies mais halotolerantes. As concentrações de cloreto utilizadas neste ensaio foram as seguintes (mmol L^{-1}): 0, 100, 200, 400 e 500. Algumas linhagens também foram submetidas a concentrações de 50 mmol L^{-1} de Cl^- (PCEL, SSP, V3 e ATCC). O acompanhamento da oxidação do íon ferroso pelas linhagens bacterianas foi realizado mediante o método da 1,10-fenantrolina (SANDELL, 1959), descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, utilizando 5% (v/v) de inóculo das diferentes linhagens de *At. ferrooxidans* em meio T&K completo.

4.6.2 Ensaios de respirometria na presença de cloreto

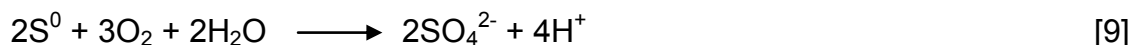
Para a quantificação da biomassa a ser utilizada nos ensaios respirométricos foi realizada uma dosagem prévia das proteínas totais (HARTREE, 1972). Segundo Garcia Jr et al. (1992), neste procedimento, as proteínas totais são utilizadas como unidade biológica de rotina, no qual normalizam a quantidade de células presentes nos ensaios de respirometria e torna o método sensível, preciso e simples de ser realizado.

Os ensaios respirométricos permitem avaliar de forma rápida a atividade oxidativa celular, desacoplada de crescimento. Os ensaios foram realizados utilizando um respirômetro de Warburg (UMBREIT et al., 1972), o qual consiste em um frasco de reação acoplado a um manômetro. Este frasco de reação contém um reservatório lateral para adição de células, um poço central para colocar papel de filtro embebido com KOH 20% (para a retirada de CO₂) e um compartimento principal no qual ocorrem as reações.

Este conjunto foi colocado em banho de água à temperatura de 30°C e mantido em agitação por todo o tempo do experimento (180 min). Este ensaio foi realizado com todas as linhagens na presença de calcopirita com íons cloreto na concentração de 50 mmol L⁻¹ e também na ausência desses íons.

4.6.3 Ensaios de cinética de oxidação de enxofre na presença de cloreto

Neste ensaio as linhagens de *At. ferrooxidans* adaptadas e crescidas em meio 9K (SJ22, S, PCEL, AMF e ATCC 23270) foram avaliadas quanto à capacidade de formação de ácido sulfúrico, produto da degradação do enxofre, na presença de diferentes concentrações de íons cloreto. A reação que envolve o consumo de enxofre pela bactéria está representada pela equação [9]:



Este ensaio foi realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo meio 9K completo (pH 2,8) com concentrações de íon cloreto na forma de NaCl de 0 mmol L⁻¹, 50 mmol L⁻¹ e 100 mmol L⁻¹. O volume final de cada frasco foi de 150 mL.

Os frascos foram mantidos em mesa agitadora a 150 rpm e a temperatura de 30°C. Foram utilizados 5% (v/v) de inoculo que foi retirado do sobrenadante das culturas adaptadas em meio 9K completo.

Periodicamente foram retiradas alíquotas para a determinação da quantidade de H₂SO₄ produzido (VOGEL, 1981), como acompanhamento da oxidação do S⁰. A

influência das diferentes concentrações de íons cloreto na atividade bacteriana foi avaliada.

4.6.4 Ensaios de biolixiviação em frascos agitados

Após a adaptação das linhagens ao crescimento em calcopirita, na presença de cloreto, foram iniciados os ensaios de lixiviação em frascos agitados.

Os ensaios foram realizados em duplicata em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de solução A do meio T&K, 2,5% (m/v) de calcopirita e 10% de inóculo. Também foi realizado um ensaio controle, na ausência de bactéria. A concentração de NaCl escolhida foi de 50 mmol L⁻¹ de Cl⁻ determinada a partir dos ensaios de cinética de oxidação e de respirometria celular. Periodicamente foi monitorado o pH; o potencial de óxido-redução (Eh) e a concentração de Fe²⁺. O pH foi ajustado a 1,8, com H₂SO₄ (1 mol L⁻¹) quando necessário e as perdas de água por evaporação foram estimadas pela perda de peso e foram compensadas antes de cada amostragem pela adição de água destilada esterilizada. As amostragens, com retirada de alíquotas de aproximadamente 2 mL, foram realizadas inicialmente a cada 2 ou 3 dias (0, 2, 5, 7, 10 e 14 dias) e posteriormente a cada 4 dias até o final do experimento.

4.6.5 Ensaios de biolixiviação da calcopirita com adições sucessivas de íons cloreto (10 mmol L⁻¹ e 20 mmol L⁻¹)

Os ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto foram realizados com o objetivo de se verificar a cinética de oxidação do sulfeto pelas diferentes linhagens, com adições de cloreto em tempos consecutivos. Os frascos (erlenmeyer - 250 mL) foram mantidos em mesa agitadora a 150 rpm e com temperatura de 30°C, no qual continha 100 mL de solução lixiviante com pH inicial de 1,8 e 2,5 g da amostra mineral(calcopirita).

Foi utilizado como solução lixiviante inicial a solução do meio T&K fresco e alíquotas de diferentes concentrações de cloreto (0 mmol L⁻¹; 10 mmol L⁻¹ e 20 mmol

L⁻¹) na forma de cloreto de sódio. Como inóculo foi utilizado um volume de 5%(v/v) com algumas das linhagens estudadas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* adaptadas a calcopirita e aos íons cloreto (etapa 2). Foram também colocados frascos controles sem adição de inóculo. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas.

O ensaio foi acompanhado com a retirada de alíquotas periódicas da fração líquida para posterior medida de pH, potencial de óxido-redução e análises de Fe²⁺, Fe³⁺ e Cu total. Anteriormente a retirada da amostragem a evaporação de água de cada frasco, estimada pela perda de massa, foi repostada com adição de água destilada estéril.

As adições sucessivas de cloreto foram sendo feitas de acordo com os resultados obtidos nas análises feitas no Espectrofotômetro de Absorção atômica verificando o desempenho bacteriano com a cinética e a solubilização de cobre. Essas adições de cloreto (mmol L⁻¹) (0, 10 e 20) foram feitas inicialmente a cada 3 dias para aumentar a cinética inicial com concomitante controle do pH, e posteriormente a cada 7 dias, dependendo do desempenho das análises e consequente verificação da estabilização da solubilização de cobre.

4.7 Difração de Raios X (DRX)- resíduos sólidos

Para a análise de raios x das amostras foi utilizado um difratômetro D5000-Siemens nas condições: corrente de 30 mA, voltagem de 40 KV, tempo de contagem de 2 s, passo de 0,05° (ângulo de 2θ), fendas de 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10 a 70° (2θ). Utilizou-se porta amostras de vidro e teflon com uma cavidade central de 15 a 20 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, no qual foram inseridas as amostras.

A identificação das fases presentes nos sólidos analisados foi comparada com fichas padrões do programa analisado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudos com cloreto

Os estudos com cloreto foram iniciados avaliando-se primeiramente a influência destes íons na capacidade de oxidação dos íons ferrosos para as diferentes linhagens. Na sequência foram realizados os estudos respirométricos, situação na qual as células bacterianas estão privadas de crescimento pela limitação de CO_2 que o sistema impõe. Lembrando que essas bactérias são quimiolitotróficas e fixam CO_2 via Ciclo de Calvin (GARCIA JUNIOR, 1991)

As linhagens bacterianas avaliadas pertencem à espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que é capaz de utilizar como fonte de energia íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre. As linhagens de nosso banco de dados (Tabela 2) são mantidas e armazenadas em meio contendo Fe^{2+} fonte de energia, e para que pudessem ser avaliados quanto à capacidade de oxidarem enxofre na presença de cloreto, repiques sucessivos em meio contendo enxofre como fonte de energia, foram realizados previamente ao início desta avaliação.

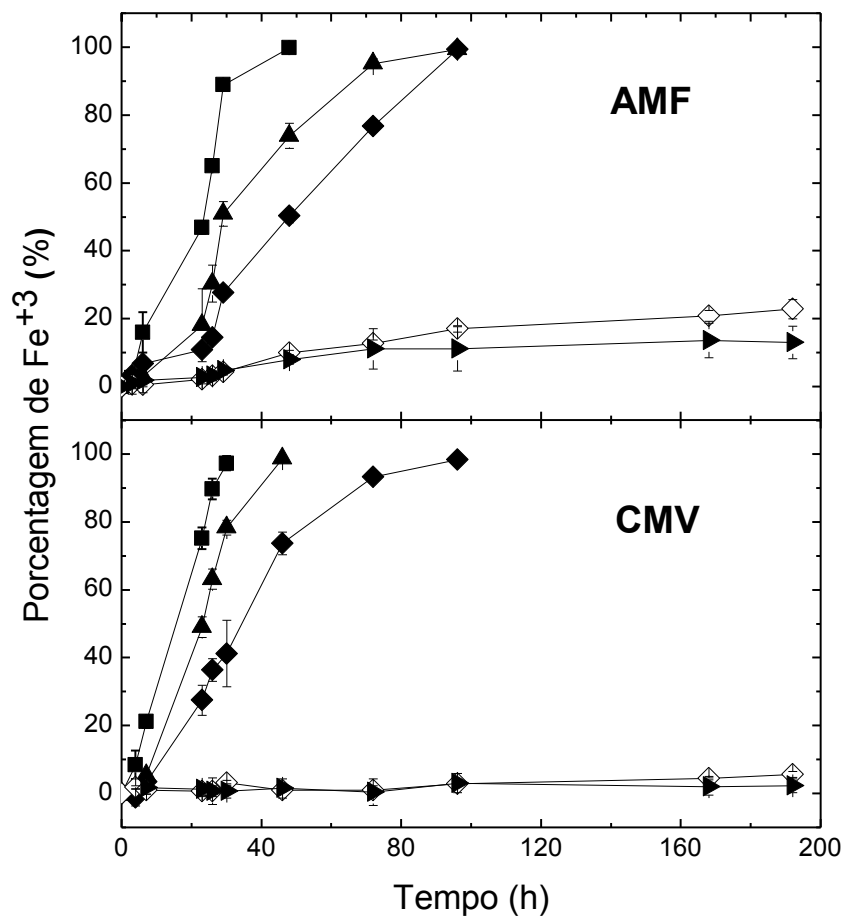
5.1.1 Cinética de oxidação dos íons ferrosos

Como pode ser observado na curva de crescimento da *At. ferrooxidans* AMF (Figura 9), a total oxidação dos íons Fe^{2+} ocorreu em aproximadamente 48 horas na presença de 0 mmol L^{-1} de íons Cl^- e em 96 horas na presença de 100 e 200 mmol L^{-1} . Na presença de 400 e 500 mmol L^{-1} de íons Cl^- , houve oxidação de 23% e 13% dos íons Fe^{2+} em solução respectivamente. Apesar da baixa taxa de oxidação dos íons ferrosos nesta última condição, é relevante destacar que esta foi a única linhagem capaz de tolerar e crescer na presença de 400 e 500 mmol L^{-1} de cloreto.

O efeito dos íons Cl^- na oxidação do íon ferroso pela linhagem CMV também está representado na Figura 10. A oxidação total dos íons Fe^{2+} ocorreu em aproximadamente 30, 46 e 96 horas, em concentrações de 0, 100 e 200 mmol L^{-1} de

íons Cl^- , respectivamente. Em todas as figuras foram calculados a média e o desvio padrão.

Figura 10. Variação da porcentagem de oxidação dos íons Fe^{2+} para as linhagens de *At. ferrooxidans* AMF e CMV em T & K completo na presença de íons Cl^- nas concentrações: ■ 0 mmol L^{-1} , ▲ 100 mmol L^{-1} ; ◆ 200 mmol L^{-1} , ◇ 400 mmol L^{-1} e ► 500 mmol L^{-1} .

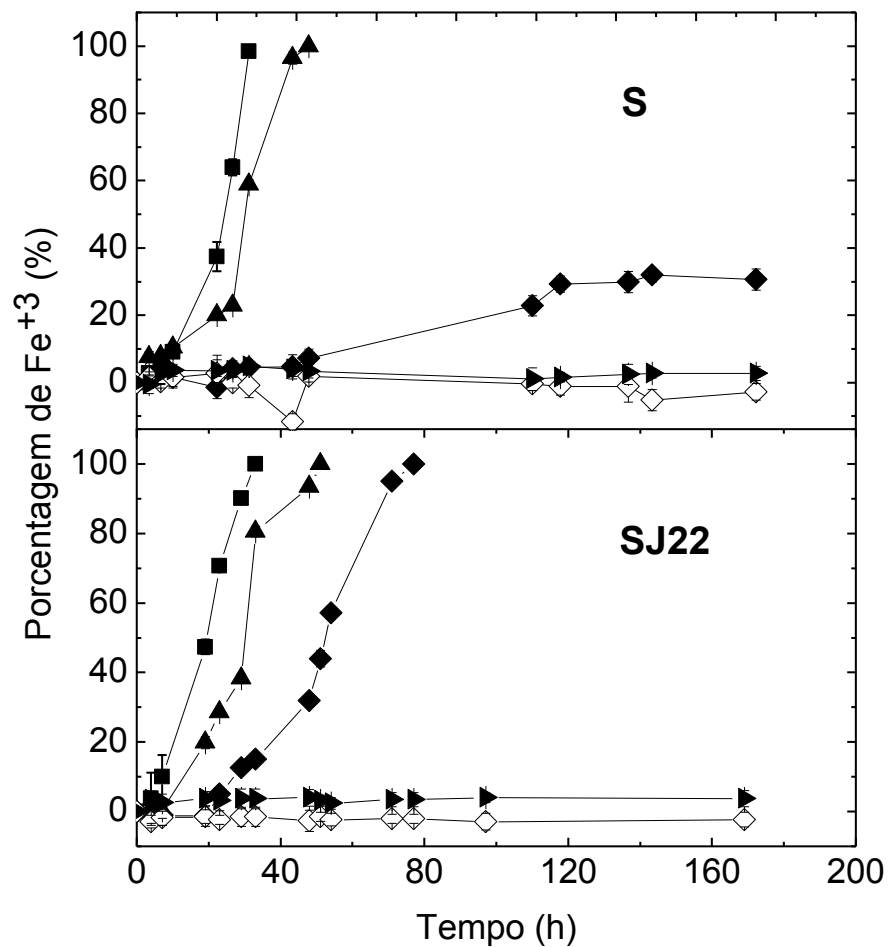


Fonte: * Elaborado pelo próprio autor

*Figuras: 10 ao 57.

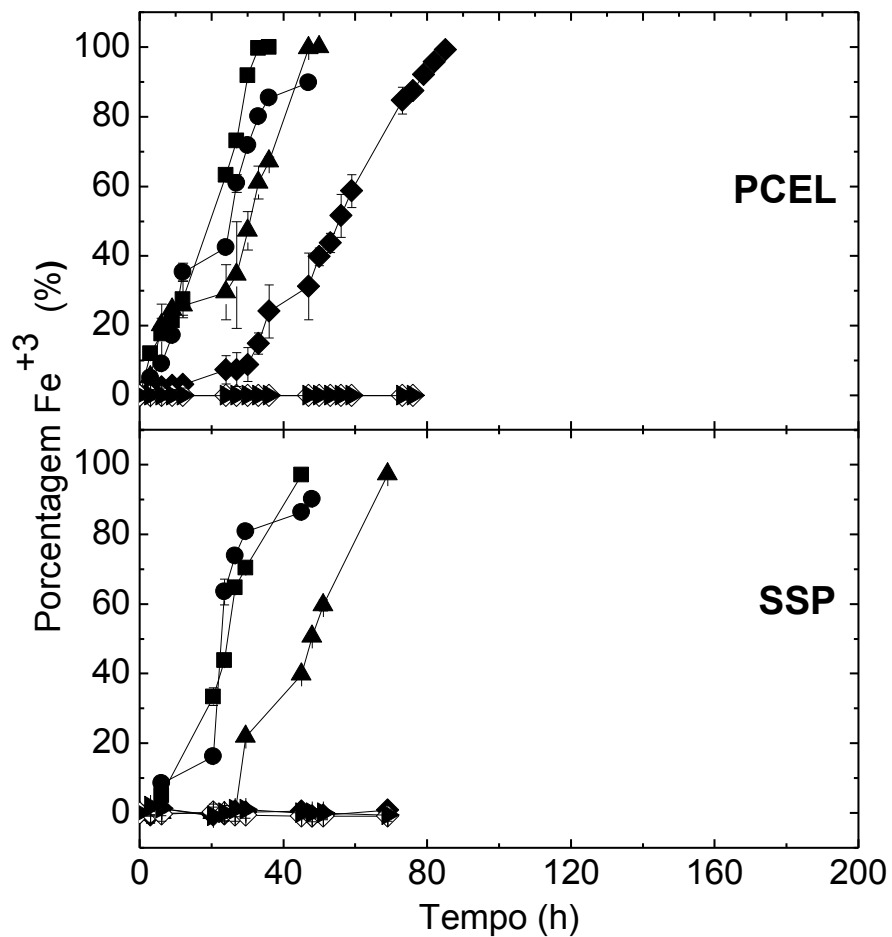
Para a linhagem *At. ferrooxidans* SJ22 foi observado uma diferença na oxidação total da fonte energética de aproximadamente 18 horas entre a condição controle (0 mmol L⁻¹) e na presença de 100 mmol L⁻¹ de íons Cl⁻, e de 43 horas na presença de 200 mmol L⁻¹ de íons Cl⁻ (Figura 11). A linhagem S apresentou inibição significativa na presença de 200 mmol L⁻¹, atingindo apenas 30% de oxidação após 155 horas (Figura 11).

Figura 11. Variação da porcentagem de oxidação dos íons Fe²⁺ para as linhagens de *At. ferrooxidans* S e SJ22 em T & K completo na presença de íons Cl⁻ nas concentrações: ■ 0 mmol L⁻¹, ▲ 100 mmol L⁻¹; ◆ 200 mmol L⁻¹, ◇ 400 mmol L⁻¹ e ► 500 mmol L⁻¹.



A linhagem PCEL apresentou oxidação total dos íons Fe^{2+} em concentrações inferiores a 400 e 500 mmol L^{-1} . O tempo para a total oxidação variou entre 36 e 80 horas (Figura 12). Em relação à linhagem SSP, cabe destacar que a mesma não apresentou tolerância a concentrações maiores que 100 mmol L^{-1} de cloreto.

Figura 12. Variação da porcentagem de oxidação dos íons Fe^{2+} para as linhagens de *At. ferrooxidans* PCEL e SSP em T & K completo na presença de íons Cl^- nas concentrações: ■ 0 mmol L^{-1} , ● 50 mmol L^{-1} , ▲ 100 mmol L^{-1} ; ◆ 200 mmol L^{-1} , ◇ 400 mmol L^{-1} e ► 500 mmol L^{-1}



Os ensaios de cinética de oxidação dos íons ferrosos evidenciaram as diferenças existentes entre as linhagens (AMF, SJ22, PCE, PCEL, SSP, S, CMV, V3, LR e ATCC) quanto à tolerância a íons cloreto. Nas concentrações de 50 e 100 mmol L^{-1} todas as linhagens testadas oxidaram completamente os íons ferrosos, porém em diferentes períodos de tempo. Com exceção da linhagem AMF, que na presença de 400 e 500 mmol L^{-1} de íons Cl^- conseguiram oxidar, enquanto todas as outras apresentaram forte inibição quanto à capacidade de oxidação de íons ferrosos nessas concentrações.

Analisando-se esses dados em conjunto, foi possível determinar uma ordem crescente de halotolerância das linhagens em relação à capacidade de oxidação dos íons ferrosos na presença de íons cloreto: $S < SSP < V3 < LR < PCE < ATCC < SJ22 < CMV < PCEL < AMF$ (Apêndice A e B).

Essa capacidade de oxidação foi representada na forma de gráficos em barras para uma melhor visualização dos dados (Figuras 15 a 24).

Figura 15. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem AMF.

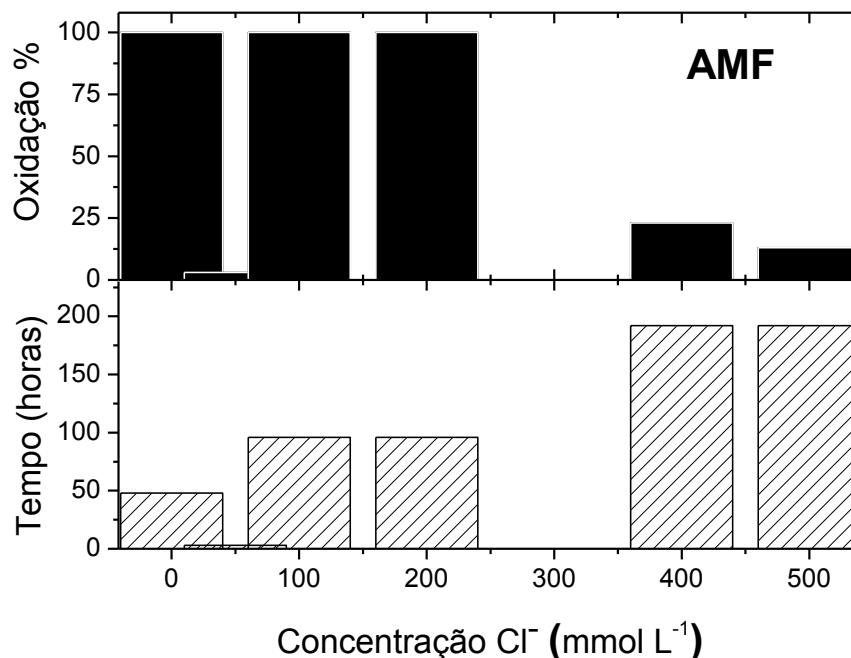


Figura 16. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem ATCC.

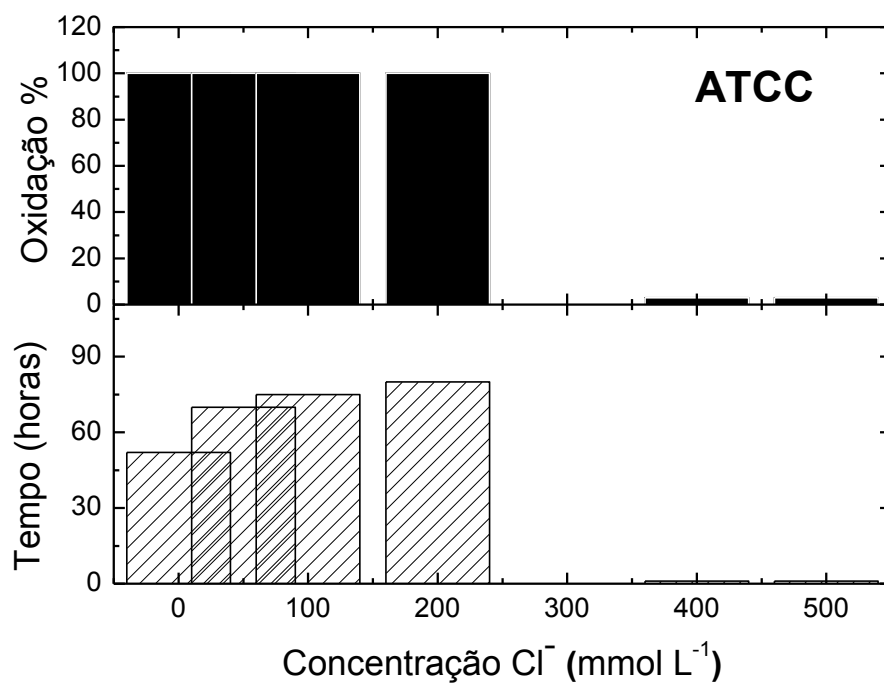


Figura 17. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem CMV.

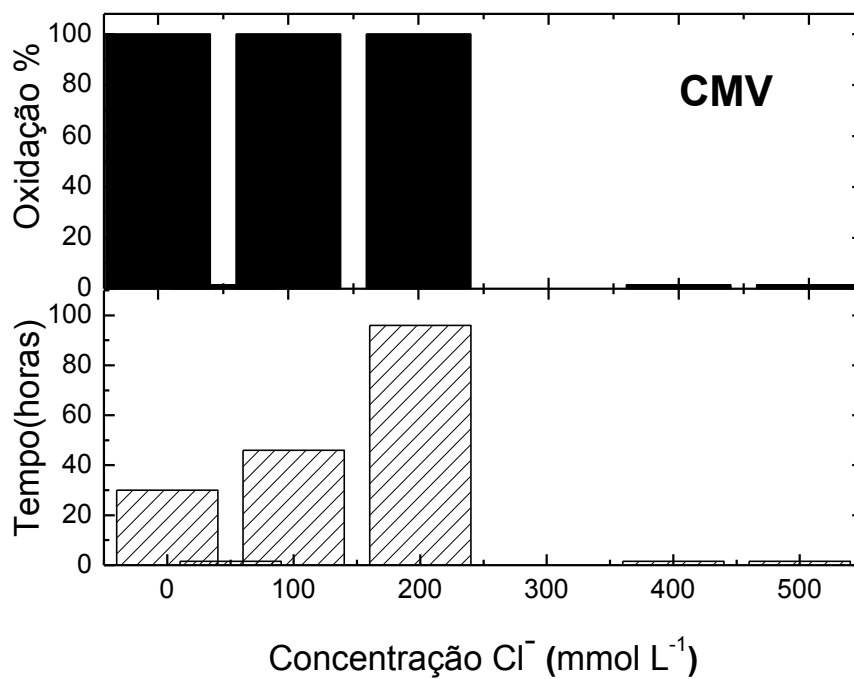


Figura 18. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem LR.

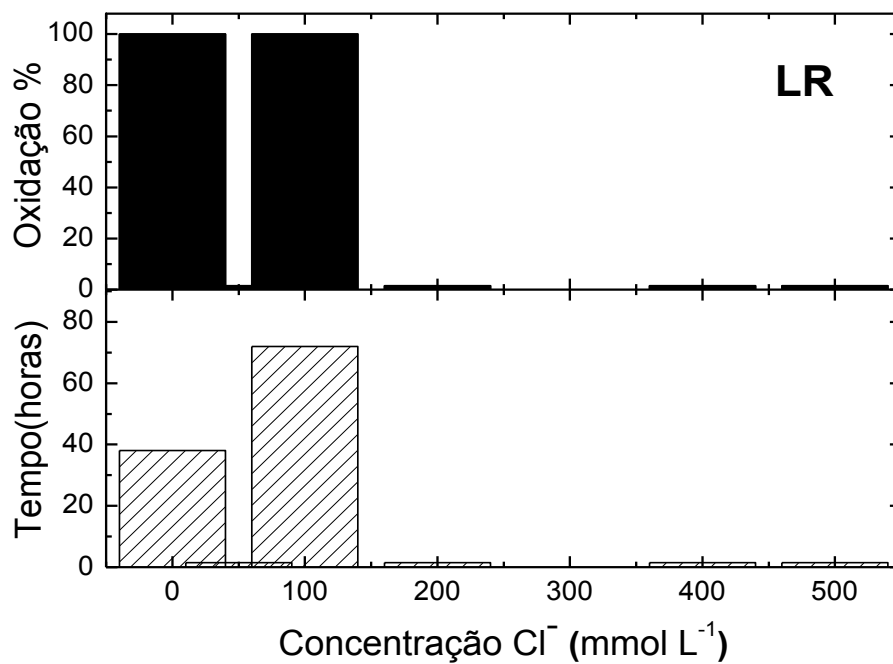


Figura 19. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem PCE.

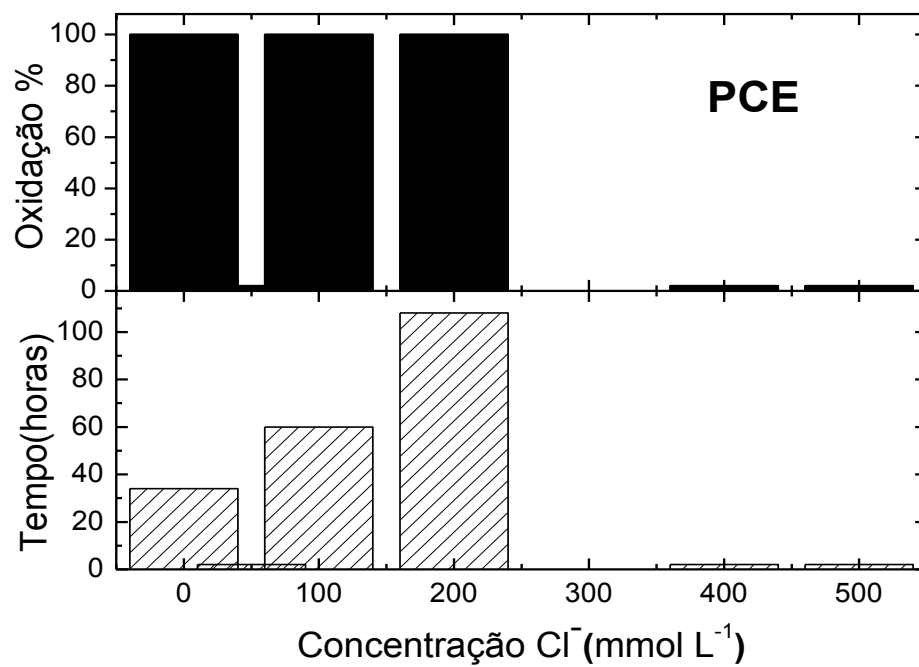


Figura 20. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem PCEL.

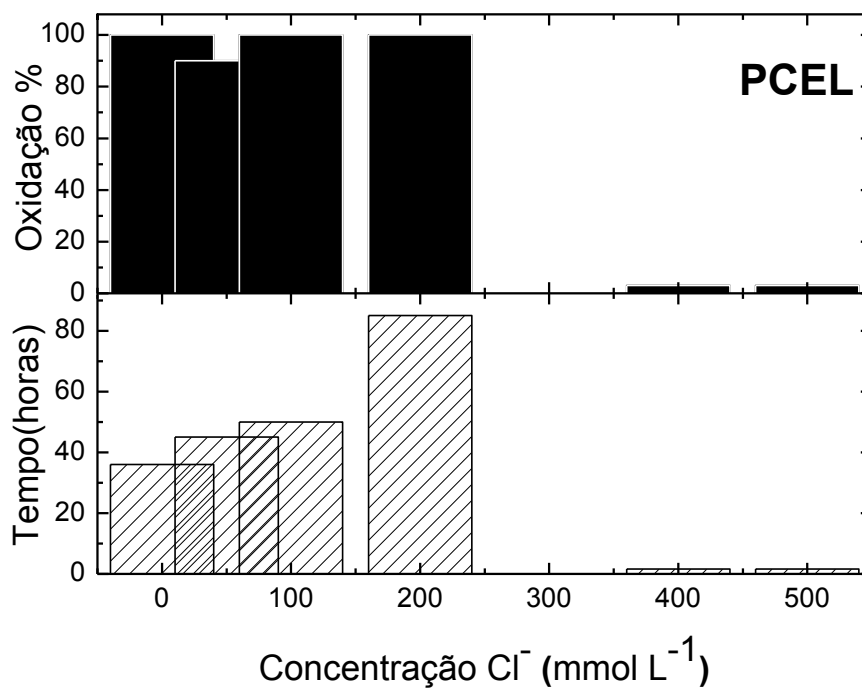


Figura 21. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem S.

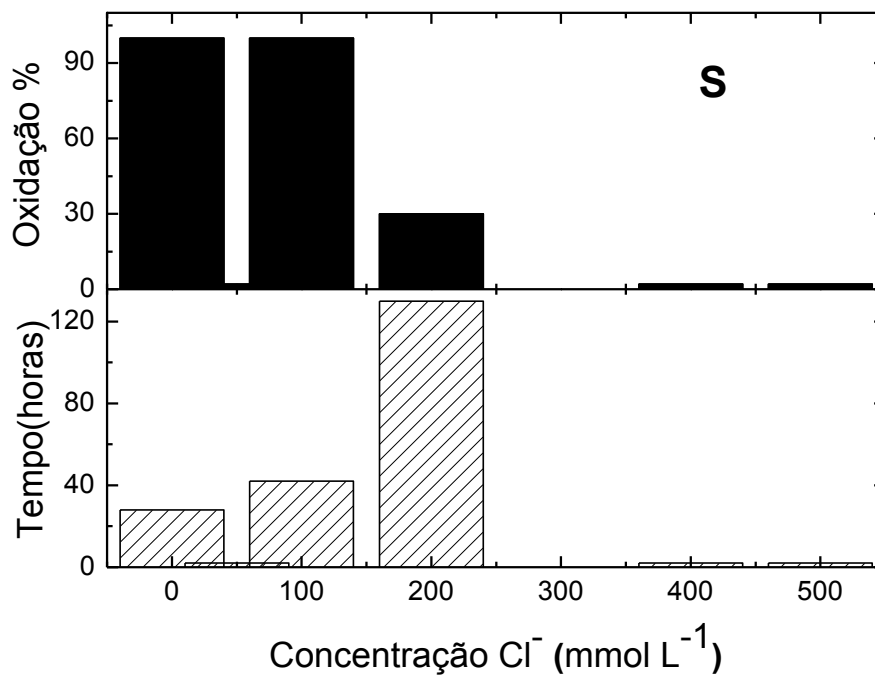


Figura 22. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem SJ22.

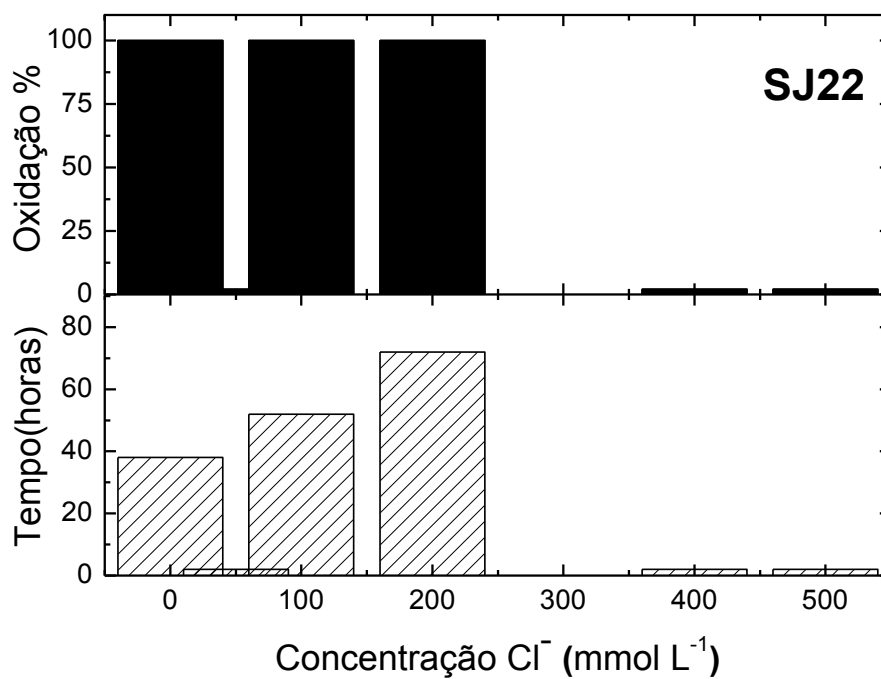


Figura 23. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem SSP.

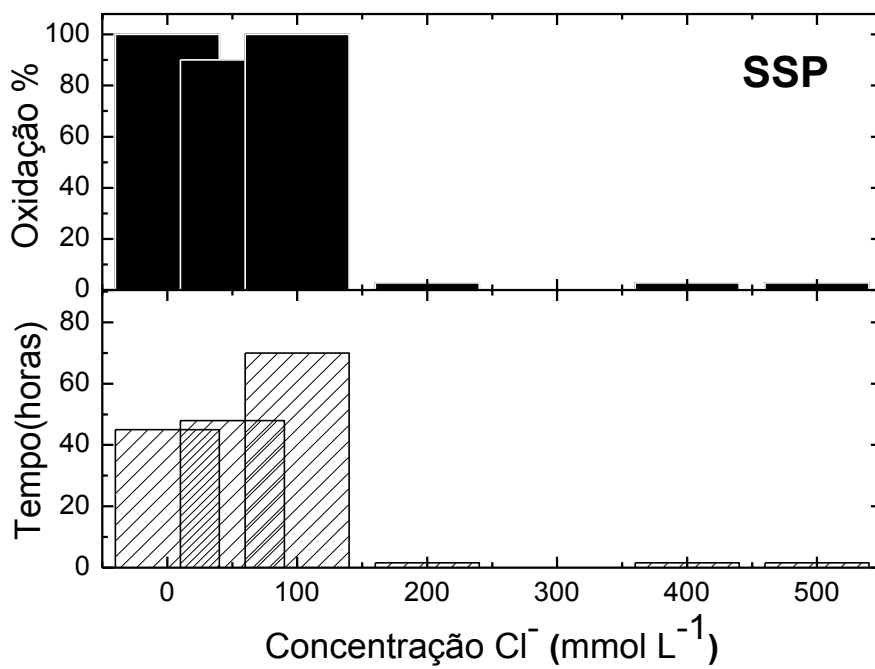
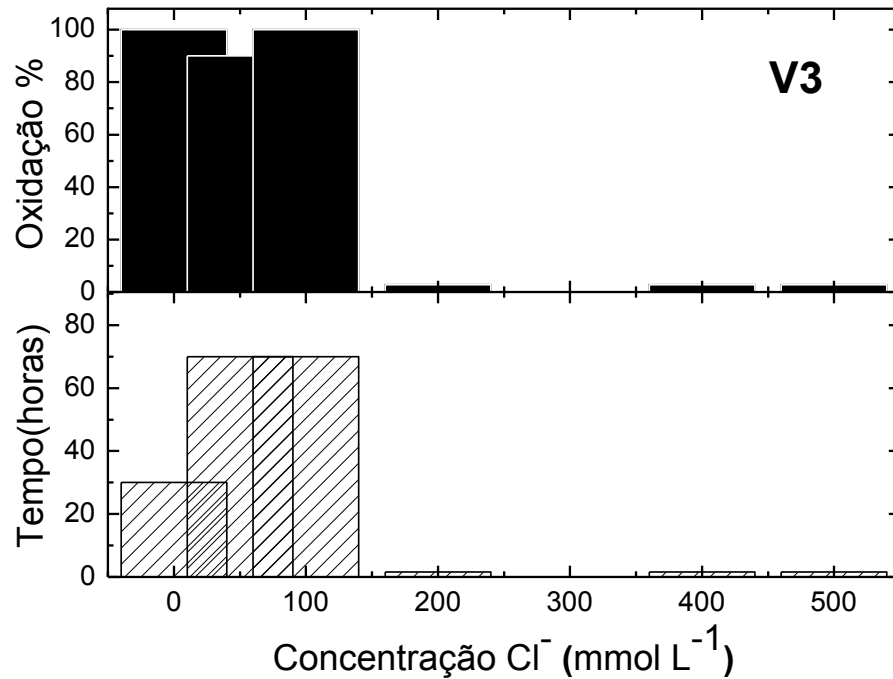


Figura 24. Representação da cinética de oxidação dos íons ferrosos (barra negra) e do tempo (barra negra chanfrada) em diferentes concentrações de cloreto (mmol L^{-1}) (0, 50, 100, 200, 400 e 500) da linhagem V3.



Foi demonstrado por Zammit et al. (2012) que cepas de cultura pura de um mesmo micro-organismos apresentaram redução no número de células e uma diminuição na taxa de oxidação de ferro (II) na presença de 60 mmol L^{-1} de Cl^- . Além de estudar o efeito desses íons cloreto na capacidade de biolixiviação numa população mista de acidófilos entre eles *At. ferrooxidans*, *A. caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *L. ferriphilum* e *S. thermosulfidooxidans*. As linhagens de *At. ferrooxidans* utilizadas neste trabalho apresentaram diferentes comportamentos na presença das concentrações testadas com uma diminuição na taxa de oxidação dos íons ferrosos a partir de 100 mmol L^{-1} de cloreto, uma linhagem que teve maior destaque foi a AMF que apresentou baixo valor de oxidação de Fe^{2+} mas significativo na presença de 400 e 500 mmol L^{-1} de Cl^- .

5.1.2 Ensaio de respirometria celular na presença de calcopirita e 50 mmol L⁻¹ de íons cloreto

Avaliando os resultados de respirometria celular foi possível verificar quais linhagens apresentaram a melhor atividade frente ao consumo de oxigênio na presença de calcopirita nas diferentes concentrações de cloreto estudada. Os experimentos de respirometria apresentaram um perfil semelhante para todas as linhagens e a tabela 8 resume o consumo de O₂ obtido nas condições do ensaio, bem como a porcentagem de inibição (comparado ao ensaio controle na ausência de cloreto), o cálculo da % inibição foi demonstrado no Apêndice C.

Tabela 8. Consumo de O₂ e porcentagem de inibição na presença de íons cloreto

Linhagens A. <i>ferrooxidans</i>	Consumo de O ₂		% inibição na presença Cl ⁻
	0 mmol. L ⁻¹ Cl ⁻	50 mmol. L ⁻¹ Cl ⁻	
AMF	280 µL	280 µL	0
CMV	400 µL	150 µL	63
LR	300 µL	300 µL	0
PCE	350 µL	100 µL	71
S	700 µL	350 µL	50
SJ22	500 µL	300 µL	40
PCEL	600 µL	400 µL	33
V3	300 µL	300 µL	0
SSP	250 µL	100 µL	60
ATCC (23270)	350 µL	300 µL	14

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

As linhagens AMF, LR e V3 apresentaram resultados semelhantes, nenhuma delas apresentou inibição na presença de 50 mmol L⁻¹ de cloreto. Os valores finais de consumo de O₂ também foram próximos (Figuras 25 e 26).

A linhagem CMV teve um consumo superior de O₂ na ausência de cloreto, quando comparado à AMF, mas a inibição pelo cloreto foi bastante relevante (63%) (Figura 27).

As linhagens PCE e ATCC, apesar de terem apresentado consumo de O₂ comparável com as linhagens AMF e LR, apresentaram porcentagem de inibição de 71% e 14% respectivamente, na presença de cloreto. Cabe ressaltar que a linhagem

PCE apresentou a maior inibição ao cloreto em comparação com todas as outras (Figuras 26 e 27).

Na Figura 28 podemos observar que o consumo de O_2 da linhagem S foi o maior na ausência de cloreto quando comparado com as outras linhagens, mas apresentou significativa inibição na presença de cloreto (50%). Mesmo com esta porcentagem significativa de inibição, a linhagem S pode ser considerada halotolerante, quando comparada às outras porcentagens de inibição ao íon cloreto.

A linhagem PCEL apresentou relevante consumo de O_2 , e uma porcentagem de inibição relativamente baixa (33%), tornando-se uma linhagem interessante no ponto de vista de halo tolerância (Figura 28).

A Figura 29 mostra que para a linhagem SJ22 o consumo de O_2 foi significativo e obteve-se uma porcentagem de inibição na presença de Cl^- de 40%. Em relação à linhagem SSP o consumo de O_2 foi relativamente baixo, e mostrou uma inibição bastante significativa quando comparado com as outras linhagens.

Com base nestes resultados é possível estabelecer uma ordem crescente da porcentagem de inibição das linhagens na presença de 50 mmol L^{-1} de cloreto:

(AMF \approx LR \approx V3) < ATCC < PCEL < SJ22 < S < SSP < CMV < PCE.

Com exceção das linhagens AMF, LR e V3 que não apresentaram inibição por cloreto nas condições de ensaio, as outras linhagens apresentaram relativa porcentagem de inibição na presença de cloreto. Em todas as figuras foram realizadas a média e o desvio padrão.

Figura 25. Consumo de O₂ das linhagens de *At. ferrooxidans* (150µg proteínas totais) V3 e AMF. Condições: □ controle com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ○ controle com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻, ■ inoculado com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ● inoculado com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻.

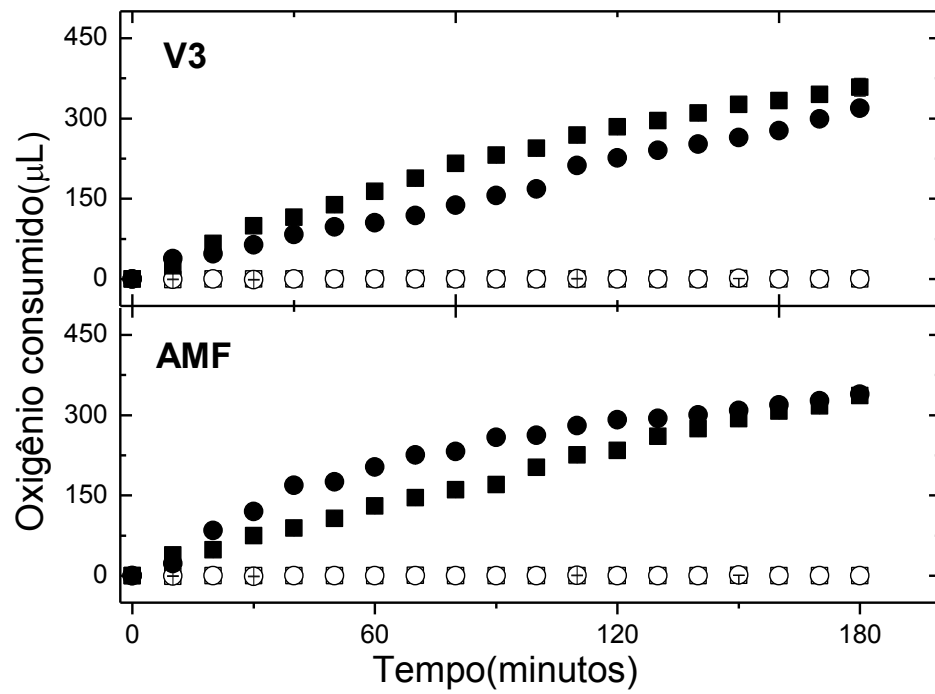


Figura 26. Consumo de O₂ das linhagens de *At. ferrooxidans* (150µg proteínas totais) LR e PCE. Condições: □ controle com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ○ controle com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻, ■ inoculado com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ● inoculado com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻.

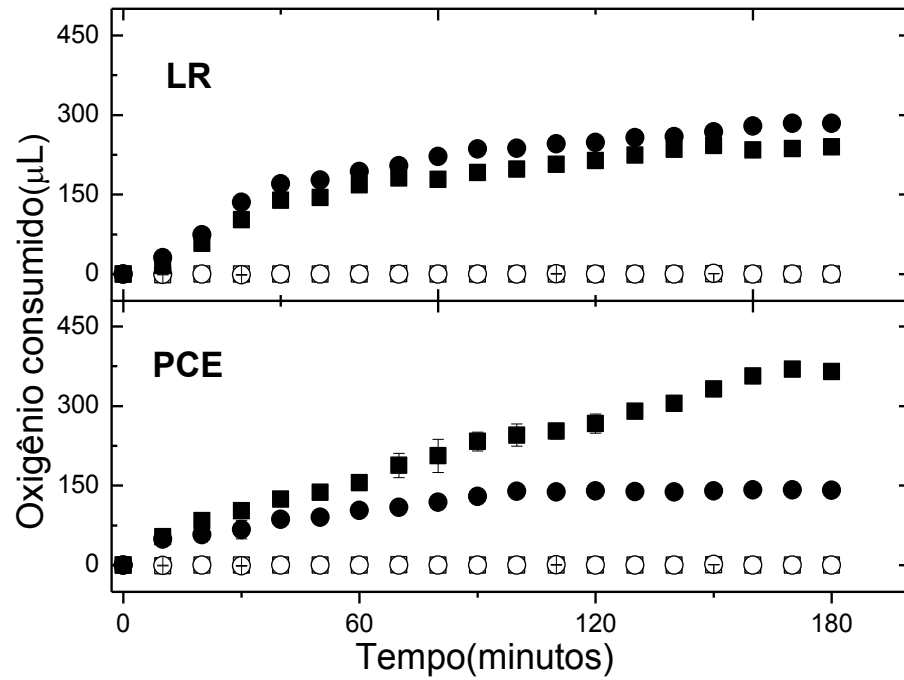


Figura 27. Consumo de O_2 das linhagens de *At. ferrooxidans* (150 μ g proteínas totais) ATCC e CMV. Condições: \square controle com 0 mmol L^{-1} Cl^- , \circ controle com 50 mmol L^{-1} Cl^- , \blacksquare inoculado com 0 mmol L^{-1} Cl^- , \bullet inoculado com 50 mmol L^{-1} Cl^- .

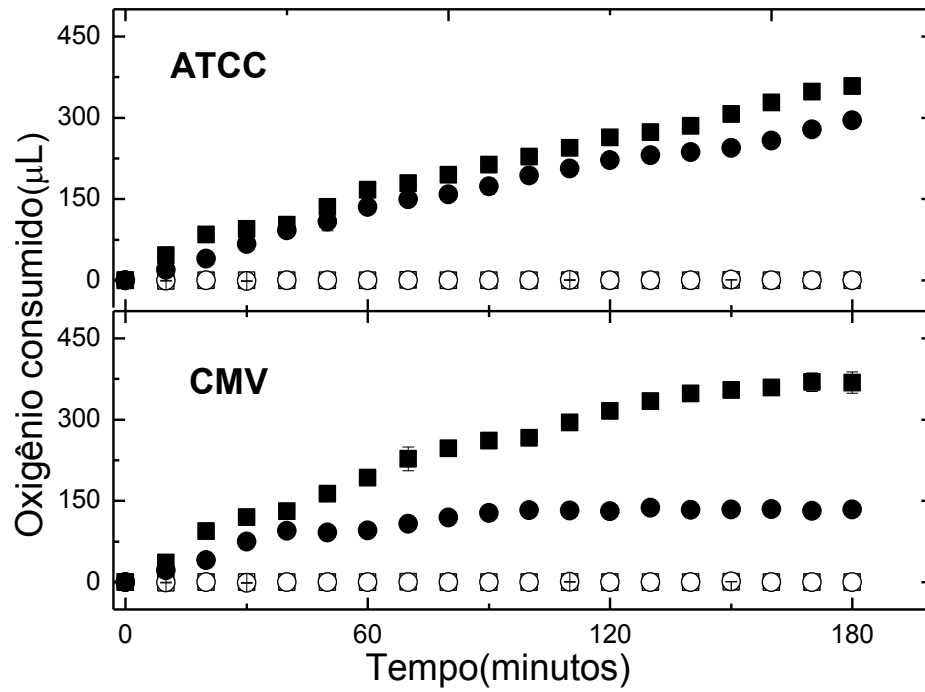


Figura 28. Consumo de O_2 das linhagens de *At. ferrooxidans* (150 μ g proteínas totais) PCEL e S. Condições: \square controle com 0 $mmol L^{-1} Cl^-$, \circ controle com 50 $mmol L^{-1} Cl^-$, \blacksquare inoculado com 0 $mmol L^{-1} Cl^-$, \bullet inoculado com 50 $mmol L^{-1} Cl^-$.

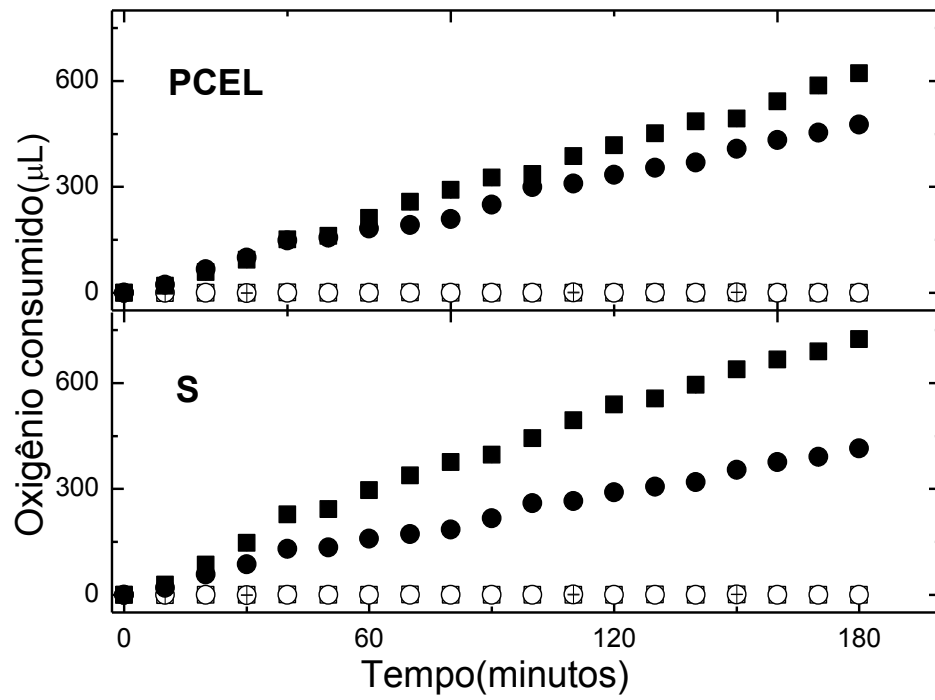
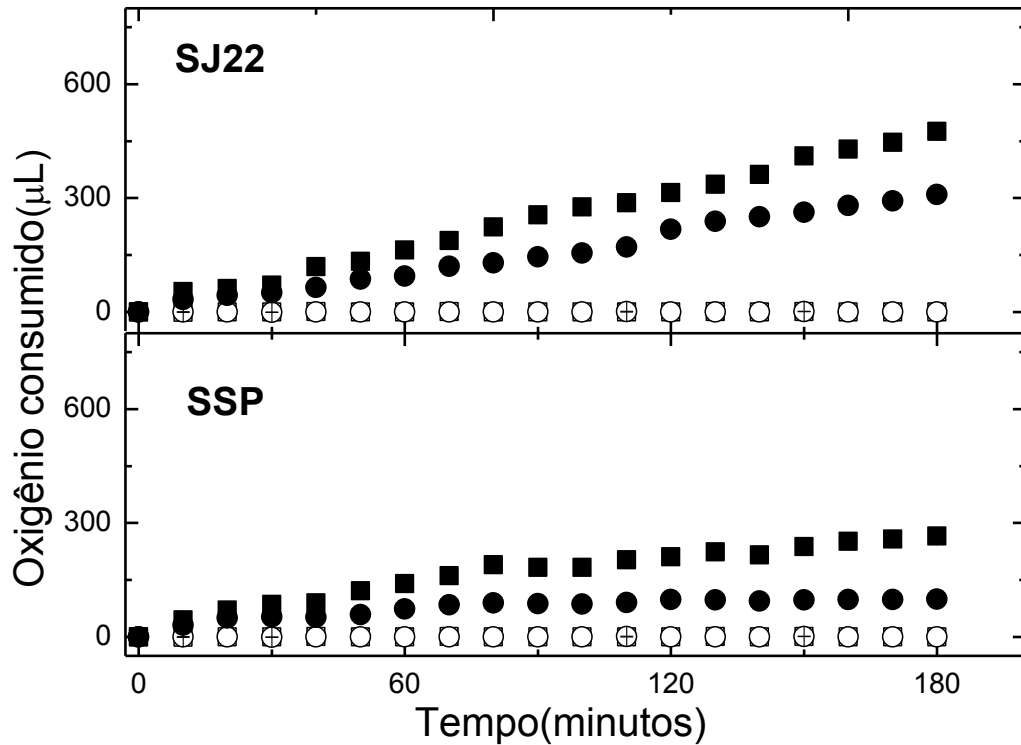


Figura 29. Consumo de O₂ das linhagens de *At. ferrooxidans* (150µg proteínas totais) SJ22 e SSP. Condições: □ controle com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ○ controle com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻, ■ inoculado com 0 mmol L⁻¹ Cl⁻, ● inoculado com 50 mmol L⁻¹ Cl⁻.



Os resultados respirométricos evidenciaram as diferenças entre as linhagens testadas na presença de calcopirita, no entanto não houve uma concordância com os resultados da cinética de oxidação dos íons ferrosos, quando comparados à inibição por cloreto. As linhagens AMF, LR e a V3 não sofreram nenhuma inibição nas condições avaliadas neste experimento.

5.1.3 Ensaio da cinética de oxidação do enxofre na presença de cloreto

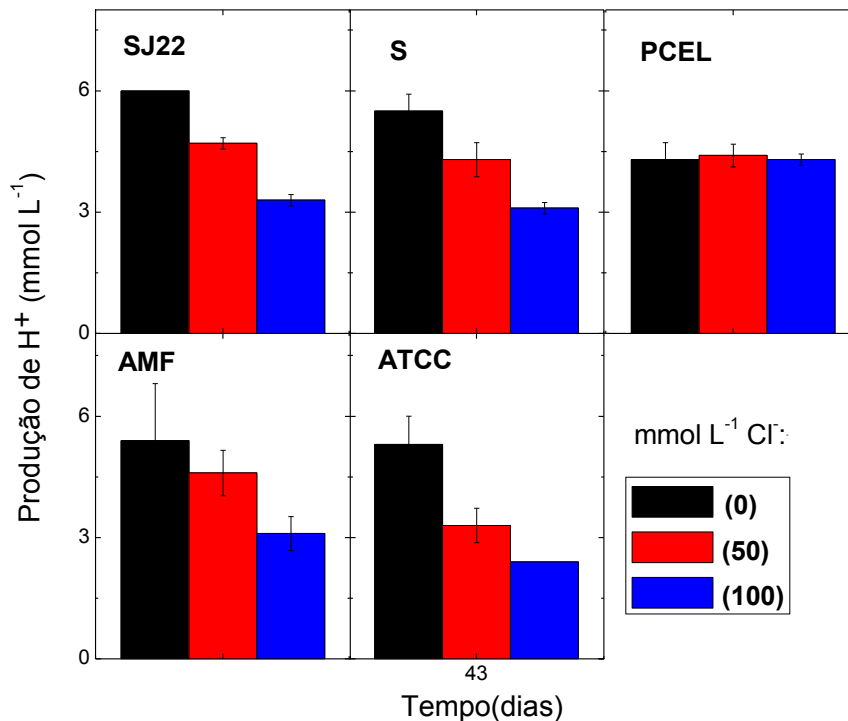
Com base nos resultados respirométricos foram escolhidas as linhagens para o estudo da cinética do enxofre na presença de cloreto.

As linhagens AMF, ATCC, PCEL SJ22 e S foram repicadas três vezes em meio contendo S⁰. Cada repique levou aproximadamente duas semanas até que se

obtivéssemos uma diminuição nos valores de pH do meio (~1,5) o que indica crescimento bacteriano nesse meio. Nos ensaios de cinética de oxidação de enxofre houve um aumento da produção de ácido sulfúrico com o tempo de ensaio, que durou o total de 43 dias. Isto sugeriu que houve oxidação do enxofre elementar presente no meio lixiviante, porém a velocidade de produção do ácido variou para as distintas linhagens e diferentes condições.

Com exceção da PCEL, que produziu ácido igualmente em todas as condições de ensaio e, portanto não mostrou nenhuma inibição quanto à presença dos íons cloreto, as outras linhagens (AMF, ATCC, SJ22 e S) foram inibidas quanto à capacidade de oxidação de enxofre na presença de cloreto (Figura 30).

Figura 30. Produção de ácido em meio contendo S^0 na presença de 0, 50 e 100 mmol L^{-1} de cloreto para as linhagens ATCC, S, AMF, PCEL e SJ22. Foi realizada média e desvio padrão.



Harahuc et al. (2000) demonstrou que células de *At. ferrooxidans* crescidas em íons ferrosos apresentaram maior sensibilidade aos íons cloreto que as mesmas células crescidas em enxofre. Esta última, apresentou maior produção de ácidos na presença de cloreto. As linhagens avaliadas neste trabalho apresentaram tanto inibição da capacidade de oxidação dos íons ferrosos quanto na produção de ácidos, com exceção da linhagem PCEL, que não apresentou inibição evidente.

5.1.4 Ensaios de biolixiviação em frascos agitados

Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa haviam demonstrado que na presença de íons cloreto e *At. ferrooxidans*, linhagem LR, a solubilização de cobre foi aumentada significativamente. Estes estudos foram realizados com concentrações maiores de cloreto (100 e 150 mmol L⁻¹). No presente trabalho, outras linhagens foram avaliadas e a concentração utilizada foi de 50 mmol L⁻¹. Baseamos esta escolha nos resultados obtidos anteriormente nos ensaios de cinética de oxidação na presença de cloreto e nos ensaios respirométricos.

Para todas as linhagens avaliadas, foi observado um ligeiro aumento nos valores de pH nos primeiros dias de ensaio. O pH foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico sempre que necessário. A elevação dos valores do pH pode indicar o consumo de ácido pela amostra mineral, e a diminuição dos valores é estimado pela geração de íons H⁺ através das reações bacterianas de oxidação do sulfeto. Em aspectos gerais, o perfil da variação dos valores de pH das diferentes linhagens foi semelhante. Inicialmente, observamos um aumento do pH, comportamento esperado como já descrito por Bevilaqua et al. (2002) em trabalhos anteriores, devido ao consumo de H⁺ pelas bactérias para oxidação dos íons ferrosos ou pela lixiviação química da calcopirita que ocorrem concomitantemente. Na ausência de cloreto, os frascos inoculados se mantiveram em torno de pH 1,8, sem necessidade de ajustes posteriores (Figuras 31 a 35). Em todas as figuras foram calculados a média e desvio padrão.

Figura 31. Valores de pH obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens PCE e SSP na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

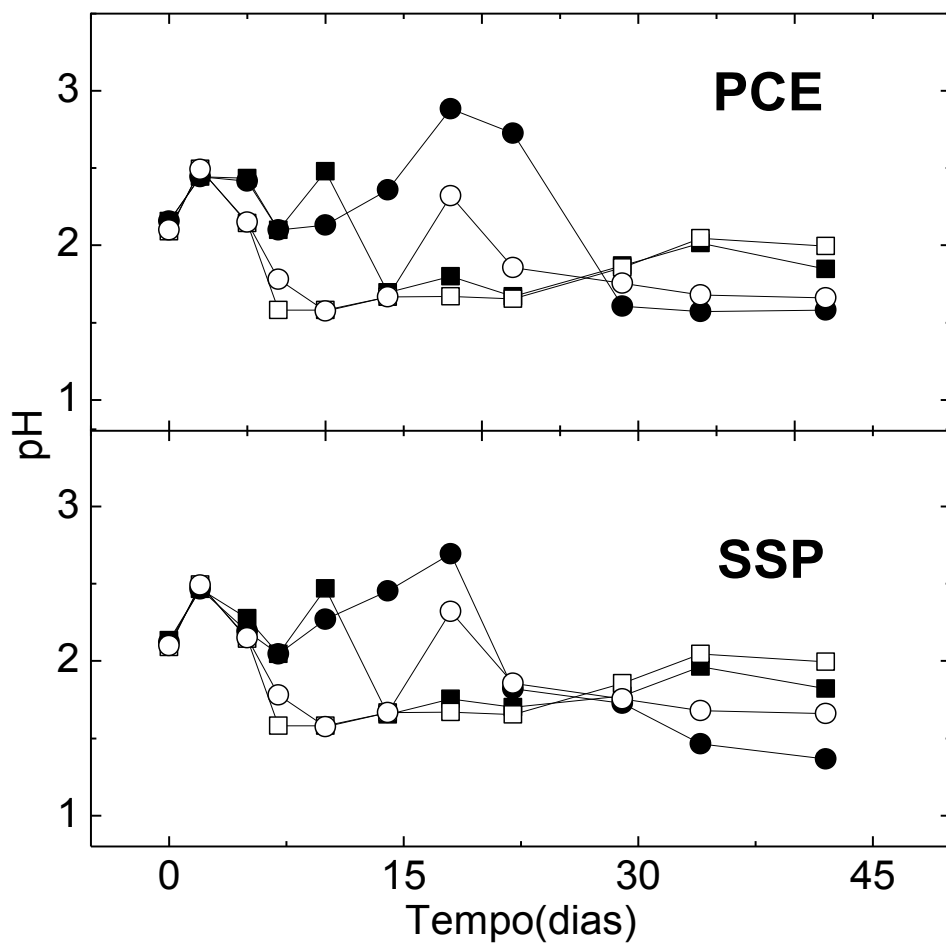


Figura 32. Valores de pH obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens CMV e AMF na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

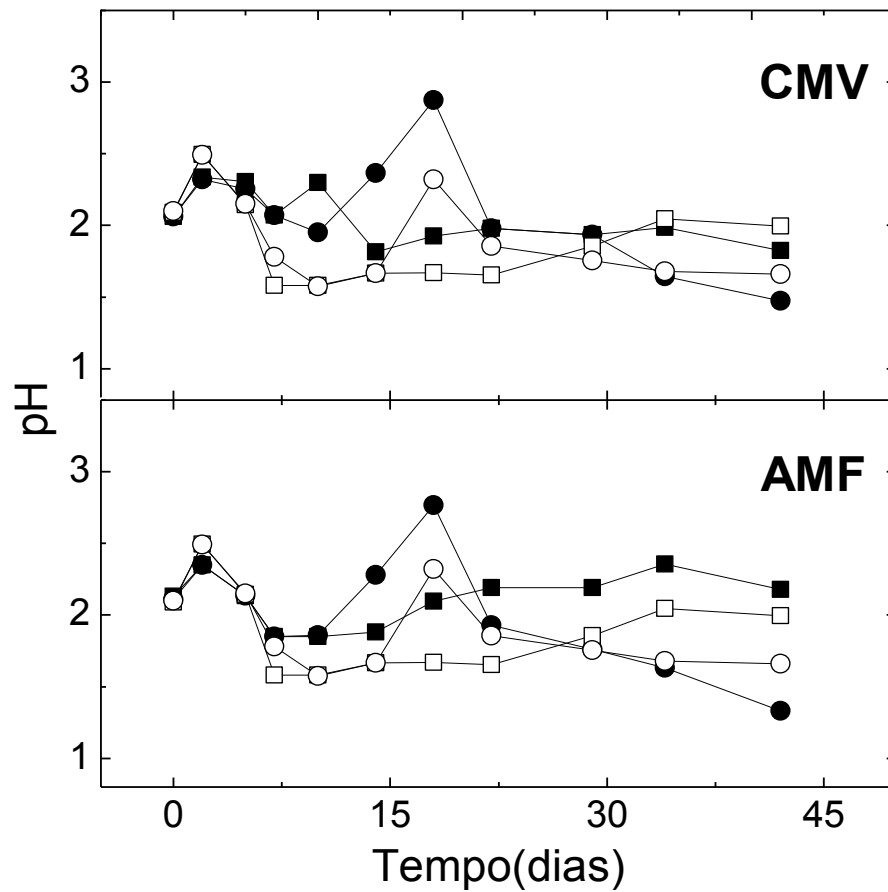


Figura 33. Valores de pH obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens SJ22 e LR na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

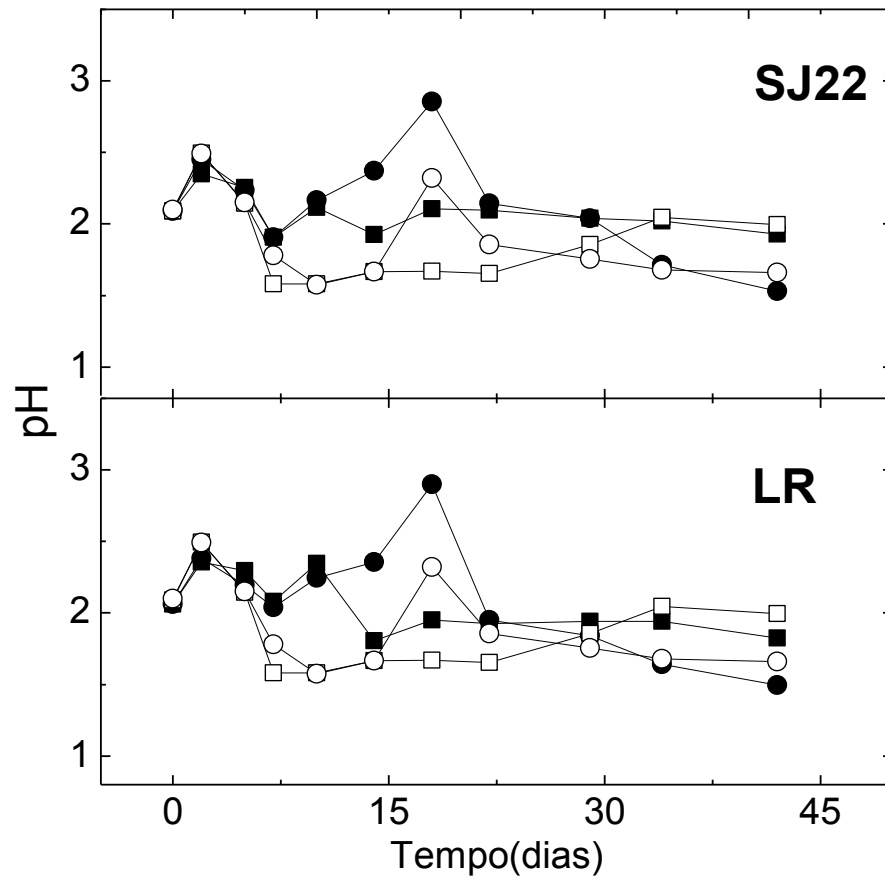


Figura 34. Valores de pH obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens PCEL e S na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

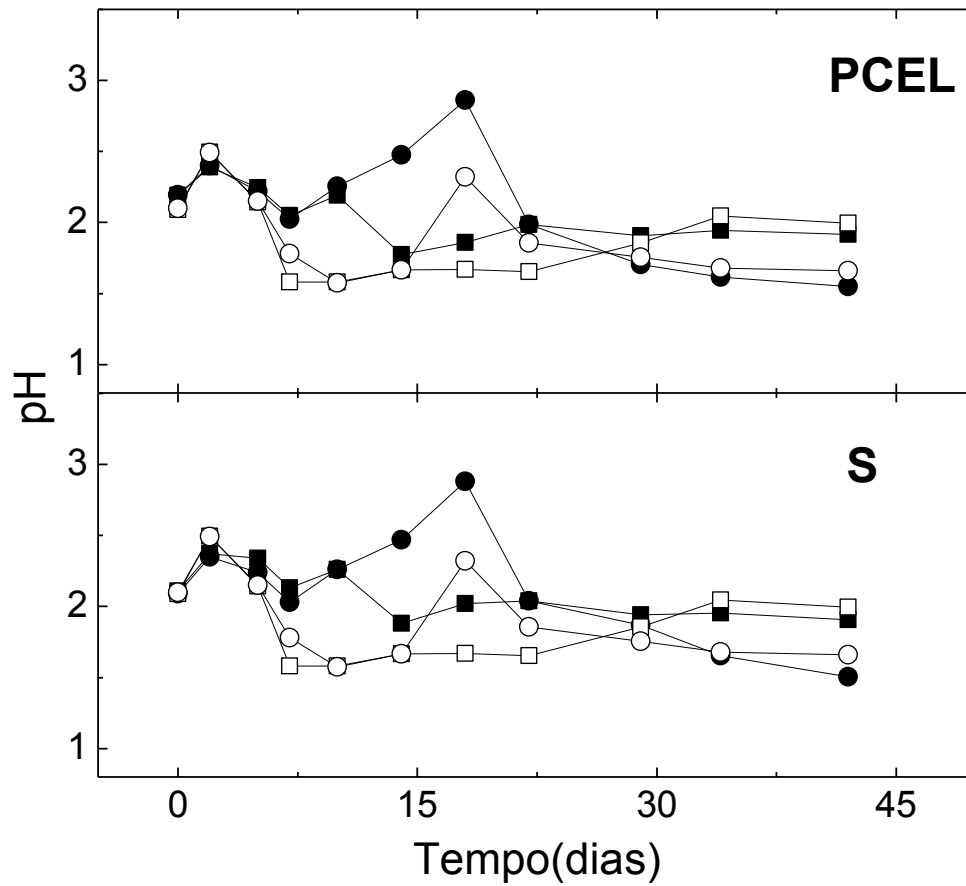
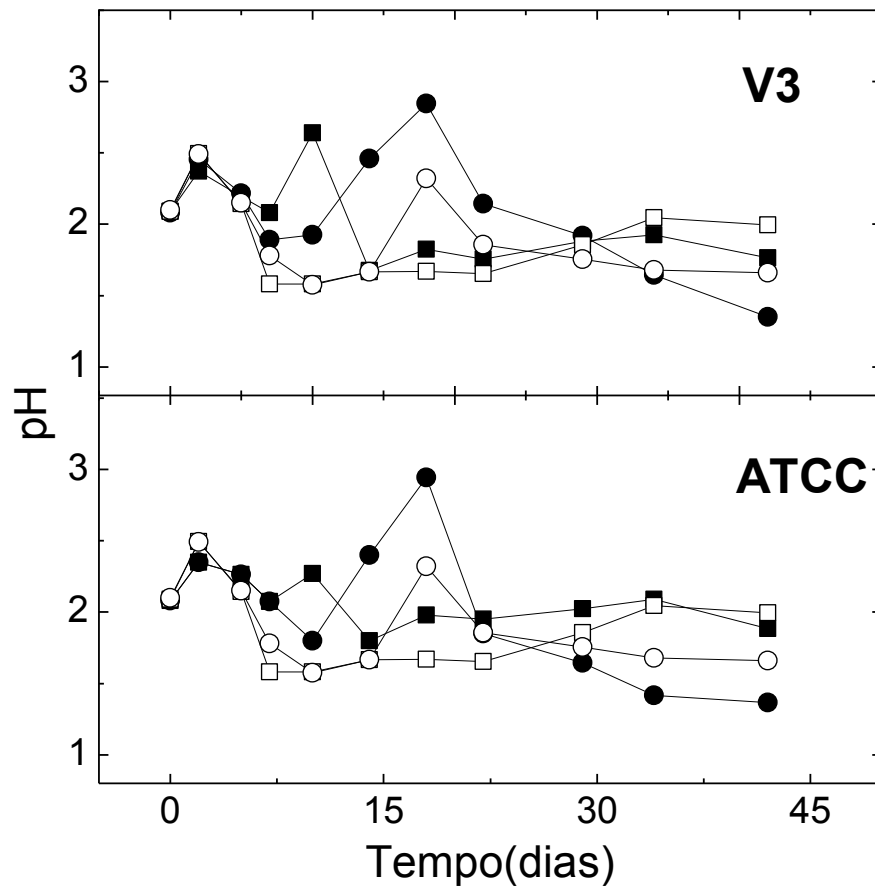


Figura 35. Valores de pH obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens V3 e ATCC na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).



Nas Figuras 36 a 39, observamos a variação do potencial de óxido-redução nos ensaios de biolixiviação em frascos sob agitação com o tempo para todas as linhagens avaliadas. O perfil é muito semelhante para todas as linhagens. Pequenas diferenças foram observadas no início dos experimentos, e provavelmente está relacionada às diferenças nas condições fisiológicas iniciais de cada linhagem após o processo de adaptação a calcopirita e ao cloreto. Nos frascos inoculados, o potencial se elevou até atingir valores próximos a 500 mV por volta de 10 dias de ensaio e se mantiveram praticamente constantes até o final do ensaio. Nos frascos controles o potencial manteve-se ao redor de 350 mV durante todo o ensaio.

Figura 36. Valores de Eh vs ($\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$) obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens SJ22 e LR na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

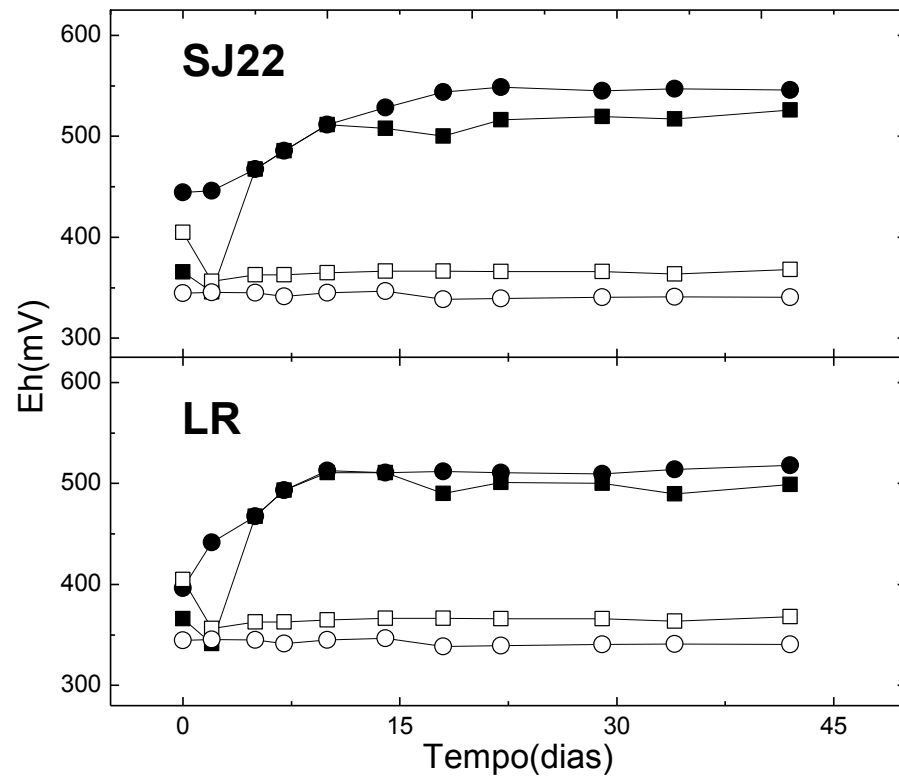


Figura 37. Valores de Eh vs ($\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$) obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens V3 e ATCC na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

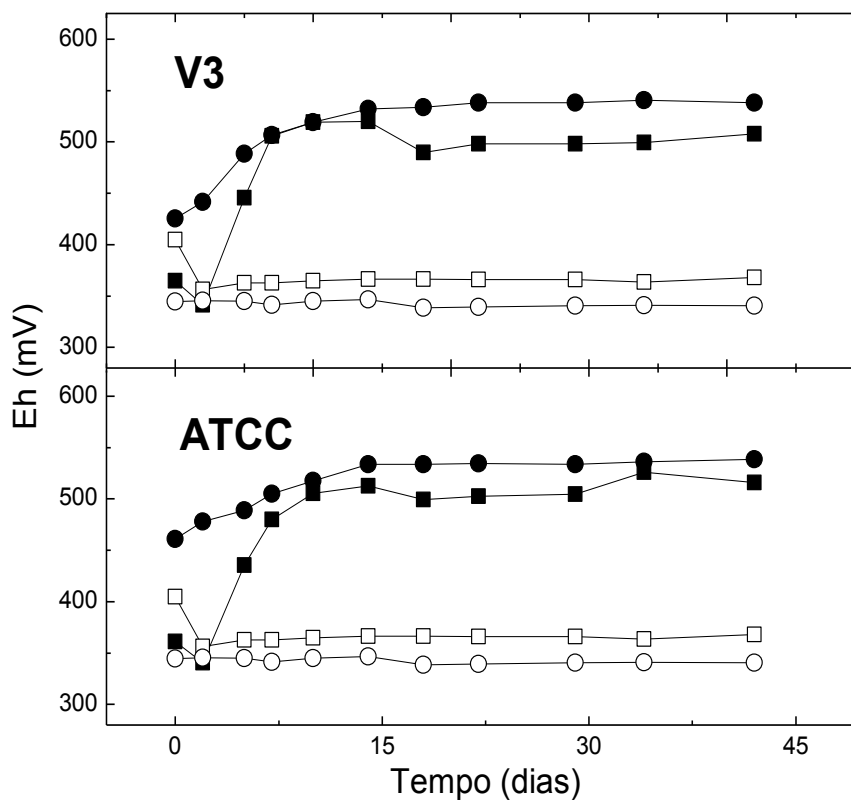


Figura 38. Valores de Eh vs ($\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$) obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens CMV e AMF na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

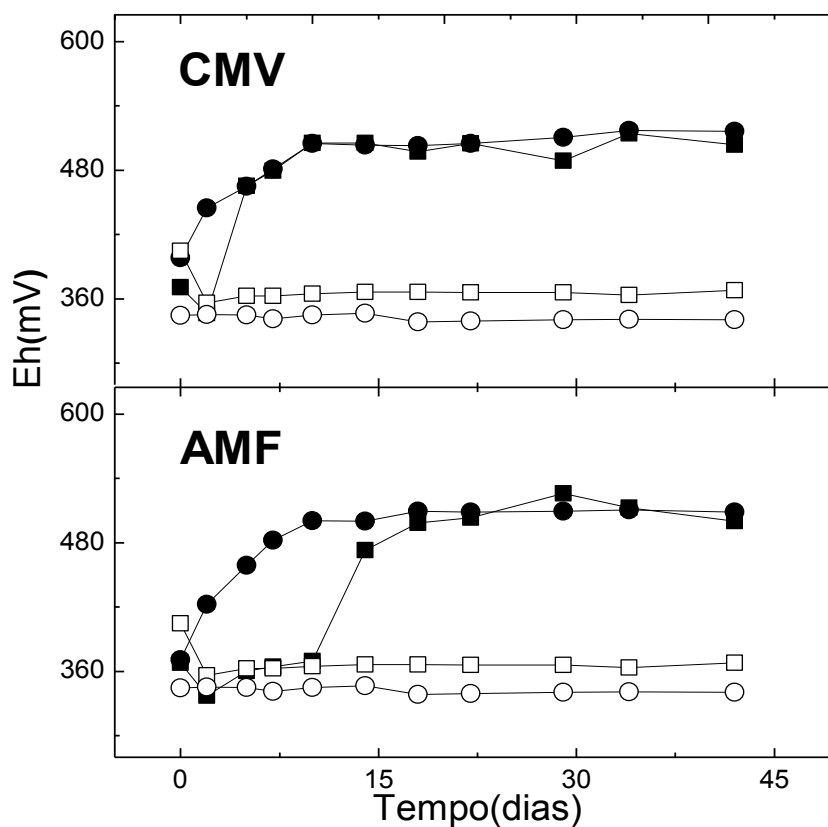
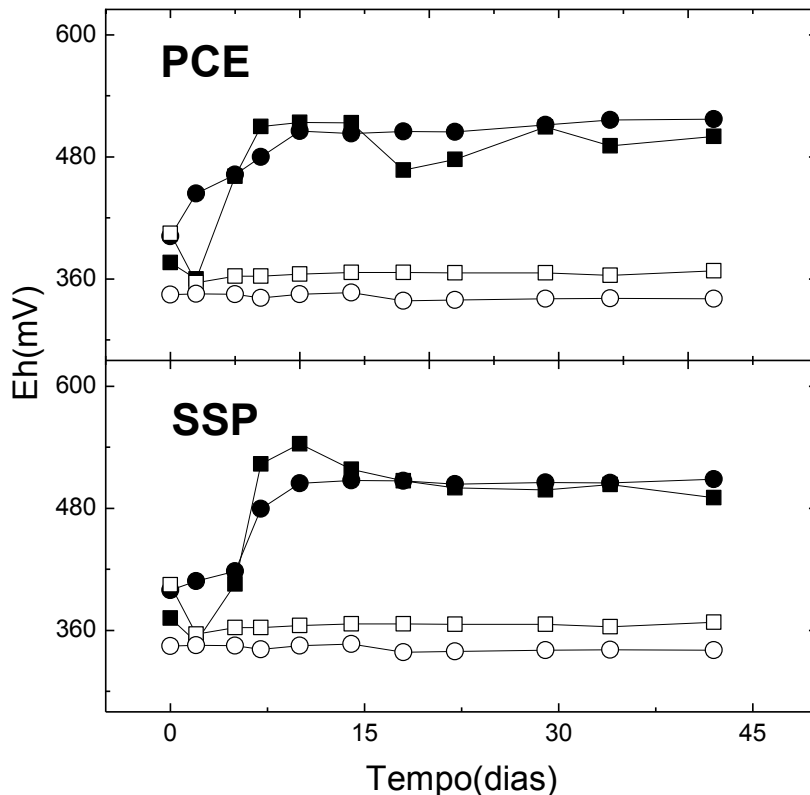


Figura 39. Valores de Eh vs (Ag°/AgCl) obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados das linhagens PCE e SSP na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).



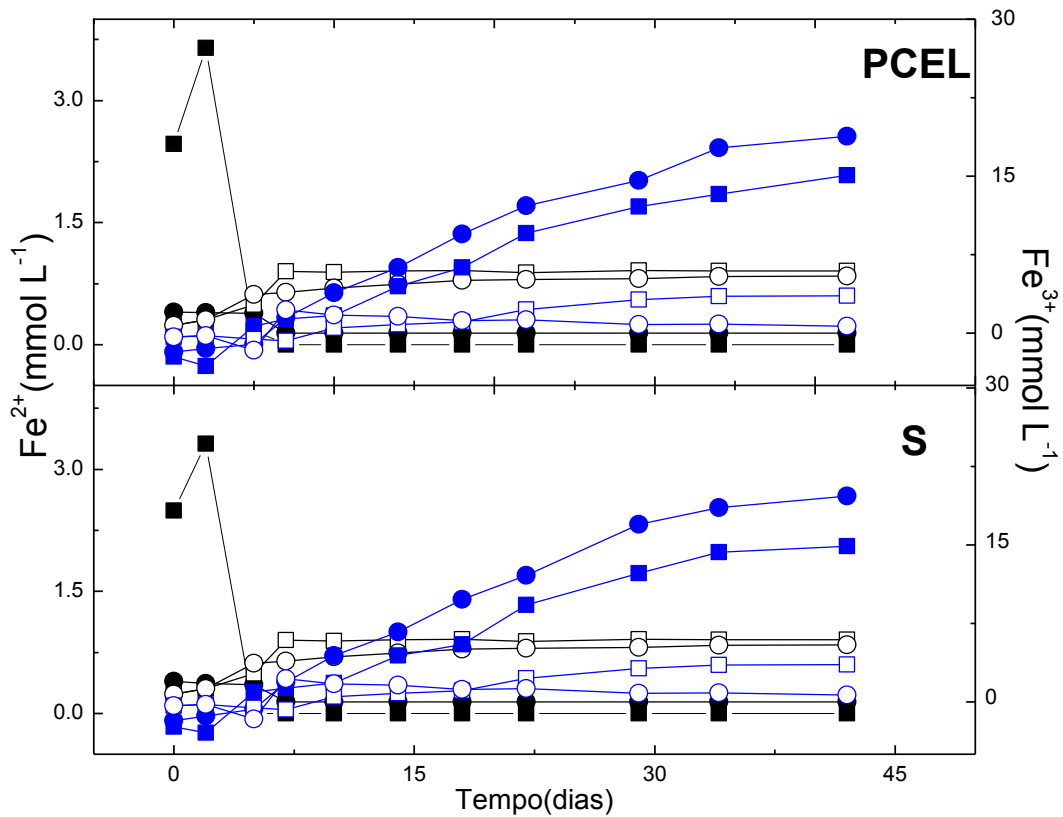
O potencial de óxido-redução de uma solução é a medida da tendência desta solução de ser oxidada ou reduzida, isto é, sua capacidade de capturar ou liberar elétrons. Na presença da bactéria, o potencial da solução é dominado em função do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Em nenhuma das condições deste ensaio foi adicionado íons ferrosos em solução. Podemos dizer, portanto, que esta contínua elevação dos valores de Eh está associado à contínua solubilização dos íons ferrosos provenientes da calcopirita. Como resultado desta ação bacteriana, íons cobre também são solubilizados.

Para todas as linhagens o perfil dos gráficos de concentração dos íons ferrosos e férricos foi semelhante. Nos tratamentos inoculados a concentração de íons ferrosos permaneceu insignificante a maior parte do experimento. A concentração de Fe^{3+} aumentou até cerca de 20 mmol L^{-1} ao final do ensaio, com valores ligeiramente

superiores para os tratamentos inoculados sem adição de cloreto. Nos controles abióticos a concentração dos íons ferrosos e férricos foi muito pequena. A Figura 40 ilustra este comportamento para as linhagens PCEL e S.

Convém ressaltar que nos meios de lixiviação a concentração dos íons férricos em solução pode ser muito menor do que o esperado, uma vez que dependendo das variações de pH que podem ocorrer durante o ensaio, pode ocorrer a precipitação deste íons.

Figura 40. Variação na concentração de Fe^{2+} (símbolos negros) e Fe^{3+} (símbolos azuis) obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados para as linhagens PCEL e S na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50). Foi realizada média e desvio padrão.



Da mesma forma que nos ensaios anteriores, as linhagens apresentaram diferenças quanto à solubilização de cobre na presença e na ausência de íons cloreto. De maneira geral, a presença de cloreto aumentou a solubilização dos íons cobre demonstrado nas Figuras de 41 a 50. Nos frascos controle a solubilização de cobre alcançou cerca de 30% na condição sem cloreto e cerca de 40% na presença de cloreto. Esta recuperação foi cerca de 50% da solubilização de cobre na presença de bactéria, mostrando inequivocamente o papel das bactérias na solubilização do cobre a partir da calcopirita. Em todas as figuras foram calculados a média e desvio padrão.

Analisando individualmente as linhagens foram obtidas porcentagens de recuperação de cobre muito próximas para algumas delas, destacando-se PCEL, V3 e SSP (Figuras 41, 42 e 43, respectivamente). Para as demais linhagens a diferença entre a presença e a ausência do cloreto foi mais significativa (Figuras 44 a 50). Com destaque para a linhagem SJ22 que alcançou aproximadamente 79% de recuperação de cobre no final do ensaio.

Figura 41. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem PCEL na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

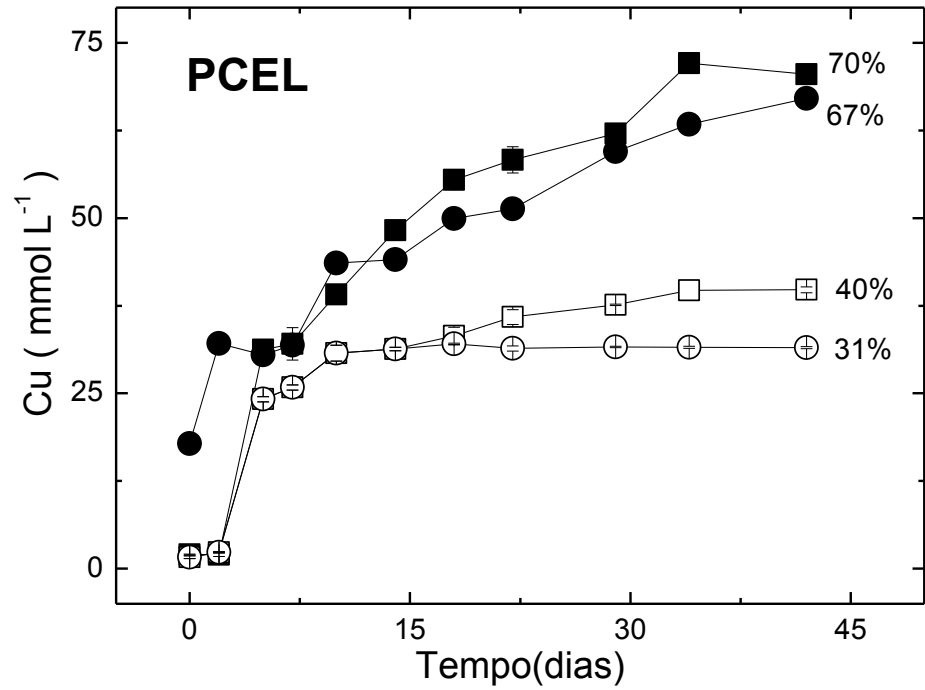


Figura 42. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem V3 na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

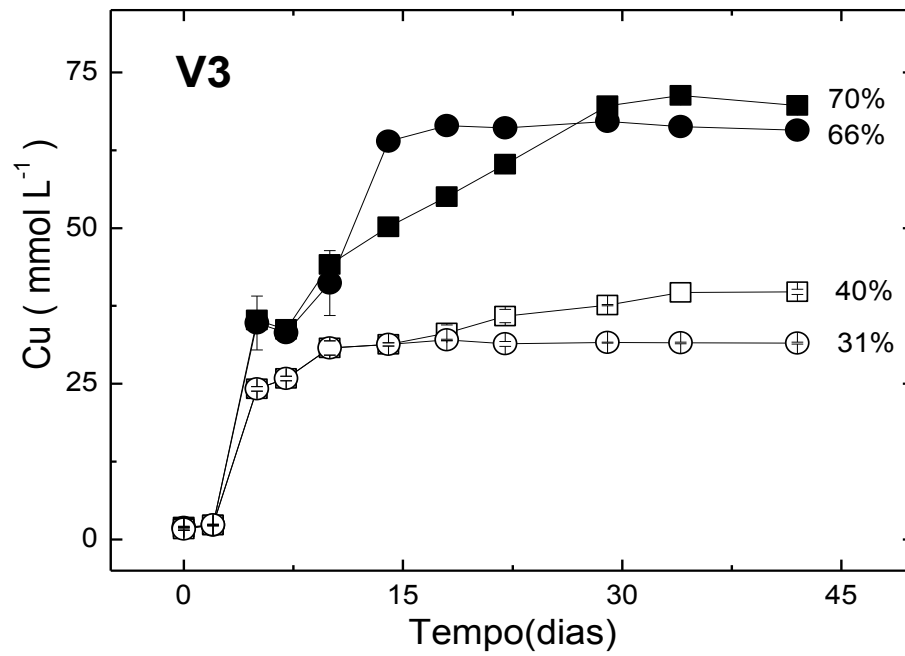


Figura 43. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem SSP na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

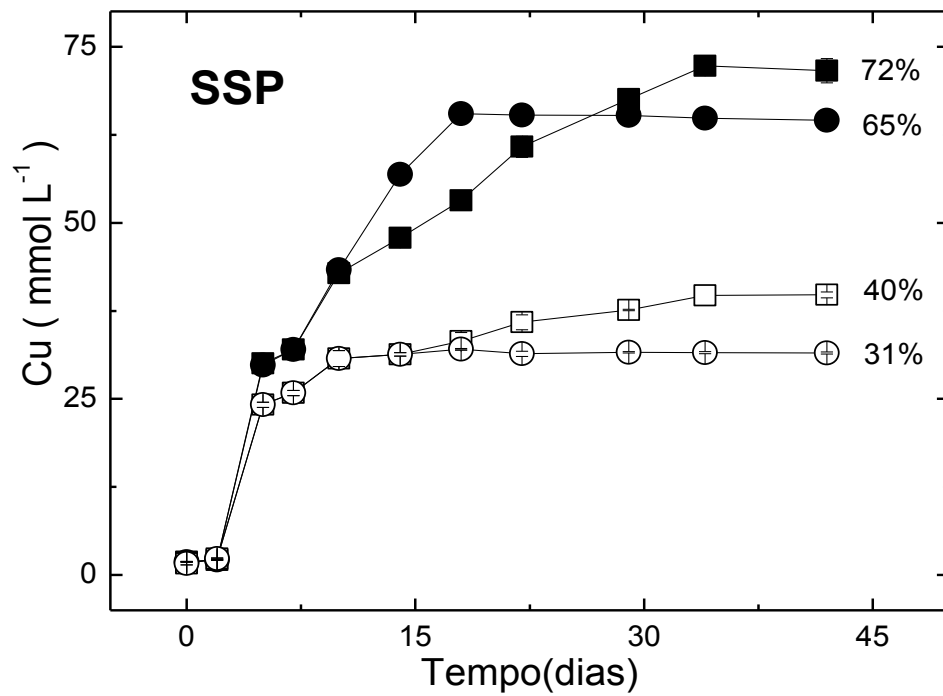


Figura 44. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem S na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

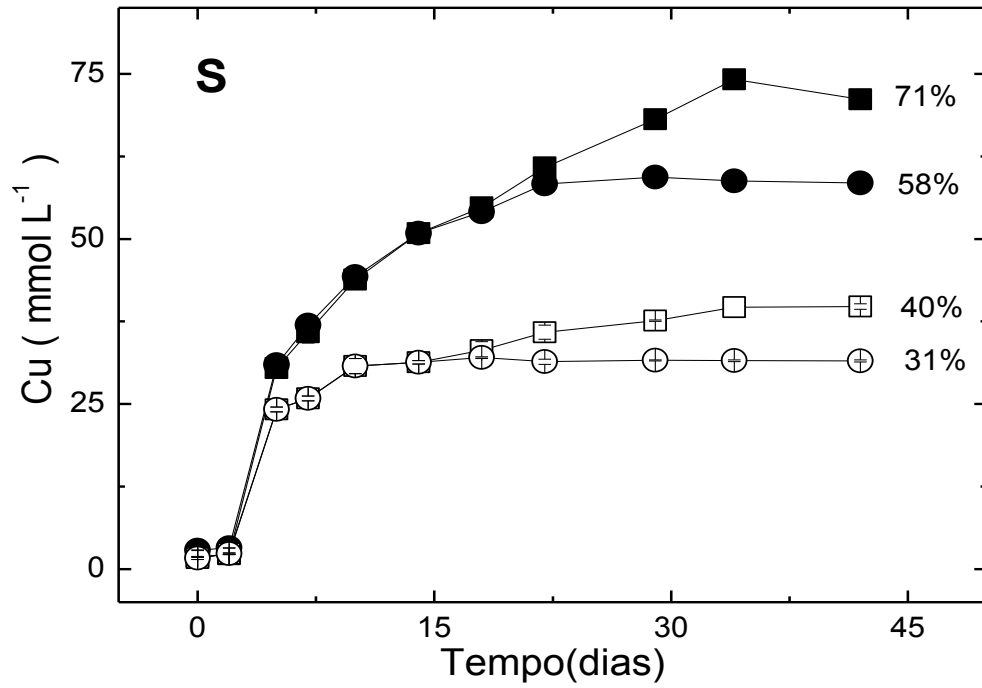


Figura 45. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem SJ22 na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

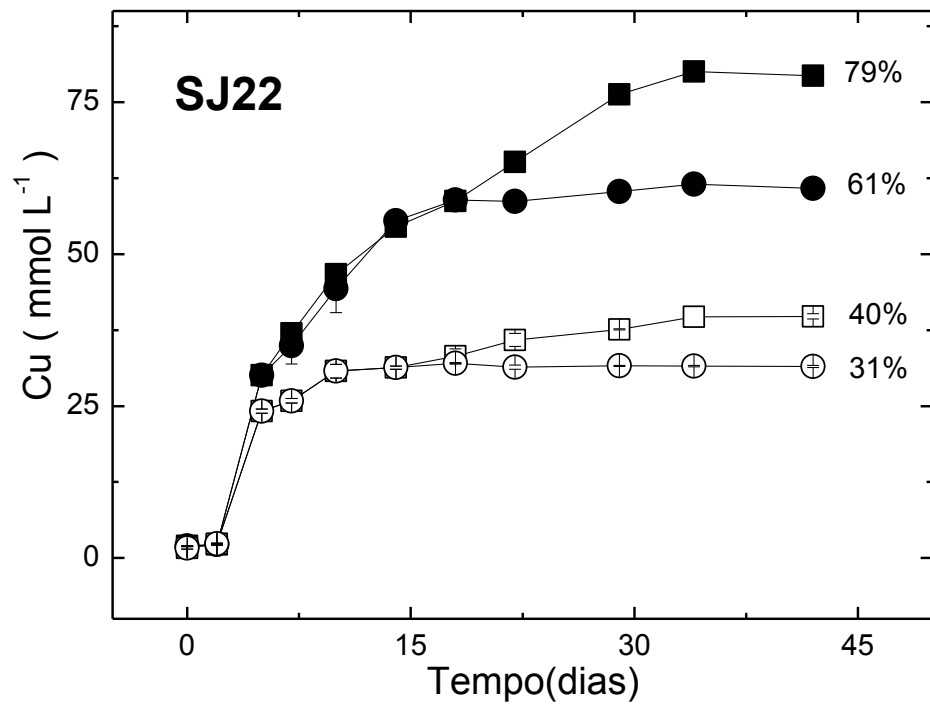


Figura 46. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem LR na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

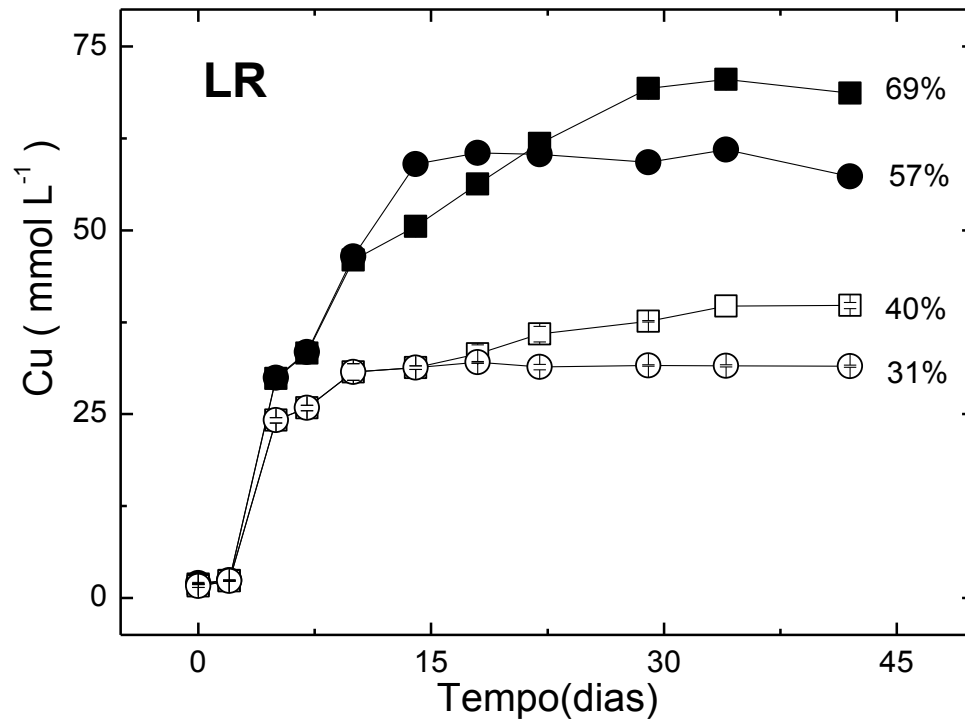


Figura 47. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem ATCC na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

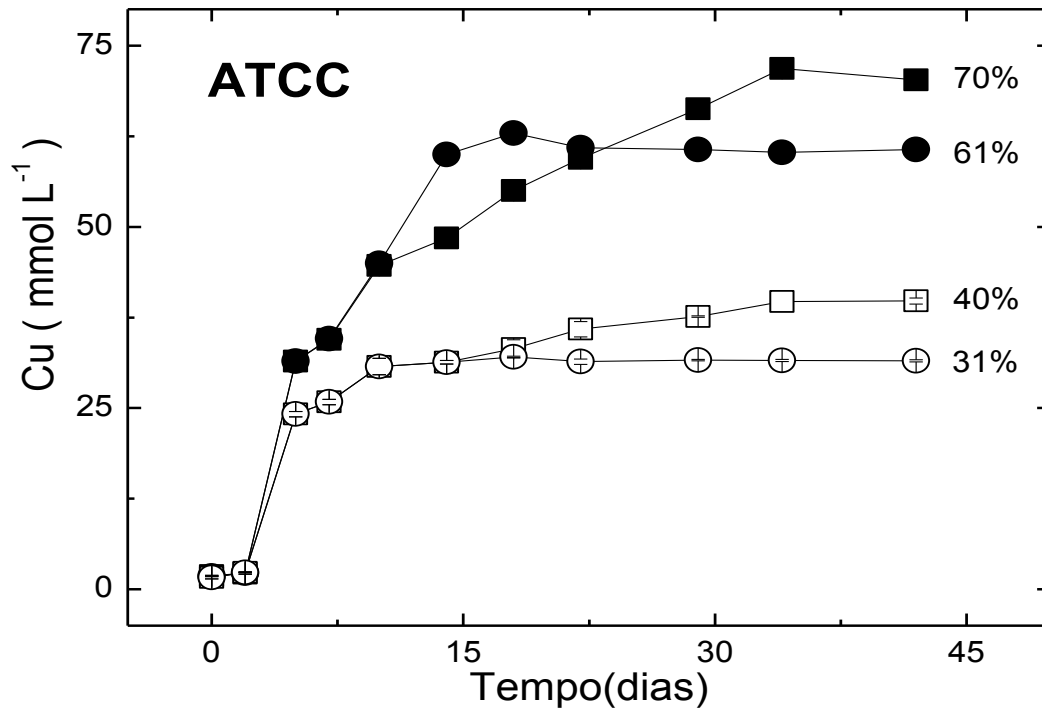


Figura 48. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem CMV na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

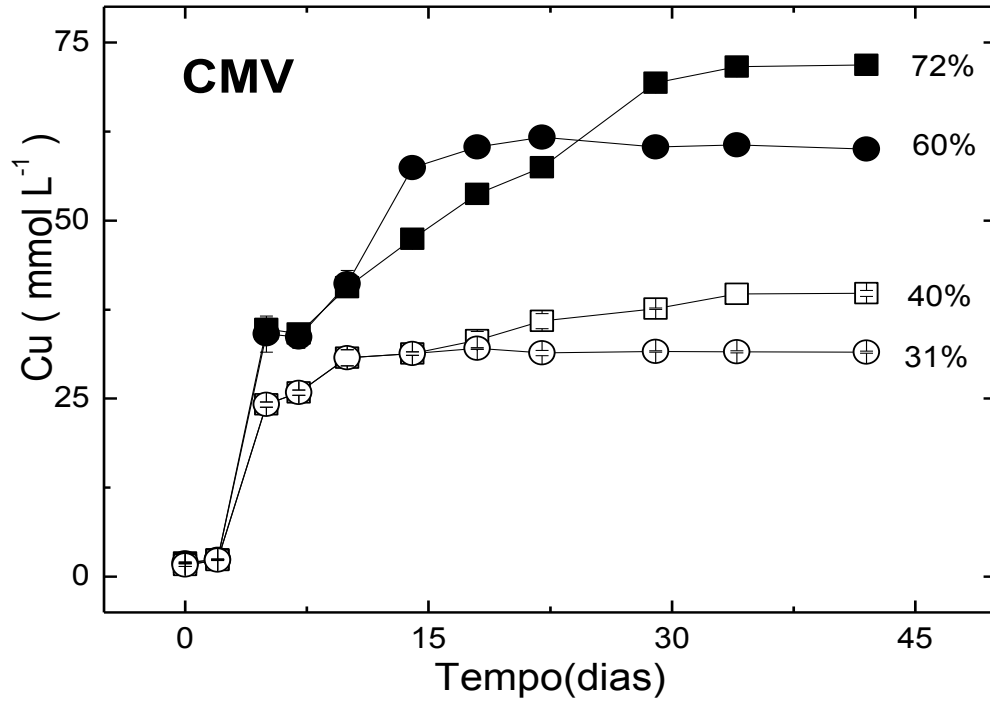


Figura 49. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem AMF na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).

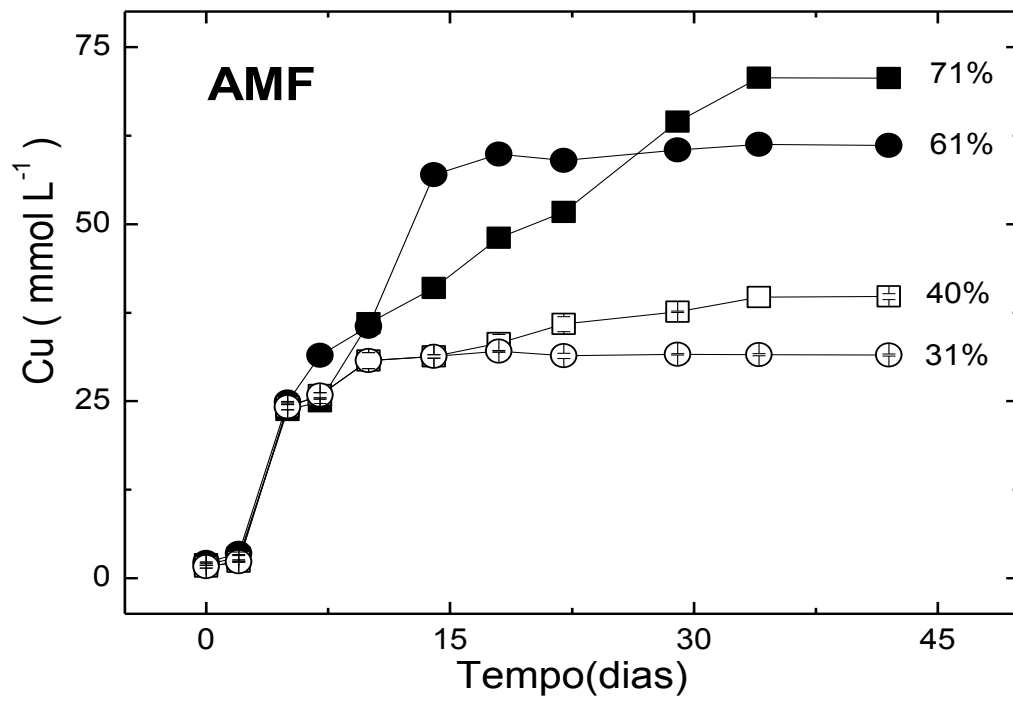
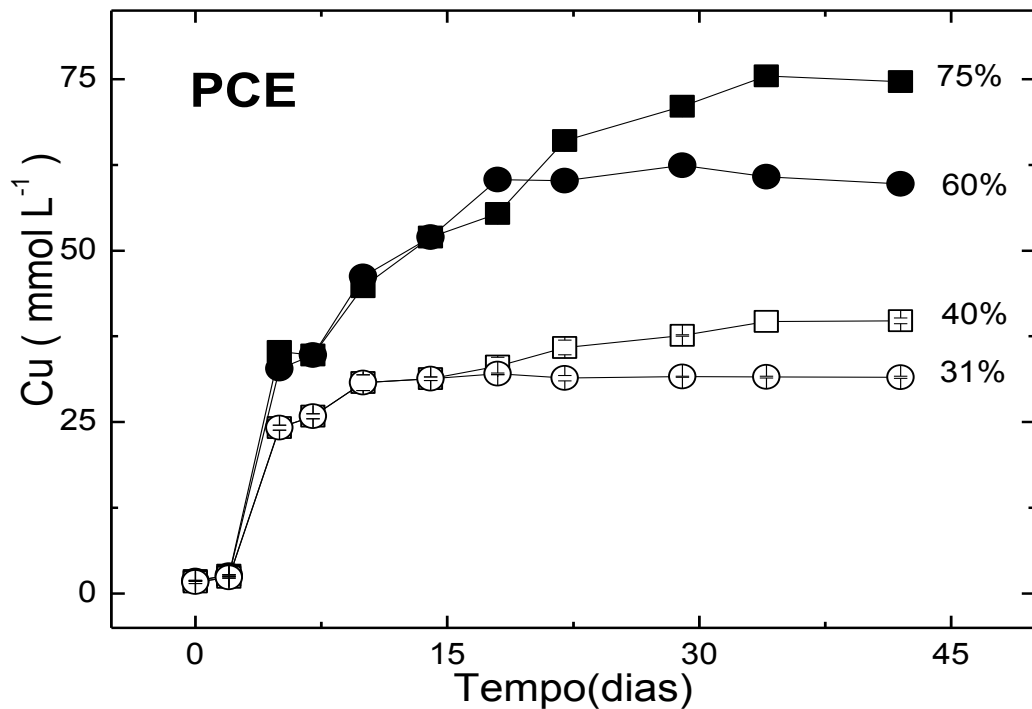


Figura 50. Valores da concentração de cobre obtidos durante os ensaios de biolixiviação em frascos agitados da linhagem PCE na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons cloreto (mmol L^{-1}). Símbolo: ● (0), ■ (50), ○ Controle abiótico (0) e □ Controle abiótico (50).



Estudos têm demonstrado que bactérias adaptadas previamente ao sulfeto promovem uma maior dissolução dos íons metálicos na solução lixiviante. Segundo alguns destes autores, este fato estaria relacionado a uma modificação da parede celular bacteriana e do seu metabolismo para adaptar-se a um novo ambiente e também para garantir a viabilidade da espécie. (MELO, 2010; HORTA, 2008; RAWLINGS, 2005; TRUPTI DAS et al, 1999; ELZEKY; ATTIA, 1995).

Segundo estudo feito por Vakylabad (2011) em condições ideais de pH, Eh e temperatura, a dissolução de cobre a partir de um concentrado de flotação atingiu 87,52% em 9 dias de ensaio na presença de bactéria termófilas moderadas e de 34,55% em 14 dias de ensaio na presença de bactérias mesofílicas, após 25 dias de ensaio. Ao final do experimento após 25 dias de biolixiviação a recuperação de cobre total atingiu 92,00%, com as bactérias termofílicas moderadas e 73,27% com as

bactérias mesofílicas. No presente trabalho as linhagens mesofílicas na ausência de cloreto atingiram taxas de recuperação de cobre entre 57-68% dependendo da linhagem utilizada.

Analisando individualmente cada linhagem obtivemos uma porcentagem de recuperação de cobre muito próxima para algumas linhagens. A velocidade de dissolução não foi bastante significativa em relação à presença ou ausência de cloreto, já a recuperação de cobre aumentou para algumas linhagens com adição de 50 mmol L⁻¹ cloreto, dentre elas S, SJ22, LR, ATCC, CMV, AMF e PCE. Alguns autores (WINAND, 1991; CARNEIRO, LEÃO, 2007) anteriormente descreveram que a presença de Cu²⁺ acelera a solubilização da calcopirita em lixiviação sem a presença de bactérias e em meios com cloreto, devido à formação de complexos, além de modificar a superfície mineral.

Enquanto que a intenção de introduzir íons cloreto no meio de lixívia seria de aumentar a taxa de dissolução da calcopirita e conseqüente aumento da solubilização do cobre, isso só foi observado para algumas linhagens que tiveram melhor solubilização de cobre na presença de cloreto. Como podemos observar com os gráficos que foram apresentados (Figuras 41 a 50).

De acordo com estudos apresentados por Liang et al. (2012) a biolixiviação da calcopirita com adição de cloreto de sódio promove uma aceleração da dissolução deste sulfeto, por reduzir o acúmulo de enxofre elementar sobre a superfície do mineral, resultando num aumento da concentração dos íons de cobre de 37 mmol L⁻¹ para 42 mmol L⁻¹, o aumento da recuperação de cobre foi observado mas os valores são bastante próximos. Eles ainda encontraram nos resíduos da biolixiviação jarosita e enxofre elementar, mas a quantidade de enxofre elementar acumulado na superfície mineral diminuiu drasticamente de 25,4% para 3,0% na presença de 11,2 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio durante o ensaio.

De acordo com os dados obtidos com a literatura e comparados a esse trabalho todos os frascos mostraram uma porcentagem de recuperação de cobre na presença dos íons cloreto mais elevada quando comparada a ausência de cloreto, e das linhagens a que mais se destacou foi a SJ22 que atingiu 79% de cobre solubilizado na presença de 50mmol L⁻¹ Cl⁻ e 61% ausência de cloreto.

5.1.5 Ensaio de biolixiviação da calcopirita com adições sucessivas de íons cloreto (10 mmol L⁻¹ e 20 mmol L⁻¹)

Estudos eletroquímicos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa revelaram que imediatamente após a adição de íons cloreto o sistema sofre uma perturbação com elevação nos níveis de corrente e diminuição da resistência (HORTA, 2008). Observou-se também que a adição de pequenas quantidades de íons cloreto provocava uma perturbação maior que a adição da mesma quantidade de cloreto de uma só vez. Desta maneira, este ensaio foi elaborado de maneira que pudéssemos comparar com o ensaio anterior, onde a concentração de cloreto foi à mesma desde o início. Foram realizadas duas sequências de ensaios para cada linhagem, com adição de 10 mmol L⁻¹ em uma sequência e de 20 mmol L⁻¹ para a outra sequência, conforme esquematizado na Tabela 9. A concentração final de cloreto para a primeira sequência foi de 40 mmol L⁻¹ e para a segunda sequência foi de 60 mmol L⁻¹.

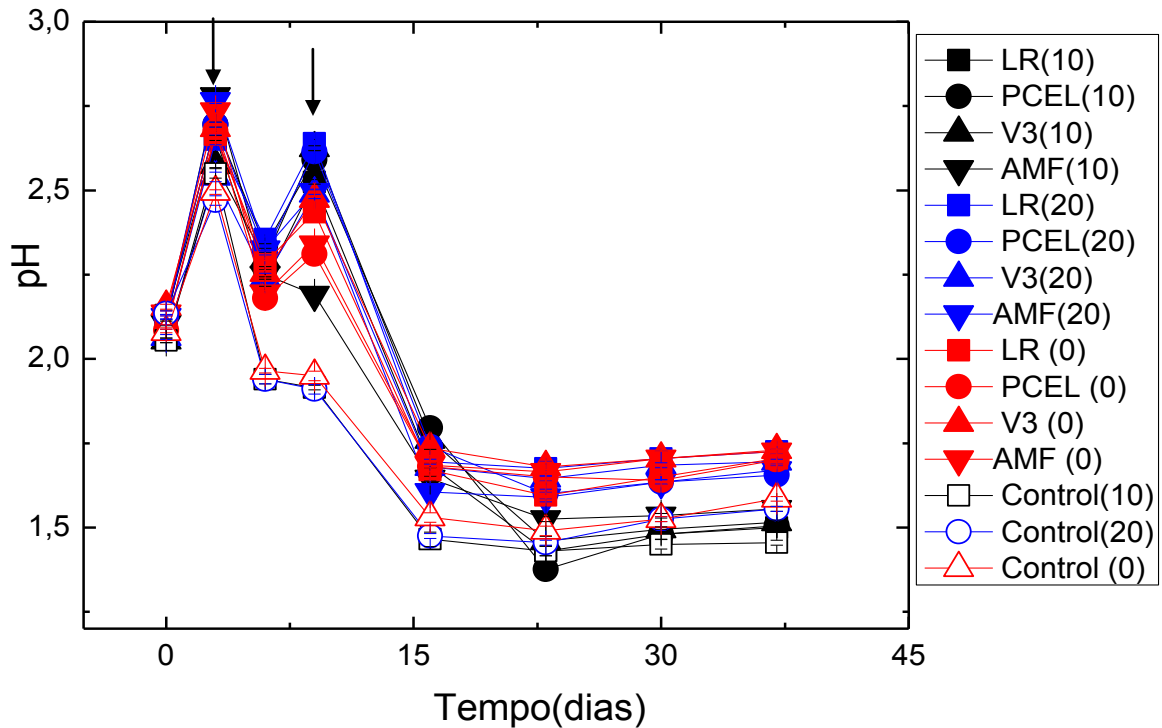
Tabela 9. Concentração final de cloreto em função do tempo nos ensaios de adições sucessivas

Tempo(dias)	Adições de 10mmol L ⁻¹ Cl ⁻	Concentração final de Cl ⁻	Adições de 20mmol L ⁻¹ Cl ⁻	Concentração final de Cl ⁻
0	X	10mmol L ⁻¹	X	20mmol L ⁻¹
3	X	20mmol L ⁻¹	X	40mmol L ⁻¹
6	X	30mmol L ⁻¹	X	60mmol L ⁻¹
9	-	30mmol L ⁻¹	-	60mmol L ⁻¹
16	-	30mmol L ⁻¹	-	60mmol L ⁻¹
24	X	40mmol L ⁻¹	-	60mmol L ⁻¹
37	-	40mmol L ⁻¹	-	60mmol L ⁻¹

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Da mesma maneira que no ensaio anterior houve um consumo inicial de ácido. O pH foi ajustados para 1,8 com ácido sulfúrico no 3° e no 9° dia de ensaio, não sendo mais necessários ajustes posteriores, e o tempo total de ensaio foi de 37 dias. O pH final para os frascos inoculados foi ligeiramente maior que nos frascos abióticos (Figura 51).

Figura 51. Variação de pH no ensaio de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto (mmol L^{-1}): 0 (símbolos vermelhos), 10 (símbolos negros) e 20 (símbolos azuis). As setas indicam o momento da correção ácida. Foi realizada média e desvio padrão.

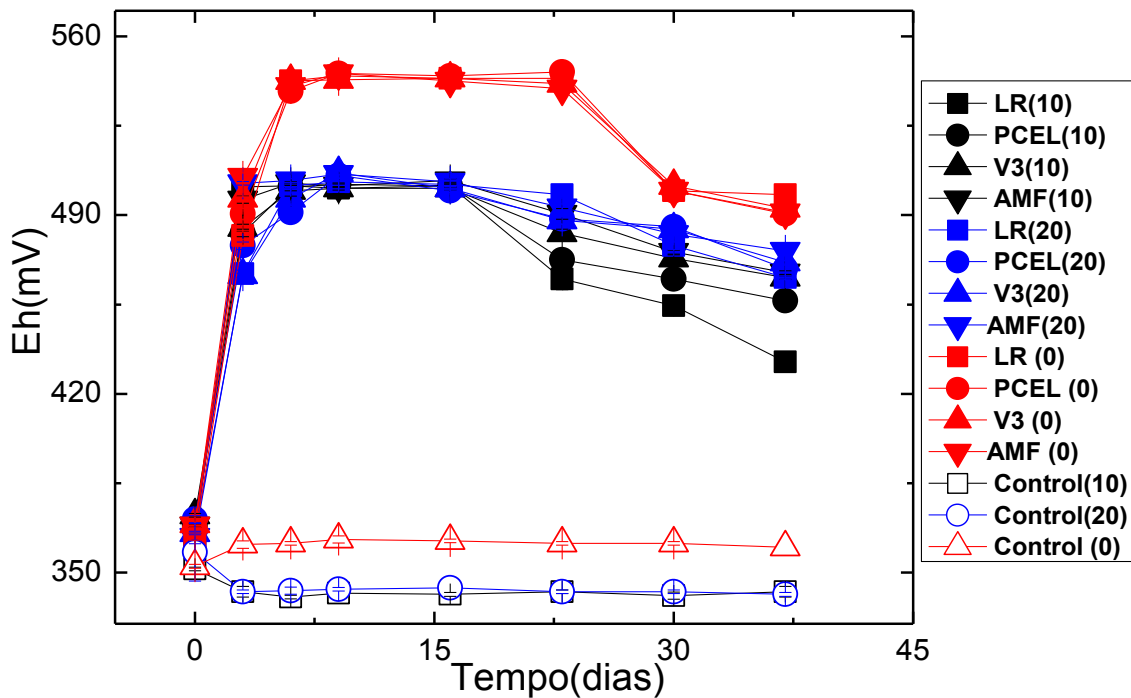


Os valores do potencial de óxido-redução (Eh) se elevaram continuamente nos frascos inoculados, estabilizando em torno de 500 mV para a sequência com adição de 10 mmol L^{-1} de cloreto e 550 mV para a sequência com adição de 20 mmol L^{-1} de cloreto. Nos frascos abióticos permaneceram constantes ao redor de 350 mV (Figura 52).

Posteriormente, a acidez é aumentada, devido à oxidação do enxofre elementar pelos micro-organismos oxidantes de enxofre, este enxofre não precipitando, não passiva a biolixiviação da calcopirita.

Kinnunen e Puhakka (2004) demonstraram que na presença de cloreto em meio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ pode ocorrer uma diminuição do Eh, dependendo da concentração de cloreto presente no meio.

Figura 52. Variação de Eh vs ($\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$) no ensaio de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto mmol L^{-1} : 0 (símbolos vermelhos), 10 (símbolos negros) e 20 (símbolos azuis). Foi realizada média e desvio padrão.



Para a variação de cobre, Figuras 53-56, podemos observar que nos frascos inoculados os valores de extração foram maiores para algumas linhagens (PCEL e V3). Nestas figuras foram realizadas a média e o desvio padrão.

Figura 53. Variação do valor da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto (mmol L^{-1}) em dias consecutivos da linhagem LR. Símbolos: ■ (10), ● (20) e ▲ (0) e símbolos abertos seus respectivos controles.

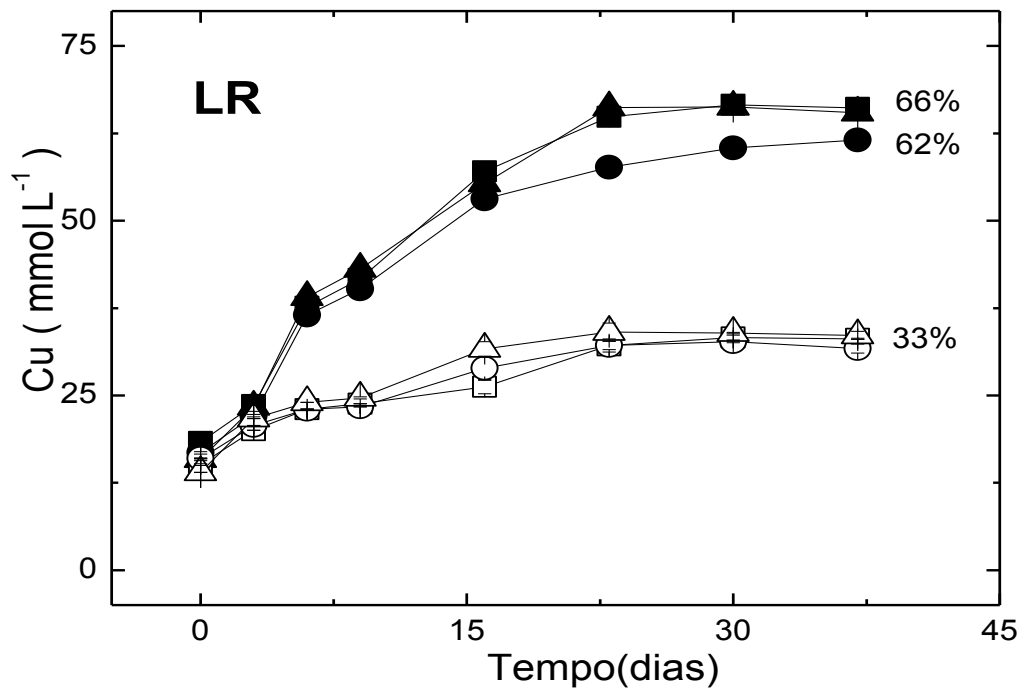


Figura 54. Variação do valor da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto (mmol L^{-1}) em dias consecutivos da linhagem PCEL. Símbolos: ■ (10), ● (20) e ▲ (0) e símbolos abertos seus respectivos controles.

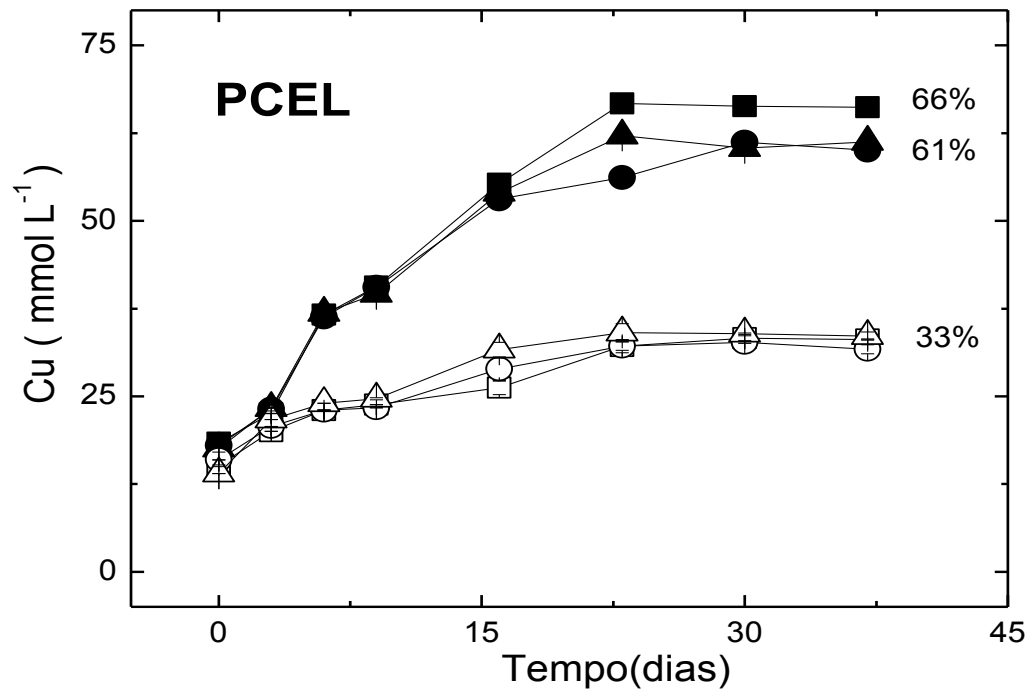


Figura 55. Variação do valor da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto (mmol L^{-1}) em dias consecutivos da linhagem V3. Símbolos: ■ (10), ● (20) e ▲ (0) e símbolos abertos seus respectivos controles.

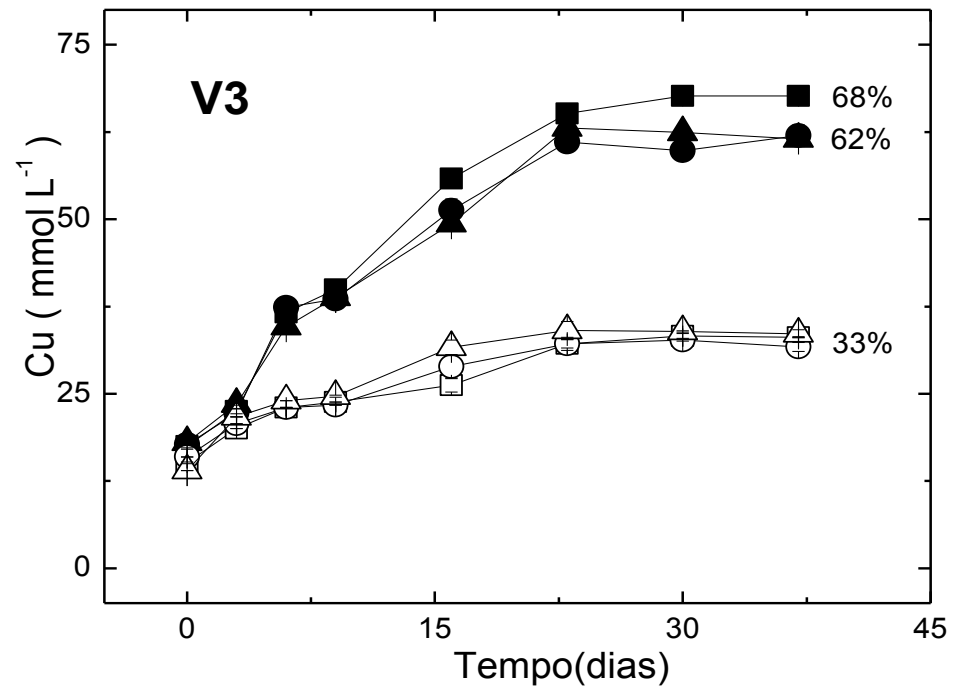
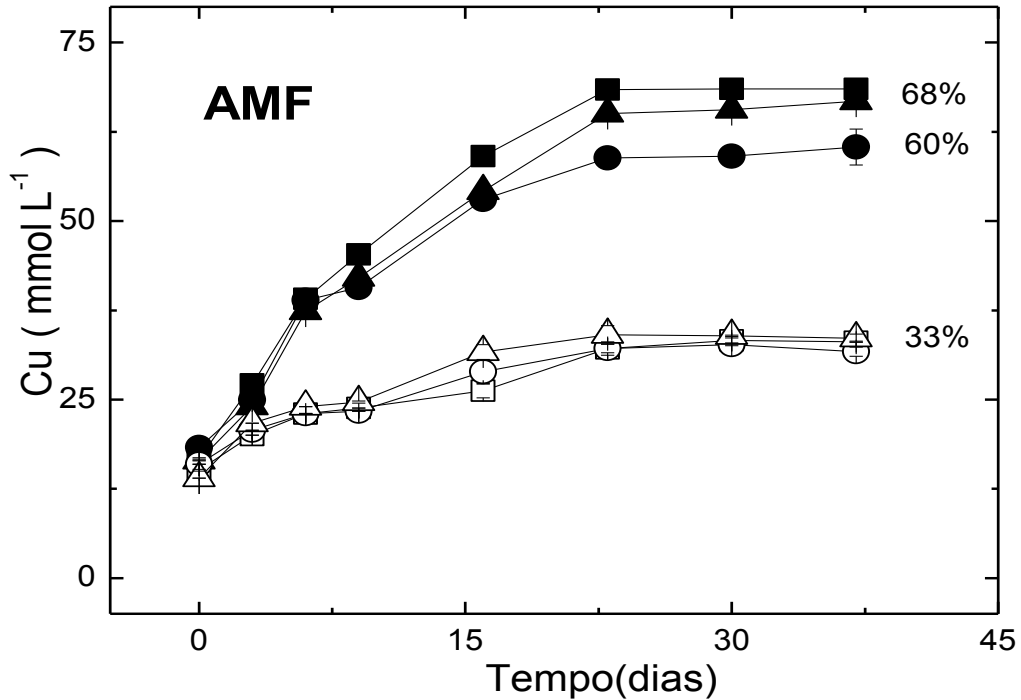


Figura 56. Variação do valor da concentração de cobre nos ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto (mmol L^{-1}) em dias consecutivos da linhagem AMF. Símbolos: ■ (10), ● (20) e ▲ (0) e símbolos abertos seus respectivos controles.



Os valores de solubilização de cobre do ensaio com adições sucessivas de cloreto foram inferiores ao ensaio de biolixiviação em frascos agitados, realizado com 50 mmol L^{-1} para todas as linhagens testadas (68% e 79%, respectivamente).

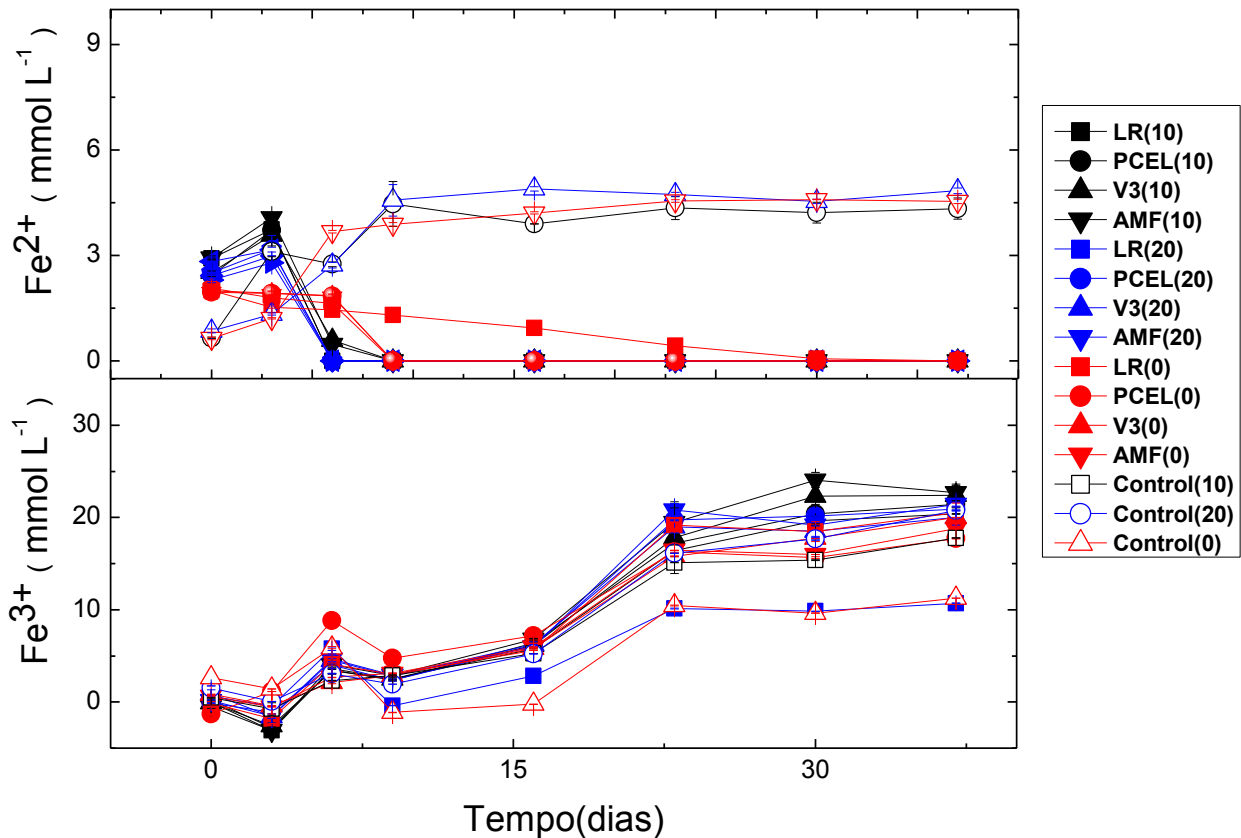
Foi demonstrado por Dopson et al. (2003) que linhagens bacterianas acidófilicas podem sobreviver em concentrações de cloreto superiores a 200 mmol L^{-1} juntamente com altas concentrações de íons cobre ($> 300 \text{ mmol L}^{-1}$). Os valores de concentrações de cobre e cloreto no presente trabalho foram muito inferiores a esses valores e, portanto não podemos atribuir essa menor recuperação de cobre a qualquer tipo de inibição bacteriana. O propósito de adicionar íons cloreto ao meio de lixiviação foi o de promover um aumento na solubilização de cobre a partir da calcopirita. Porém, nas condições realizadas neste trabalho não foi observado um aumento significativo nesta solubilização, principalmente quando comparamos com resultados anteriores (MELO,

2010; BEVILAQUA et al., 2013), em que a adição de cloreto resultou em um aumento maior do que 50% na recuperação de cobre. Atribuímos essa diferença significativa entre os ensaios ao período de adaptação aos quais as bactérias foram submetidas antes do início dos ensaios de biolixiviação em frascos. No presente trabalho este período foi significativamente menor que nos ensaios realizados anteriormente, 15 dias, enquanto nos ensaios anteriores o período de adaptação se estendeu por 3 meses.

Gahan et al. (2009) estudaram a oxidação da pirita em meios com diferentes concentrações de cloreto, a formação de precipitados de jarosita e o efeito tóxico provocado nos micro-organismos com a adição desses íons, demonstrando a influência desses no meio de lixívia. Os íons cloreto na concentração de 4 g L^{-1} foram letais para os micro-organismos. Com a adição de 2 g L^{-1} de cloreto houve formação de precipitados de jarosita. A adição de 3 g L^{-1} desses íons no qual provocou um choque temporário nos micro-organismos, mas a atividade foi recuperada após um curto período de tempo. A concentração utilizada no presente trabalho foi de aproximadamente 2 g L^{-1} e de fato não apresentaram formação de jarosita, como também foi observado em Bevilaqua et al. (.2013).

As concentrações de íons ferrosos e férricos neste ensaio se assemelham muito ao ensaio anterior (Figura 57). Nos tratamentos inoculados a concentração de íons ferrosos permaneceu insignificante a maior parte do experimento. Nos frascos abióticos a concentração de íons ferrosos se manteve em torno de 5 mmol L^{-1} . A concentração de Fe^{3+} aumentou até cerca de 20 mmol L^{-1} ao final do ensaio nos ensaios inoculados e atingiu cerca de 10 mmol L^{-1} nos frascos abióticos.

Figura 57. Variação da concentração de Fe^{2+} e Fe^{3+} nos ensaios de biolixiviação com adições sucessivas de cloreto mmol L^{-1} : 0 (símbolos vermelhos), 10 (símbolos negros) e 20 (símbolos azuis) em dias consecutivos.



5.2 Análise dos Resíduos sólidos finais dos ensaios de biolixiviação da calcopirita

Durante o ensaio de biolixiviação dos sulfetos minerais, podem ocorrer mudanças nas características dos compostos sólidos, observadas com a formação de novas fases (amorfas ou cristalinas) e também por um aumento na concentração de numerosos elementos na solução de lixivia, como pode haver o desaparecimento de

alguns compostos da amostra natural utilizada. Com isso os resíduos finais foram analisados com Difração de Raios X, para avaliarmos as transformações de fase no processo de biolixiviação. O difratograma da amostra original já foi apresentado na Figura 6.

O perfil apresentados nos difratogramas foram semelhantes para todas as linhagens, não demonstrando formação de novas fases cristalinas na presença de íons cloreto (Figuras 58 e 59). Na ausência destes íons, tanto nos ensaios inoculados como no controle foi observada a formação de jarosita (Figura 60).

Figura 58. Difratograma de raios-X da amostra residual de 5 dias (A) e 10 dias (B) dos ensaios de biolixiviação com cloreto em frascos agitados da linhagem PCEL. Os símbolos indicam C- calcopirita, Si-Sílica e pa-porta amostra.

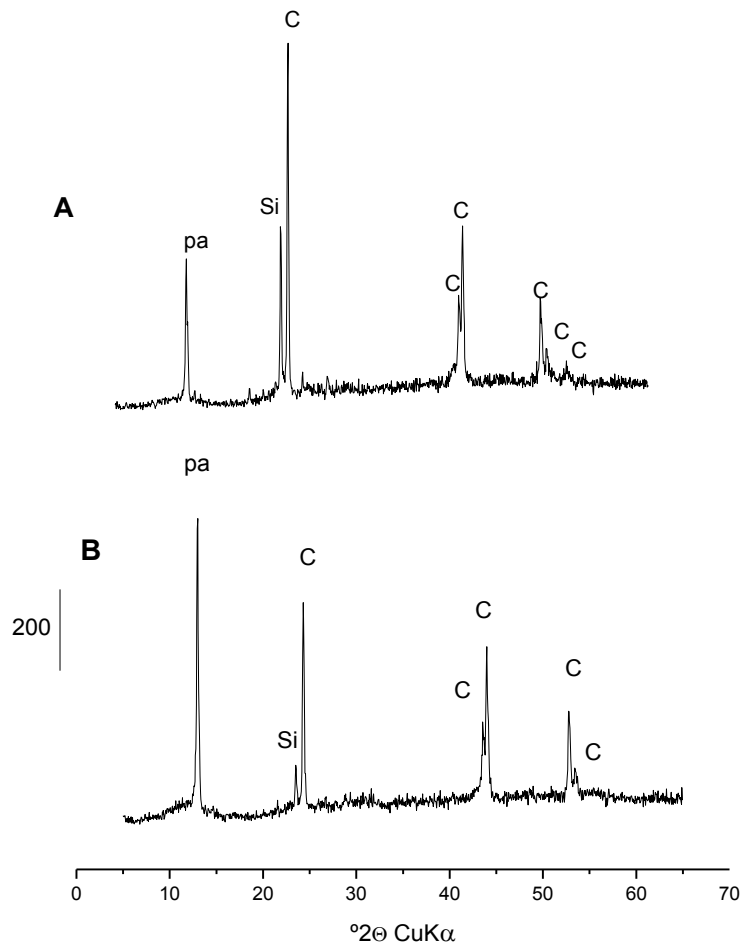


Figura 59. Difratoograma de raios-X da amostra residual de 42 dias (C) dos ensaios de biolixiviação com cloreto em frascos agitados da linhagem PCEL. Os símbolos indicam C-calcopirita, Si-Sílica e pa-porta amostra.

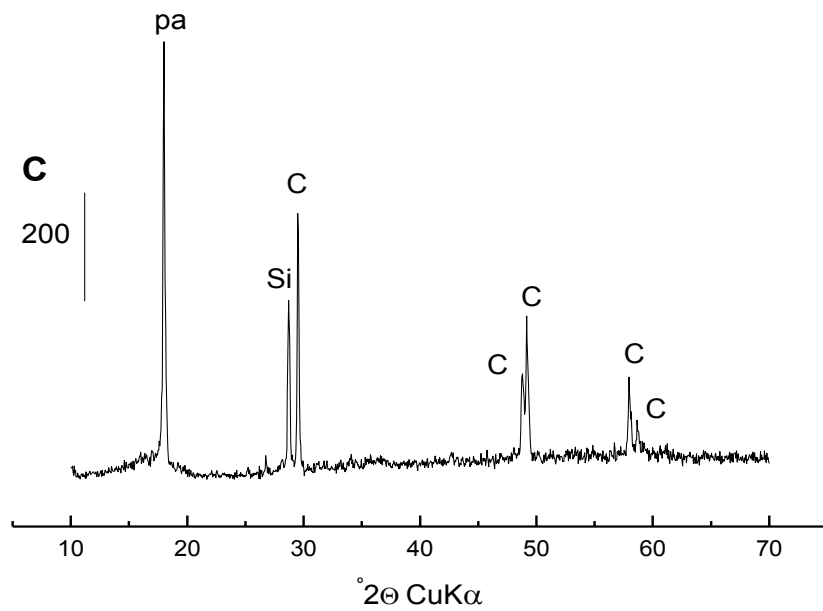
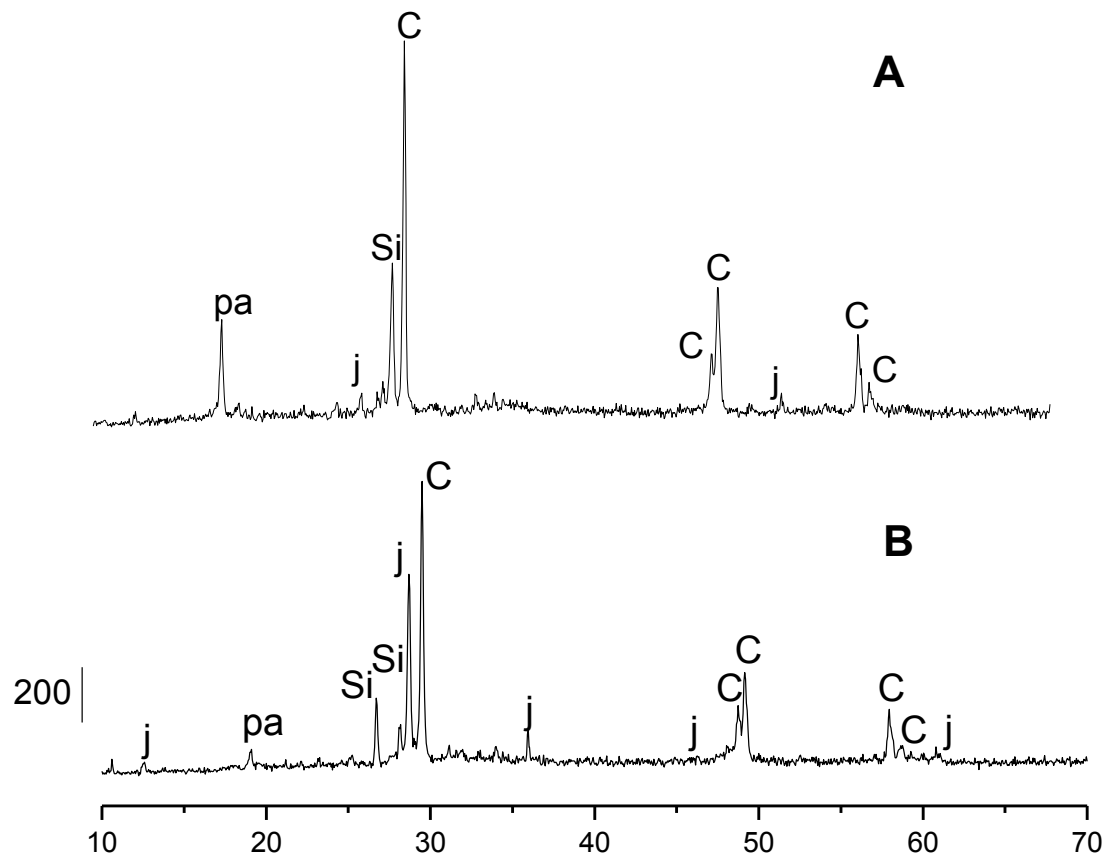


Figura 60. Difratoograma de raios-X da amostra residual de 42 dias dos ensaios de biolixiviação sem cloreto em frascos agitados da linhagem PCEL.(A), e da amostra residual do controle abiótico (B) de 42 dias dos ensaios de biolixiviação sem cloreto em frascos agitados. Os símbolos indicam C-calcopirita, Si-sílica, J-jarosita e pa-porta amostra.



6 CONCLUSÕES

- As linhagens da coleção do Laboratório de Biohidrometalurgia foram avaliadas quanto à capacidade de oxidarem Fe^{2+} , enxofre elementar e calcopirita na presença de íons cloreto. Foi observada uma variação grande quanto à cinética de oxidação de íons ferrosos na presença de diferentes concentrações de cloreto. Uma ordem crescente de halotolerância foi proposta: S < SSP < V3 < LR < PCE < ATCC < SJ22 < CMV < PCEL < AMF.
- No ensaio da cinética de oxidação de enxofre a única linhagem que não sofreu inibição foi a PCEL.
- Estes ensaios permitiram avaliar que utilizando diferentes fontes de energia as bactérias apresentaram diferentes níveis de tolerância aos íons cloreto.
- Avaliando-se a capacidade de oxidação da calcopirita através de ensaios respirométricos foi estabelecida uma ordem crescente da porcentagem de inibição das linhagens na presença de 50 mmol L^{-1} de cloreto e calcopirita: (AMF \approx LR \approx V3) < ATCC < PCEL < SJ22 < S < SSP < CMV < PCE. Com exceção das linhagens AMF, LR e V3 que não apresentaram inibição por cloreto nas condições de ensaio, as outras linhagens apresentaram relativa porcentagem de inibição na presença de cloreto.
- Nos ensaios de biolixiviação na presença de íons cloreto (item 4.6.4 e 4.6.5) as linhagens apresentaram diferenças quanto à solubilização de cobre na presença e na ausência de íons cloreto. Entre as linhagens a que mais se destacou foi a SJ22 que atingiu 79% de recuperação cobre na presença de $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$ e 61% na ausência de cloreto. No entanto, essas diferenças não parecem estar relacionadas às diferenças observadas quanto à tolerância ao cloreto apresentado nos ensaios precedentes.
- As diferenças entre as solubilizações de cobre na presença e na ausência de cloreto poderiam ter sido mais significativas se o período de adaptação destas bactérias tivesse sido mais longo. Em trabalho recentemente publicado por BEVILAQUA et al. (2013) as diferenças entre os tratamentos foram bastante significativas, porém o período de adaptação das bactérias ao cloreto foi bem maior.
- A análise por DRX não revelou a formação de novas fases cristalinas.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F. Present and future of bioleaching in developing countries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 18-19, 2002.
- ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. **Biolixiviación de minerales de cobre**: fundamentos y perspectivas de las tecnologías biominerales. Valparaíso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2005. Cap. 3, p. 45-61.
- ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C.; BUSTOS, S. Bioleaching of minerals: a valid alternative for developing countries. **Journal of Biotechnology**, v. 31, p. 115-123, 1993.
- AHONEN, L.; TUOVINEN, O. H. Alterations in surfaces and textures of minerals during the bacterial leaching of a complex sulfide ore. **Geomicrobiology Journal**, v. 10, p. 207-217, 1992.
- ALVARADO, S.; MALDONADO, P.; JAQUES, I. Energy and environmental implications of copper production. **Energy**, v. 24, p. 307-316, 1999.
- ANDRADE, M. L. A.; VIEIRA, J. R. M.; CUNHA, L. M. S.; KELLER, M. C. **A cadeia produtiva do cobre**: panorama internacional e nacional. 1996. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/onhecimento/bnset/curevist.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2013.
- BABA, A. A.; AYINLA, K. I.; ADEKOLA, F. A.; GHOSH, M. K.; AYANDA, O. S.; BALE, R. D.; SHEIK, A. R.; PRADHAN, S. R. A Review on novel techniques for chalcopyrite ore processing. **International Journal of Mining Engineering and Mineral Processing**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2012.
- BERGH, L. G.; YIANATOS, J. B. Current status of copper SX/EW plant control. **Minerals Engineering**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2001.
- BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS₂) e da bornita (Cu₅FeS₄) por *Thiobacillus 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 (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄)**. 2003. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Microrganismos, minerais e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: EMBRAPA, 2008. Cap. 3, p. 50-81.

BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidación de sulfuros de cobre por *At. ferrooxidans*: análisis de los productos de las fases líquidas y sólidas. In: ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biominerales**: archivos de ingeniería bioquímica. Valparaíso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2005. Cap. 4, p. 63-77.

BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 587-592, 2002.

BEVILAQUA, D.; DIEZ-PEREZ, I.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 79-84, 2004.

BEVILAQUA, D.; LAHTI, H.; SUEGAMA, P. H.; GARCIA JÚNIOR, O.; PUHAKKA, J.; TUOVINEN, O. H. Effect of Na-chloride on the bioleaching of a chalcopyrite concentrate in shake flasks and stirred tank bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 138, p. 1-13, 2013.

BRANTLEY, S. L. Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient conditions. In: DREVER, J. I.; HOLLAND, H. D.; TUREKIAN, K. K. (Ed.). **Treatise on geochemistry**. Boston: Elsevier, 2003. v. 5, p. 73-117.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral. **Plano Nacional de Mineração 2030**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2011/PNM_2030.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2012.

BRAVO, P. El panorama de la hidrometalurgia. **Revista Minería Chilena**, n. 303, sept. 2006. Disponível em: < <http://www.mch.cl> >. Acesso em: 10 jun. 2012.

CABRERA, G.; GOMEZ, J. M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2683-2687, 2005.

CARNEIRO, M. F. C.; LEÃO, V. A. Lixiviação da calcopirita com cloreto férrico e cloreto de sódio. **Revista Escola de Minas**, v. 58, n. 3, p. 231-235, set. 2005.

CARNEIRO, M. F. C.; LEÃO, V. A. The role of sodium chloride on surface of chalcopyrite leached with ferric sulfate. **Hydrometallurgy**, v. 87, p. 73-82, 2007.

CARRANZA, F.; GARCÍA, M. J. Kinetic comparison of support materials in the bacteria ferrous iron oxidation in a packed-bed columns. **Biorecovery**, v. 2, p. 15-27, 1990.

- CIMINELLI, V. S. T. Hidrometalurgia. In: FERNANDES, R. C.; MATOS, G. M. M.; CASTILHOS, Z. C.; LUIZ, A. B. **Tendências tecnológicas Brasil 2015: geociências e tecnologia mineral**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. Cap. 4, p. 157-174.
- CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopirite with ferric ion. Part I: general aspects [J]. **Hydrometallurgy**, v. 93, p. 81-87, 2008a.
- CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopirite with ferric ion. Part II: effect of redox potential. **Hydrometallurgy**, v. 93, p. 88-96, 2008b.
- CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopirite with ferric ion. Part IV: the role of redox potential in the presence of mesophilic and thermophilic bacteria **Hydrometallurgy**, v. 93, p. 106-115, 2008c.
- CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Passivation of chalcopirite during its chemical leaching with ferric ion at 68°C. **Minerals Engineering**, v. 22, p. 229-235, 2009.
- DAOUD, J.; KARAMANEV, D. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v. 9, n. 19, p. 960-967, 2006.
- DOPSON, M.; BAKER-AUSTIN, C.; KOPPINEEDI, P. R.; BOND, P. L. Growth in sulphidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. **Microbiology**, v. 149, p. 1959-1970, 2003.
- ELZEKY, M.; ATTIA, Y. A. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides. **Chemical Engineering Journal**, v. 56, p. 115-124, 1995.
- GAHAN, C. S.; SUNDKVIST, J. E.; SANDSTROM, A. A study on the toxic effects of chloride on the biooxidation efficiency of pyrite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 2/3, n. 172, p. 1273-1281, 2009.
- GAHAN, C. S.; SRICHANDAN, H.; KIM, D-J.; AKCIL, A. Biohydrometallurgy and biomineral processing technology: a review on its past, present and future. **Research Journal of Recent Sciences**. v. 1, n. 10, p. 85-99, 2012.
- GARCÍA, M. J.; PALENCIA, I.; CARRANZA, F. Biological ferrous iron oxidation in packed-bed columns with low-grade sulphide mineral as support. **Process Biochemistry**, v. 3, n. 24. p. 84-87, 1989.
- 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. O enxofre e suas transformações microbianas. In: CARDOSO, E.; SAITO, M. T.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 243-255.

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

HABASHI, F. **Chalcopyrite-its chemistry and metallurgy**. New York: Mac Graw-Hill, 1978.

HARAHUC, L.; LIZAMA, H. M.; SUZUKI, I. Selective inhibition of the oxidation of ferrous iron or sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1031-1037, 2000.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HEDRICH, S.; SCHLÖMANN, M.; JOHNSON, D. B. The iron-oxidizing proteobacteria. **Microbiology**, v. 157, p. 1551-1564, 2011.

HIROYOSHI, N.; MIKI, H.; HIRAHIMA, T.; TSUNEDAWA, M. A model for ferrous-promoted chalcopyrite leaching. **Hydrometallurgy**, v. 57, p. 31-38, 2000.

HIROYOSHI, N.; TSUNEKAWA, M.; OKAMOTO, H.; NAKAYAMA, R.; KUROIWA, S. Redox potential measurement and control in chalcopyrite heap leaching. In: RIVEROS, P. A.; DIXON, D. G.; DREISINGER, D. B.; COLLINS, M. J. (Ed.). CONFERENCE OF METALLURGISTS COPPER-COPPER CONFERENCE, 6th, 2007, Toronto. **Proceedings...** Ontário: METSOC, 2007. Disponível em: < www.metsoc.org/COM2007/flyer07.pdf >. Acesso em: 13 maio 2013.

HORTA, D. G. **Influência da adição da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de íons Cl⁻ na dissolução da calcopirita (CuFeS₂)**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Sistemas de informações e análises da economia mineral brasileira**. 2011. Disponível em: < [http:// www.ibram.org.br](http://www.ibram.org.br) >. Acesso em: 12 mar. 2012.

KINNUNEN, P. H. M.; PUHAKKA, J. A. Chloride-promoted leaching of chalcopyrite concentrate by biologically-produced ferric ion. **Journal of Chemical Technology**, v. 79, p. 830-834, 2004.

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

LIANG, C. L.; XIA, J. L.; NIE, Z. Y.; YANG, Y.; MA, C. Y. Effect of sodium chloride on sulfur speciation of chalcopyrite bioleached by the extreme thermophile *Acidianus manzaensis*. **Hidrometallurgy**, v. 110, p. 462-467, 2012.

LIDDICOAT, J.; DREISINGER, D. Chloride leaching of chalcopyrite. **Hidrometallurgy**, v. 89, p. 323-331, 2007.

LU, Z. Y. Passive and transpassive anodic behaviour of chalcopyrite in acid solution. **Metallurgical Transactions, B**, v. 13B, p. 571-579, 1982.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hidrometallurgy**, v. 56, p. 189-202, 2000a.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. An electrochemical study of the effect of chloride ion on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hidrometallurgy**, v. 56, p. 145-155, 2000b.

McGRAW-HILL, **Year book of science and technology**. 8th ed. New York, 1998. p. 420-452.

MELO, W. C. M. A. **Biossolubilização da calcopirita na presença dos íons cloreto e ácidos orgânicos**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MOUSAVI, S. M.; YAGHMAEI, S.; VOSSOUGH, M.; JAFARI, A.; HOSEINI, S. A. Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopyrite concentrate in an airlift bioreactor. **Hidrometallurgy**, v. 1, n. 80, p. 139-144, 2005.

NDLOVU, S. Biohidrometallurgy for sustainable development in the African minerals industry. **Hidrometallurgy**, v. 91, p. 20-27, 2008.

NICOL, M.; MIKI, H.; VELÁSQUEZ-YÉVENES, L. The dissolution of chalcopyrite in chloride solutions. Part 3. Mechanism. **Hidrometallurgy**, v. 103, p. 86-95, 2010.

RAWLINGS, D. E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. **BioMed Central**, v. 4, n. 13, p. 1-15, 2005.

RIBEIRO, J. A. S. **Cobre**. 2011. Disponível em: <https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=7382>. Acesso em: 12 fev. 2013.

ROCIO, M. A. R.; SILVA, M. M.; CARVALHO, P. S. L.; CARDOSO, J. G. R. **Perspectivas atuais da indústria de cobre no Brasil**. 2011. Disponível em: <http://www.bndespar.com.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3611.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2013.

RUIZ, M. C.; MONTES, K. S.; PADILLA, R. Chalcopyrite leaching in sulfate–chloride media at ambient pressure. **Hydrometallurgy**, v. 109, p. 37-42, 2011.

SANDELL, E. B. **Colorimetric determination of traces of metals**. 3rd ed. New York: Interscience Publishers, 1959. p. 537-542.

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, 2007. p. 3-33.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 77, n. 1958, 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 during bioleaching. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 101, p. 1117-1127, 2000.

SUGIO, T.; WHITE, K. J.; SHUTE, E.; CHOATE, D.; BLAKE II, R. C. Existence of a hydrogen sulfide: ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 431, 1992.

THOMAS, A. **Improved process for chalcopyrite leaching**. Disponível em: <<http://www.ibridgenetwork.org/ucb/improveprocessforchalcopyrite>>. Acesso em: 17 dez. 2012.

THIRD, K. A.; CORD-RUWISCH, R.; WATLING, H. R. The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 55, p. 225-233, 2000.

TRUPTI DAS, S. A.; CHAUDHURY, G. R. Factors affecting bioleaching kinetics of sulfide ores using acidophilic micro-organisms. **BioMetals**, v. 12, p. 1-10, 1999.

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 CO₂-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. **Manometric & biochemical techniques**: a manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism. Minneapolis: Burgess, 1972. p. 290-305.

VAKYLABAD, A. B. A comparison of bioleaching ability of mesophilic and moderately thermophilic culture on copper bioleaching from flotation concentrate and smelter dust. **International Journal of Mineral Processing**, v. 1/4, n. 101, p. 94-99, 2011.

VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**: incluindo análise instrumental elementar. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981.

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

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

YOO, K.; KIM, S. K.; LEE, J. C.; ITO, M.; TSUNEKAWA, M.; HIROYOSHI, N. Effect of chloride ion on leaching rate of chalcopyrite. **Minerals Engineering**, v. 23, p. 471-477, 2010.

ZAMMIT, C. M.; MUTCH, L. A.; WATLING, H. R.; WATKIN, E. L. J. The characterization of salt tolerance in biomining microorganisms and the search for novel salt tolerant strains. **Advanced Material Research**, v. 71/73, p. 283-286, 2009.

ZAMMIT, C. M.; MANGOLD, S.; JONNA, V. R.; MUTCH, L. A.; WATLING, H. R.; DOPSON, M.; WATKIN, E. L. J. Bioleaching in brackish waters—effect of chloride ions on the acidophile population and proteomes of model species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 93, p. 319-329, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE A- Máxima porcentagem e tempo de oxidação do Fe^{2+} das linhagens de *At. ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de íons cloreto.

Concentração de íons Cl^- (mmol L^{-1})	Linhagens de <i>At. ferrooxidans</i>									
	AMF		CMV		S		SJ22		PCE	
	% Oxid.* (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)
0	100	48	100	30	100	28	100	38	100	34
50	-	*nr	-	*nr	-	*nr	-	*nr	-	*nr
100	100	96	100	46	100	42	100	52	100	60
200	100	96	100	96	30	130	100	72	100	108
400	23	192	-	-	-	-	-	-	-	-
500	13	192	-	-	-	-	-	-	-	-

*nr: não realizado.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

APÊNDICE B- Máxima porcentagem e tempo de oxidação dos íons ferrosos das linhagens de *At. ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de íons cloreto.

Concentração de íons Cl^- (mmol L^{-1})	Linhagens de <i>A. ferrooxidans</i>									
	PCEL		V3		ATCC		SSP		LR	
	% Oxid.* (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)	% Oxid. (Fe^{2+})	Tempo (horas)
0	100	36	100	30	100	52	100	45	100	38
50	90	45	90	70	100	70	90	48	-	nr
100	100	50	100	70	100	75	100	70	100	72
200	100	85	-	-	100	80	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*nr: não realizado. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Apêndice C- Fórmula para cálculo da inibição pelo cloreto no ensaio de respirometria celular

$$\% \text{ inibição cloreto} = \frac{100\% \times \text{consumo O}_2 \text{ (50 mmol L}^{-1} \text{ Cl}^{-1})}{\text{consumo O}_2 \text{ (0 mmol L}^{-1} \text{ Cl}^{-1})}$$