



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA OXIDAÇÃO DE COVELITA (CuS) E
MOLIBDENITA (MoS₂) SINTÉTICAS POR *Acidithiobacillus*
*ferrooxidans***

WILMO ERNESTO FRANCISCO JUNIOR

Araraquara

2006

WILMO ERNESTO FRANCISCO JUNIOR

Estudo da oxidação de covelita (CuS) e molibdenita (MoS₂)
sintéticas por *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto
de Química – Campus de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior

Co-Orientadora: Dra. Denise Bevilaqua

Araraquara

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

F818e	Francisco Junior, Wilmo Ernesto Estudo da oxidação de covelita (CuS) e molibdenita (MoS₂) sintéticas por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> / Wilmo Ernesto Francisco Junior. – Araraquara : [s.n], 2006 67 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Oswaldo Garcia Júnior Co-orientador: Denise Bevilaqua 1. Processo biológico. 2. Biolixiviação. 3. Sulfetos metálicos. 4. Mecanismos de oxidação. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

WILMO ERNESTO FRANCISCO JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Campus de Araraquara da Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de janeiro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior (Orientador)

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

Dra. Fernanda de Castro Reis

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – UNICAMP, Campinas

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Wilmo Ernesto Francisco Junior

Nascimento: 25/03/1982

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Cassilândia – MS

Estado Civil: Solteiro

Filiação:

Pai: Wilmo Ernesto Francisco

Mãe: Irene Aparecida Martins de Almeida Francisco

Profissão: Químico

Carteira de Identidade: 32.625.820-6 SSP/SP

Cadastro de Pessoa Física: 224.080.588-99

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Rua Francisco Degni s/nº Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química Quitandinha, 14801-970 Araraquara, SP - Brasil

Telefone: (16) 33016600 Ramal: 6806

E-mail: wiljr@posgrad.iq.unesp.br

Endereço residencial: Rua Princesa Izabel nº 1619-1, Vila Xavier, 14810090, Araraquara, SP - Brasil

Telefone: (16) 33228657

E-mail: wilmojr@bol.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Bacharel em Química: Curso de Bacharelado em Química concluído em dezembro de 2003 no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Araraquara.

2.2 Licenciado em Química: Curso de Licenciatura em Química concluído em dezembro de 2005 no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Araraquara.

2.3. Mestre em Biotecnologia: Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia concluído em janeiro de 2006 no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Araraquara.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Trabalhos completos em anais de eventos

3.1.1. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. Uma análise sobre as idéias e a compreensão do fenômeno de condutividade elétrica pelos estudantes. In: V ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 2005, Bauru. **Atas do V ENPEC**. 2005.

3.1.2. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. Avaliação da Eficiência de Tratamento de Esgotos por Monitoramento de Parâmetros Físico-Químicos. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL, 2004, Porto Alegre-RS. **Anais do IV Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. 2004.

3.2. Resumos simples em anais de eventos

3.2.1. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Avaliação da cinética de oxidação da covelita e molibdenita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **Livro de Resumos do XXIII CBM**. 2005.

3.2.2. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Oxidação de Uma Amostra Mineral Contendo Molibdenita, Pirita e Pirrotita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **Livro de Resumos do XXIII CBM**. 2005.

3.2.3. DOCHI, Roberto Seiji; FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto. Um Experimento de óxido-redução com materiais do dia-a-dia: Uma Abordagem Multidisciplinar. In: III EVENTO DE EDUCAÇÃO EM QUÍMICA, 2005, Araraquara. **Livro de Resumos do III EVEQ/ II EPPEQ.** 2005.

3.2.4. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. Condutividade Elétrica: Uma prática Interdisciplinar entre Química e Física. In: XII ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 2004, Goiânia-GO. **CD-Room de Resumos do XII ENEQ.** 2004.

3.2.5. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. O Ensino de Química Frente os Parâmetros Curriculares Nacionais: Uma visão das Escolas Públicas de Araraquara-SP. In: XII ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 2004, Goiânia-GO. **CD-Room de Resumos do XII ENEQ.** 2004.

3.2.6. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Oxidação Microbiológica de Molibdenita Contendo Pirita e Pirrotita Analisada por Difractometria de Raios-X. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Fortaleza-CE. **CD de Resumos do XLIV CBQ.** 2004.

3.2.7. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; SOUZA, Rodrigo Alves de; DOCHI, Roberto Seiji. Uma Estratégia Alternativa nas Aulas de Química e Física em Cursinhos Populares. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Fortaleza-CE. **CD de Resumos do XLIV CBQ.** 2004.

3.2.8. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Estudo Cinético da Oxidação da Molibdenita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: XIV ENCONTRO REGIONAL ARARAQUARA - SÃO CARLOS - RIBEIRÃO PRETO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2003, São Carlos-SP. **Livro de Resumos do XIV SBQ-Regional.** 2003. p. 14-14.

3.2.9. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Oxidação da Molibdenita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: 11º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2003, São Carlos-SP. **CD de Resumos do 11º SIICUSP**. 2003.

3.2.10. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JÚNIOR, Oswaldo. Oxidação Direta da Molibdenita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE QÍMICA, 2003, Ouro Preto-MG. **Livro de Resumos do XLIII CBQ**. 2003. p. 599-599.

3.3. Artigos completos publicados em periódicos

3.3.1. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; DOCHI, Roberto Seiji. Um Experimento Simples Envolvendo Óxido-Redução e Diferença de Pressão com Materiais do Dia-a-Dia. **Química Nova na Escola** (no prelo), São Paulo, 2006.

3.3.2. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. Um Projeto de Extensão Universitária na Pesquisa do Ensino de Química. **Enciclopédia Biosfera**, 2005.

3.3.3. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. Monitoramento de Parâmetros Físico-Químicos Para Avaliação da Eficiência e dos Impactos Ambientais de uma Estação de Tratamento de Esgotos. **Anais da Associação Brasileira de Química**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 135-138, 2003.

3.4. Artigos resumidos publicados em periódicos

3.4.1. FRANCISCO JUNIOR, Wilmo Ernesto; et al. A Extensão Universitária Auxiliando a Formação dos Químicos. **Rev. Ciênc. Ext.**, São Paulo, v. 1, n. 1 (supl.), p. 248-248, 2004.

3.4.2. AMBRÓSIO JÚNIOR, José Roberto; et al. Grupo PET-Química e Extensão Universitária: Ações Internas. **Rev. Ciênc. Ext.**, São Paulo, v. 1, n. 1 (supl.), p. 115-115, 2004.

Em memória de
Geni de Oliveira Francisco
e
José Martins de Almeida.

Nem sempre nossas vidas serão perfeitas ou todas nossas vontades serão satisfeitas, mas, nunca paremos de lutar pelo que desejamos conquistar, pois quando estivermos mortos não poderemos mais.

Wílmo

Dedico

*Aos meus pais. Com zelo e amor
possibilitaram minha formação como
ser humano e profissional.*

*A vocês minha eterna gratidão
e meu muito obrigado.*

Dedico

*Ao meu irmão, pela
convivência e união,
principalmente neste último
ano, o que nos tornou amigos
antes de tudo.*

Paradisiaco

*Os momentos da vida dissipam-se como pássaros a voar
Uma energia celeste envolve minh'alma
Meus olhos lacrimejam quando me pego a pensar
Perdido no espaço, que o tempo não pára, nunca pára de
andar*

*A energia reluz trazendo-me a calma
Em mim, abre-se um precipício do tamanho do mar
Verdes pastos passam num constante acelerar
Os pastores montados em seus alazões m'envoltam o trauma*

*Os céus mandam o aviso: A hora está pra chegar
As linhas da vida vão se escurecendo em minha palma
Uma escuridão!!! E pareço ferver numa sauna*

*Quando os raios de luz me atingem
Sinto-me levitar*

*Uma grande sensação de leveza põe-me a decolar
As saudades, os temores, as lembranças e as esperanças
Somem todas quando chego neste lugar*

Wilmo.

O sol do amanhã

*O sol do amanhã já está nascendo
Toda esperança vem pra dilacerar
A tristeza estonteante que nos estava remoendo
O brilho chega para nos encher de alegria
E para nos fazer esquecer todo mal, todo o sarcasmo
Toda escuridão e todo aquele marasmo
Que a cada dia nos sucumbia*

*A partir de agora
A única validade
É erguermos as nossas cabeças triunfantes
E nos esquecermos da vaidade
Pois deveremos estar escaldantes
Para vivermos a cada dia a nossa idade*

*Derrotas e vitórias nos cercarão
Haverá vezes que desejaremos nos enterrar nas entranhas
O céu e o abismo para nós se abrirão
É quando deveremos nocautear a solidão
Lembrando que por toda eternidade
O sol do amanhã estará nascendo
E de algum modo estaremos vencendo*

Wilmo

Ao meu orientador (Doze Estações)

*Pétalas amareladas se esvaem ao chão
Fumaças dissipam-se do pulmão ao coração
É outono, eis que surge uma fresta em festa; dedicação
Liame de compreensão e autoridade
Alvorecer de primavera, aurora de voracidade
Girassóis e sóis, a cor do verão
Vozes, risos, histórias
Inverno, hibernação,
Sarcasticamente espontâneo, subterrâneo, engenhoso
Farejando e forjando pegadas; modestamente
Entre espinhos e pomares; crucialmente
Mares aos males aos pares; anteparo
Em um e outro despreparo
Já se foram quatro outras estações; inexoravelmente
O arbusto, a folhagem caída
Oito estações, dois verões
Pétalas amareladas novamente se esvaem ao chão
Fumaças continuam a dissiparem-se do pulmão ao coração
Sinta o som
O balançar das folhas de uma árvore campestre
O balbuciar de um samba encantador
Para sempre meu mestre
Meu orientador.*

Agradecimentos

Ao professor Oswaldo Garcia Junior, pela orientação segura e incontestável, pela competência, pelo aprendizado e pelo exemplo de pessoa e profissional do qual jamais me esquecerei.

À Dra. Denise Bevilaqua, pela ajuda, apoio, aprendizagens e convivência durante estes anos.

Ao CNPq pela auxílio financeiro concedido.

Aos técnicos Waldenir Aparecido de Menezes e Juliana Pirola Garcia, pelo auxílio, amizade, conversas, conselhos e risos durante todos estes anos.

Aos companheiros de grupo e laboratório, Ana Paula, Renata, Cebinho, E.T, Tueio, Teresa, Heloísa, Marina, pela convivência, paciência e amizade, os quais tornaram nosso convívio inesquecível.

Aos companheiros do curso de Licenciatura em Química, em especial Daniel, Wolff, Weverton.

Aos amigos sempre presentes, Quick, Juliana, Rodrigo, Marcelo, Fabrício, obrigado pelas conversas e cervejas.

Aos professores Assis Vicente Benedetti e Dermeval Cararatti de Lima pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação.

À família “Garra de Águia-Araraquara” em nome do professor Emerson Lavelli Cinti,, pelo aprendizado, amizade, confiança e convivência traduzidos em exemplos de muita determinação e suor durante estes anos, o que contribuiu e contribui imensuravelmente em minha formação humana.

Aos demais professores do Instituto de Química que de alguma forma contribuíram com a minha formação.

À diretoria da Associação dos Ex-Alunos do IQ, gestão 2004-2005, que fizeram momentos de muito trabalho e suor se transformarem em prazerosos e inesquecíveis.

À Ong-Fonte, por permitir-me desenvolver umas das mais prazerosas e nobres atividades humanas existentes, lecionar.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, que me ajudaram durante estes anos.

Aos colegas do Instituto de Química, em especial à turma 2005 do Bacharelado.

Às funcionárias da biblioteca pelo atenção dispensada estes anos.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação por toda a ajuda.

Aos demais funcionários do IQ pela ajuda e amizade durante estes anos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
II.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	05
II.2. Sulfetos minerais – Covelita e Molibdenita.....	07
II.3. Mecanismos envolvidos na biolixiviação.....	11
II.3.1. Os mecanismos dos polissulfetos e do tiosulfato.....	15
II.3.2. As substâncias poliméricas extracelulares e as interações com os sulfetos metálicos.....	18
III. OBJETIVOS.....	21
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
IV.1. Linhagem bacteriana.....	22
IV.2. Amostras minerais.....	22
IV.3. Meios de cultura.....	22
IV.3.1. Meio T&K.....	22
IV.3.2 Meio 9K.....	23
IV.4. Preparo da suspensão celular.....	24

VI.5. Dosagem de proteínas total.....	24
VI.6. Estudos de respirometria celular.....	26
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
V.1. Caracterização das amostras por difratometria de Raios-X.....	31
V.2. Ensaio respirométrico com <i>A. ferrooxidans</i> LR crescido em íon ferroso.....	31
V.3. Estudos da cinética de oxidação da covelita e da molibdenita.....	40
V. 4. Ensaio respirométrico com <i>A. ferrooxidans</i> LR deficientes em EPS.....	46
V.5. Ensaio respirométrico com <i>A. ferrooxidans</i> LR crescido em enxofre.....	48
VI. CONCLUSÕES.....	61
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
VIII. REFERÊNCIAS.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Plantas comerciais de lixiviação estática em pilhas para cobre.....	04
Tabela 2. Plantas comerciais de biolixiviação de concentrados de ouro em tanques agitados....	04
Tabela 3. Taxas de oxidação do <i>A. ferrooxidans</i> LR em covelita e molibdenita para os diferentes tratamentos realizados.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de uma planta de biolixiviação conduzida sob a forma de pilhas.....	03
Figura 2. Imagem de Microscopia de Forças Atômicas do <i>A. ferrooxidans</i> aderido a superfície de um sulfeto de cobre (BEVILAQUA, 2003).....	06
Figura 3. Esquema dos possíveis mecanismos de interação bactéria-substrato envolvidos na biolixiviação dos sulfetos minerais.....	12
Figura 4. Esquema comparativo do mecanismo de biolixiviação via tiosulfato (A) e polissulfetos (B) <i>A.f</i> – <i>A. ferrooxidans</i> ; <i>A.t</i> – <i>A. thiooxidans</i> ; <i>L.f</i> – <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> . (*) passos que podem envolver tanto <i>A.f</i> quanto pelo <i>A.t</i> . (ROHWERDER et al., 2003).....	14
Figura 5. Esquema básico do aparelho de Warburg.....	28
Figura 6. Difrato gramas de Raios-X obtidos para a amostra de molibdenita (A) utilizada nos estudos de respirometria com o respectivo do padrão de molibdenita PDF 37-1492 (B).....	32
Figura 7. Difrato gramas de Raios-X obtidos para a amostra de covelita (A) utilizada nos estudos de respirometria com o respectivo do padrão de covelita PDF 6-464 (B).....	33

Figura 8. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (500 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A), 150 mg (B), 200 mg (C) e 300 mg (D) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico 34

Figura 9. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans*-LR (420µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A), 150 mg (B), 200 mg (C) e 300 mg (D) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico..... 36

Figura 10. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (420µg de proteína total) na presença de molibdenita (100 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) com diferentes concentrações de Tween 80. A (0,1%), B (0,25%) e C (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico..... 38

Figura 11. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (420 µg de proteína total) na presença de massas de 20 mg (A), 50 mg (B), 100 mg (C), e 200 mg (D) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico..... 39

Figura 12. Curva da velocidade inicial de oxidação em função da massa de covelita..... 43

Figura 13. Curva da equação de Hill linearizada para o sulfeto de cobre covelita.....	43
Figura 14. Curva de Michaelis-Menten (A) e o respectivo gráfico de duplo recíproco de Linewaver-Burk (B) para a molibdenita.	45
Figura 15. Atividade de respiração do <i>A. ferrooxidans</i> -LR deficiente em EPS (525 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.....	47
Figura 16. Atividade de respiração do <i>A. ferrooxidans</i> -LR deficiente em EPS (525 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1.8) de tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.....	47
Figura 17. Variação do pH durante o crescimento do <i>A. ferrooxidans</i> LR em enxofre elementar.....	50
Figura 18. Atividade de respiração do <i>A. ferrooxidans</i> LR crescido em S ⁰ (262 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de molibdenita como substrato oxidável em soluça ácida (pH 1.8) de tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.....	51

Figura 19. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μ g de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico..... 51

Figura 20. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μ g de proteína total) na presença de molibdenita (100 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1.8) de tween 80 (0,5%) com suplementação de 120 mMol L⁻¹ de Fe³⁺. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico..... 52

Figura 21. Oxidação da covelita (100 mg) sob diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Símbolos: (○) 10 Mol L⁻¹, (□) 2 Mol L⁻¹, (▽) 1 Mol L⁻¹..... 55

Figura 22. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μ g de proteína total) na presença do sobrenadante de lixiviação ácida da covelita..... 56

Figura 23. Difratoograma de Raios-X obtido para o resíduo de lixiviação ácida da covelita após 48 horas..... 57

Figura 24. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μ g de proteína total) na presença de enxofre (32,6 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1.8)..... 58

ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A. ferrooxidans – *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A. ferrooxidans LR – linhagem bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolada de Lagoa Real (BA)

A. f. – *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A. thiooxidans – *Acidithiobacillus thiooxidans*

ppm – Partes por milhão

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

K_{ps} – Constante de produto de solubilidade

K_m – Constante de Michaelis-Menten

V_{max} – Velocidade máxima

RESUMO

A lixiviação bacteriana, ou biolixiviação é um processo biotecnológico que se fundamenta na utilização de microorganismos capazes de solubilizar metais pela oxidação de sulfetos metálicos, sendo nos dias atuais, uma das mais importantes alternativas para a extração de metais, sobretudo do ponto de vista ambiental e econômico. Uma das principais espécies utilizada neste processo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma bactéria aeróbia, mesofílica e acidofílica, que obtém energia pela oxidação de substratos inorgânicos, basicamente o íon ferroso e compostos reduzidos de enxofre. Todavia, a interação dessa espécie com os sulfetos metálicos é um assunto ainda pouco entendido e de muita controvérsia na literatura.

Com intuito de melhor entender estas diferenças, o presente trabalho estudou a oxidação da molibdenita (MoS_2) e da covelita (CuS) pelo *A. ferrooxidans* linhagem LR em algumas condições fisiológicas, destacando-se a fonte energética de crescimento (íon ferroso e S^0) e a remoção das substâncias exopoliméricas (EPS) para células crescidas em íon ferroso. A cinética de oxidação destes sulfetos também foi avaliada. Tais estudos foram realizados pela técnica de respirometria celular, que permite avaliar rapidamente a oxidação do substrato a partir de medidas de oxigênio consumido pela bactéria.

Em todas as condições testadas a covelita apresentou significativa diferença de oxidação pelo *A. ferrooxidans* LR em comparação com a molibdenita. A análise da cinética de oxidação dos sulfetos demonstrou que a molibdenita apresenta uma cinética que segue Michaelis-Menten, o mesmo não acontecendo para a covelita, provavelmente devido a forma com que estes sulfetos reagem ao ataque químico-bacteriano, fato determinado pelas estruturas eletrônicas dos sulfetos minerais. Quanto aos ensaios onde as células de *A. ferrooxidans* LR foram crescidas em meio

contendo diferentes fontes energéticas de crescimento (íon ferroso e enxofre), e para aqueles nos quais as células tiveram a remoção dos EPS, os resultados obtidos para a oxidação da covelita não apresentaram significativas diferenças. Assim como para a covelita, a oxidação da molibdenita pelo *A. ferrooxidans* LR em diferentes condições fisiológicas mostrou resultados similares.

Tendo em vista o conjunto de resultados, o papel das substâncias exopoliméricas na oxidação dos sulfetos, sobretudo a respeito da presença de íons férricos, parece não ser tão primordial quanto se acredita. Isto pode ser suportado pela oxidação de ambos sulfetos tanto para células crescidas em S^0 quanto para células crescidas em íon ferroso as quais tiveram os EPS removidos. Provavelmente outros fatores, ainda não muito claros, podem estar determinando a interação entre a bactéria e os sulfetos metálicos.

ABSTRACT

Bacterial leaching or bioleaching is a biotechnological process that applies microorganisms able to solubilize metals by metallic sulfides oxidation. This process is nowadays one of the most important alternatives for recovering metals, mainly by environmental and economic aspects. One of the most important bacteria employed in this process is *Acidithiobacillus ferrooxidans*. It is a gram-negative, acidophilic, aerobic and chemoautotrophic bacteria that obtain energy by the oxidation of inorganic substrates like ferrous ion and reduced sulfur compounds, including metal sulfides. Nevertheless, the interaction of this specie with metallic sulfides remains unclear.

With the aim to understand these interactions, the present work has studied the covellite (CuS) and molydenite (MoS₂) oxidation by *A. ferrooxidans* strain LR under different physiological conditions such as the source energy for growth (S⁰ and ferrous ion) and the removal of extracellular polymeric substances (EPS). These studies were performed by respirometric technique that allow evaluating very quickly the substrate oxidation by oxygen uptake measures.

For all essays realized it was observed that the efficiency of covellite oxidation by *A. ferrooxidans* LR is much better than molybdenite. On the kinetic oxidation analyses, molybdenite revealed to be according to Michaelis-Menten substrate saturate kinetic. On the other hand, covellite was not in agreement with Michaelis-Menten kinetic. This finding is probably associated with the pathway which these minerals sulfide react to chemistry-bacterial attack, what is influenced by electronic structures of mineral sulfides. Regarding essays performed with cells of *A. ferrooxidans* strain LR grown with different substrates (ferrous ion and sulfur) and to essays

which EPS of bacterial cells were removed, the results obtained did not show differences in covellite oxidation. As to covellite, the molybdenite oxidation by *A. ferrooxidans* LR under different physiological conditions was very similar.

According to the results obtained in this work, the role of EPS and ferric ion on the sulfide oxidation showed no great initial influence on the oxidation as defending by some authors. It can be supported by oxidation of both sulfides by cells grown in sulfur, in which there were not ferric ions. Probably, other factors which remains unclear have been determining the interaction between bacteria and metallic sulfides.

I. INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço de materiais cerâmicos e poliméricos nos últimos tempos, torna-se inimaginável pensar no cotidiano do mundo moderno sem fazer alguma alusão aos metais, devido a vasta variabilidade de aplicações em que estes foram, são e serão utilizados. Um fato notável no desenvolvimento dos seres humanos, o qual é denominado historicamente de “Idade dos Metais” (5000 - 4000 a.C.), foi o início do uso dos metais. Desde então, o estudo e avanço de suas aplicações não mais pararam de crescer, chegando a patamares hoje que vão desde o tratamento de doenças como o câncer, até chips de microcomputadores.

A exploração da crosta terrestre em busca de metais vem de longa data. Com isso, a indústria mineradora está atualmente deparando-se com sérios problemas, como o esgotamento das reservas minerais, a diminuição do teor de metais para a extração, além dos problemas ambientais originados do processo de extração de metais. Tradicionalmente, o processo ao qual os minerais são submetidos para a extração dos metais é denominado de Pirometalurgia. O mesmo consiste basicamente na oxidação do minério contendo o metal de interesse, pela queima em altas temperaturas. No caso de sulfetos metálicos, o processo pelo qual ocorre esta oxidação é denominado de ustulação. A reação [1] abaixo exemplifica este processo para a molibdenita:



Devido à necessidade de elevadas temperaturas para este tipo de tratamento, o processo pirometalúrgico requer alto gasto energético, atingindo assim elevado custo, sendo apenas economicamente viável em jazidas nas quais o metal de interesse encontra-se em alto teor. Outro aspecto negativo é referente ao problema ambiental, pois a queima de minérios sulfetados provoca a liberação de SO_2 para a atmosfera, um dos gases responsáveis pela chuva ácida. Estes fatores têm induzido um crescimento no estudo de processos alternativos que

visem uma exploração de minérios com baixos teores do metal e que não acarretem significativos danos ambientais.

Dentre estes processos alternativos, a Hidrometalurgia, um processo que utiliza soluções ácidas ou básicas para o tratamento de minérios e recuperação do metal de interesse, apresenta certas vantagens em relação à Pirometalurgia, sobretudo quanto ao custo energético. Dentre os processos hidrometalúrgicos, a Biolixiviação ou lixiviação bacteriana é um processo biotecnológico que vem ganhando especial atenção. Este processo fundamenta-se na utilização de microorganismos capazes de solubilizar metais pela oxidação de sulfetos metálicos. A biooxidação de minérios para a recuperação de cobre tem sido praticada por séculos na Espanha, Suécia, Alemanha e China (EHRlich, 2001), sendo, o primeiro documento que relata a aplicação comercial do processo biohidrometalúrgico datado de 1958 (OLSON; BRIERLEY; BRIERLEY, 2003).

A Biohidrometalurgia apresenta grandes vantagens em relação a hidrometalurgia: requer pequeno gasto com insumos (ácidos e agentes oxidantes) os quais são produzidos pela própria bactéria; reduzido gasto energético; baixo investimento de capital; baixo custo operacional; reduzida mão de obra especializada na operação em relação aos demais processos de beneficiamento de metais; aproveitamento de rejeitos de minérios com teores reduzidos de metais. Assim, a lixiviação bacteriana pode ainda ser uma alternativa para jazidas de pequeno porte, e/ou longe de centros com infra-estrutura.

A operação de processos biohidrometalúrgicos é conduzida em geral sob a forma de lixiviação estática em pilhas, aproveitando-se da ação natural das bactérias presentes no minério, cujo metal de interesse já se apresente na forma de sulfeto insolúvel (CuS por exemplo) para ser transformado pela ação oxidante da bactéria no sulfato solúvel correspondente (CuSO_4). A Figura 1 mostra um esquema representativo de uma planta de biolixiviação sob a forma de pilha. Também existem casos em que o metal de interesse não se

apresenta sob a forma de sulfeto, logo deve existir no minério algum sulfeto, como a pirita (FeS_2), para que pela atuação da bactéria, este se transforme em agentes lixiviantes (ácido sulfúrico e íon férrico), capazes de promover a solubilização do metal não sulfetado. Este tipo de processo ocorre na lixiviação bacteriana de urânio.

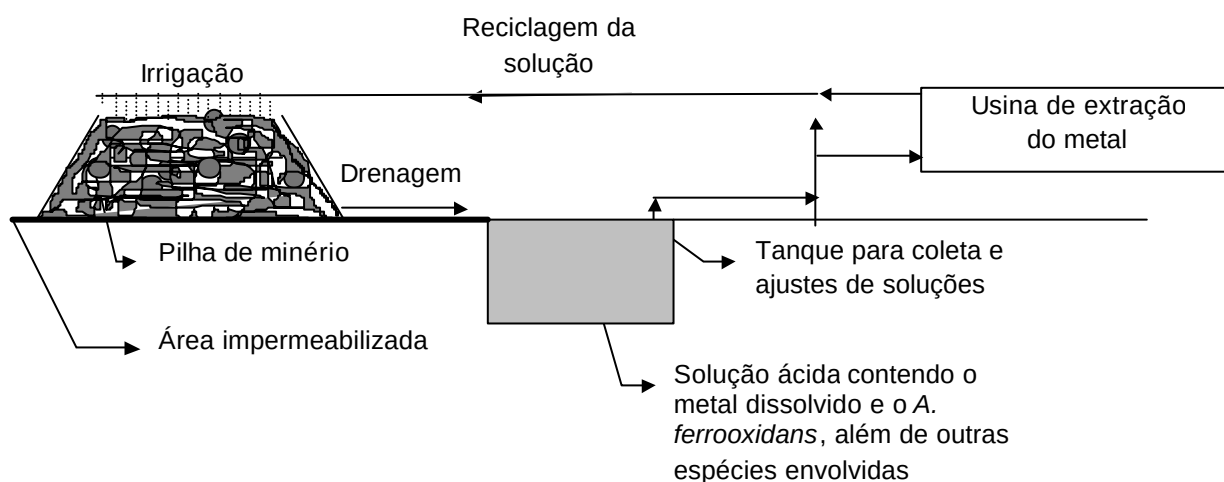


Figura 1. Esquema de uma planta de biolixiviação conduzida sob a forma de pilhas.

Além da lixiviação estática em pilhas, a biolixiviação também vem sendo aplicada em tanques agitados, especialmente para concentrados minerais contendo ouro. Atualmente este processo biotecnológico é aplicado, em escala industrial, para a recuperação de cobre, urânio e ouro, em países como EUA, Chile, Brasil, Austrália, Rússia, etc. As Tabelas 1 e 2 mostram respectivamente, algumas plantas de biolixiviação de cobre e concentrado de ouro, a quantidade de minério processada e os anos em operação.

Tabela 1. Plantas comerciais de lixiviação estática em pilhas para cobre (OLSON; BRIERLEY; BRIERLEY, 2003).

Planta e localização	Toneladas de minério/dia	Anos em operação
Lo Aguirre, Chile	16.000	1980-1986
Cerro Colorado, Chile	16.000	1993 até o presente
Quebrada Blanca, Chile	17.300	1994 até o presente
Cerro Verde, Peru	32.000	1996 até o presente
Equatorial Tonopah, EUA	24.500	2000-2001
S&K Copper, Myanmar	18.000	1998 até o presente

Tabela 2. Plantas comerciais de biolixiviação de concentrados de ouro em tanques agitados (OLSON; BRIERLEY; BRIERLEY, 2003).

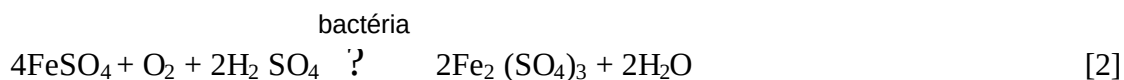
Planta e localização	Toneladas de concentrado/dia	tecnologia	Anos em operação
Fairview, África do Sul	10 expandido para 40	BIOX	1986 até o presente
São Bento, Brasil	150	BIOX	1990 até o presente
Wiluna, Austrália	115 expandido para 158	BIOX	1993 até o presente
Sansu, Gana	720 expandido para 960	BIOX	1994 até o presente
Youanmi, Austrália	120	BacTech	1994-1998
Tamboraque, Peru	60	BIOX	1990 até o presente
Laizhou, China	100	BacTech	2001 até o presente

É inegável, nos dias atuais, a importância e potencialidade da lixiviação bacteriana para a extração de metais, sobretudo do ponto de vista ambiental e de consumo energético. Assim, quanto melhor se conhecer os processos de interação entre as espécies bacterianas e os sulfetos metálicos, melhores são as perspectivas de otimização deste processo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Na biolixiviação de metais tem sido demonstrada a participação de diferentes espécies bacterianas, dentre as quais destacam-se: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* (JOHNSON, et al., 1995; RAWLINGS, 2002). Das espécies mencionadas, sem a menor dúvida, a mais estudada e utilizada nos processos de biolixiviação é o *A. ferrooxidans*. Essa bactéria é um microorganismo quimiolitotrófico, ou seja, obtém sua energia pela oxidação de substratos inorgânicos, basicamente o íon ferroso e compostos reduzidos de enxofre (equações [2], [3] e [4]), incluindo os sulfetos metálicos.



A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada pela espécie para a fixação do CO_2 atmosférico, sua fonte de carbono (LEDUC; FERRONI, 1994). Além disso, o *A. ferrooxidans* é uma espécie aeróbia, não patogênica, a qual apresenta-se como bastonetes Gram-negativos, não esporulantes, com dimensões médias de 0,5 a 0,6 μm de diâmetro por 1,0 a 2,0 μm de comprimento. São móveis pois apresentam flagelo polar (HOLT, 1994) e sua reprodução é por divisão binária simples (PIVOVAROVA; GOLOVACHEVA, 1985). O *A. ferrooxidans* é considerado um microrganismo mesofílico e acidofílico, sendo 30°C a temperatura ótima de crescimento, e o pH ótimo de crescimento situado em torno de 2,0, ocorrendo no entanto, crescimento numa faixa 1,5 a 4,5; acima de pH 6,5 ou abaixo de pH 1,0 não é capaz de crescer (SMITH; LUTHY; MIDDLETON, 1988).

A capacidade em oxidar diferentes tipos de compostos inorgânicos, produzindo íons férricos e ácido sulfúrico (eficientes agentes da lixiviação ácida de metais), é o que torna o papel do *A. ferrooxidans* fundamental na lixiviação bacteriana. A capacidade de oxidação deste microrganismo já foi demonstrada para diferentes sulfetos metálicos como calcopirita (CuFeS_2), covelita (CuS), galena (PbS), pirita (FeS_2), esfarelita (ZnS) entre outros (BEVILAQUA et al., 2001; MONTEIRO; GARCIA; TUOVINEN, 1999; GARCIA; BIGHAM; TUOVINEN, 1995a, GARCIA; BIGHAM; TUOVINEN, 1995b). A Figura 2 mostra uma imagem de microscopia de forças de atômicas na qual o *A. ferrooxidans* está aderido a superfície de um sulfeto de cobre.

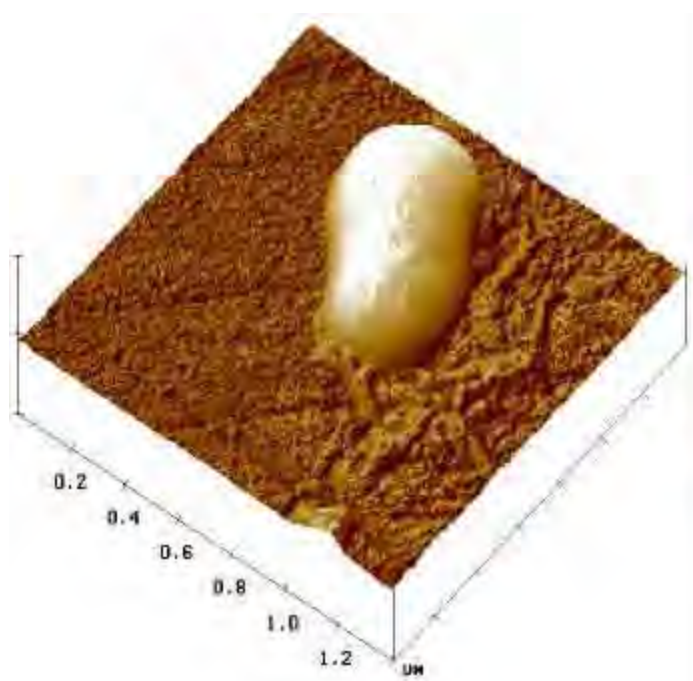


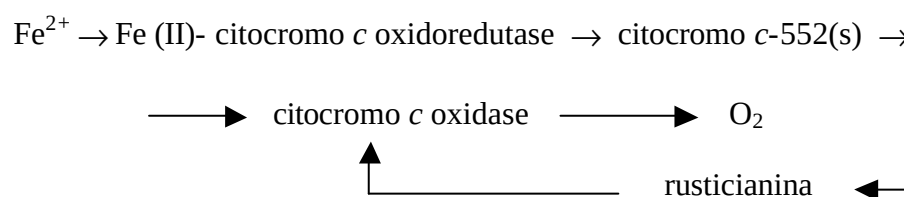
Figura 2. Imagem de Microscopia de Forças Atômicas do *A. ferrooxidans* aderido a superfície de um sulfeto de cobre (BEVILAQUA, 2003).

Uma característica fisiológica marcante, a qual permite o emprego do *A. ferrooxidans* na solubilização de metais, é a sua resistência a altas concentrações de íons metálicos (LEDUC; FERRONI, 1994), característica esta que pode ser atribuída à presença constante de metais em seu habitat, fator que provavelmente determinou a seleção de espécies

mais resistentes. Segundo revisões de Lundgren e Silver (1980), Hutchins et al. (1986) e Leduc e Ferroni (1994), o *A. ferrooxidans* é resistente às concentrações em mMol L⁻¹ de: 370 Al, 150 Zn, 170 Co, 180 Mn, 160 Cu, 100 Cr, 1,5 As, 10 Cd, 0,1 Hg, 170 Ni e 8 U. Por todos estes fatores, este microorganismo vem sendo muito estudado e aplicado na biolixiviação de minerais nas últimas décadas.

A espécie utiliza, além do Fe²⁺ ou formas reduzidas de enxofre como fonte energética, suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (TUOVINEN; PANDA; TSUSHUJA, 1979; RAWLINGS, 1981). O mecanismo de oxidação do Fe²⁺ por *A. ferrooxidans* têm sido muito estudado (YAMANAKA; FUKUMORI, 1995); entretanto, em relação ao enxofre, o mecanismo molecular é ainda pouco conhecido (PRONK; JOHNSON, 1992).

Vários componentes da cadeia de transferência de elétrons durante a oxidação do íon Fe²⁺ já foram identificados e purificados. Com base nas interações entre os componentes isolados, Yamanaka e Fukumori (1995) propuseram o seguinte sistema para a transferência de elétron acompanhada pela oxidação do Fe²⁺:



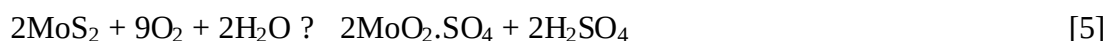
Entretanto, a interação dessa espécie (além de outras) com os sulfetos metálicos durante o processo de biolixiviação, tem se tornado o foco de muitas discussões e intensivas pesquisas, sendo um assunto ainda muito controverso, sobretudo a respeito dos mecanismos envolvidos na dissolução dos sulfetos metálicos.

II.2. Sulfetos minerais – Covelita e Molibdenita

Covelita e molibdenita, objetos de estudo do presente trabalho, são importantes sulfetos minerais presentes na natureza. A covelita apresenta uma geometria hexagonal. Sua composição química (m/m) apresenta 66,6% de Cu e 33,6% de S. Este sulfeto apresenta uma complexa estrutura cristalina, onde os átomos de cobre se coordenam aos átomos de enxofre de duas formas diferentes. Um tipo de átomo de cobre é coordenado tetraedricamente com o enxofre, enquanto o outro tipo está em uma coordenação trigonal com o enxofre, formando camadas planares (KLEIN; HURLBUT, 1999). A covelita não é um mineral de grande abundância, porém é encontrada na maioria dos depósitos de cobre associada a outros minerais.

A molibdenita apresenta em sua composição química (m/m) 59,9% de Mo e 40,1% de S. Em sua estrutura os átomos de Mo estão ligados entre dois planos de átomos de enxofre. Os três planos juntos formam uma só camada, onde as ligações são mais fortes do que entre uma e outra camada (KLEIN; HURLBUT, 1999). O dissulfeto de molibdênio pertence a classe de compostos lamelares e ocorre em três modificações polimórficas. A fase mais comum (2H) existe na natureza na forma de molibdenita. Esta fase é diamagnética e semicondutora n,p. Este sulfeto possui aplicações tecnológicas as quais incluem baterias no estado sólido; utilizando meio não aquoso e íons lítio intercaláveis; células solares, lubrificantes sólidos, catalisadores, além de inúmeras outras (WYPYCH, 2000).

A reação de oxidação da molibdenita não foi completamente elucidada, porém, uma forma simplificada pode ser representada pela seguinte equação (LYALIKOVA; LEBEDEVA, 1984):



Estudos de biolixiviação de molibdenita não são muito comuns, principalmente no que concerne a utilização de sulfetos sintéticos. Pistaccio et al. (1994) estudaram a biolixiviação de molibdenita sintética em meio ausente de ferro, e observaram que em ausência de um

agente surfactante, a dissolução deste mineral é ínfima. Os mesmos estudos revelaram que em ensaios nos quais utilizou-se uma concentração de 5000 ppm do surfactante Tween 80, houve um aumento de cerca de 8 vezes no molibdênio solubilizado. Do mesmo modo, a adesão bacteriana apresentou um acréscimo de 17,9 para 87%. Por outro lado, estudos também com MoS_2 sintético em ausência de ferro (TRIBUTSCH; BENNETT, 1981) não mostraram dissolução deste sulfeto e nem crescimento bacteriano no mesmo. Entretanto, estes autores não relatam o uso de qualquer agente surfactante para diminuir o alto caráter hidrofóbico da molibdenita, o que, como demonstraram Pistaccio et al. (1994), é fator decisivo para a biolixiviação deste sulfeto. Esta alta hidrofobicidade, aliada a alta toxicidade do molibdênio à microorganismos (PIRAVOVA; DZHANSUGUROVA; KARAVAIKO, 1991) pode ter determinado o não crescimento do *A. ferrooxidans* neste sulfeto relatado por Tributsch e Bennet (1981).

Estudos tanto de lixiviação química quanto bacteriana de concentrados de molibdênio revelaram também uma natureza altamente refratária deste sulfeto (ROMANO et al., 2001a, 2001b). Em nenhum dos casos a solubilização de molibdênio por lixiviação bacteriana ultrapassou 0,5%. No caso da lixiviação química, os melhores resultados (dissolução > 90%) foram obtidos com o uso de HNO_3 50%. Nasernejad et al. (1999) demonstraram, também utilizando concentrado de molibdênio, extração de 93% do metal. Contudo, os precipitados destes ensaios de biolixiviação foram lavados, a cada semana, com ácido clorídrico 2 M e solvente orgânico, sendo então reutilizados nos ensaios os quais tiveram duração de 41 dias. Este procedimento experimental provavelmente determinou a alta solubilização de molibdênio, fato incomum em estudos relatados na literatura (TRIBUTSCH; BENNETT, 1981, ROMANO et al., 2001a, 2001b).

A covelita é um dos principais minerais de cobre presente na natureza e, sob o ponto de vista de extração de cobre por processos biohidrometalúrgicos, também é um dos mais

importantes. A covelita pode ser oxidada quimicamente levando à formação de enxofre elementar (MONTEIRO; GARCIA; TUOVINEN, 1999), o qual pode dificultar a difusão de agentes oxidantes e, por conseguinte, diminuir a velocidade de oxidação do sulfeto. Logo, o *A. ferrooxidans* é capaz de acelerar a reação de oxidação da covelita pela remoção da camada de enxofre a qual reduz o ataque químico ao sulfeto, bem como pela geração de agentes lixiviantes. A reação simplificada da oxidação da covelita em meio ácido é representada pela equação abaixo:

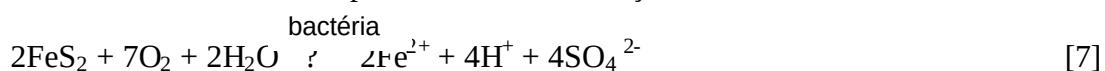


Muitos estudos relatam a dissolução da covelita pelo ataque químico-bacteriano (POGLIANI et al., 1990, MONTEIRO; GARCIA; TUOVINEN, 1999; SAKAKUCHI; TORMA; SILVER, 1976). Donati et al. (1996) obtiveram bons resultados na extração de cobre da covelita com a utilização de culturas mistas de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. Em ensaios utilizando-se o *A. thiooxidans* com a adição de S^0 e ferro II, a solubilização de cobre foi superior a 80%. Esta solubilização provavelmente está associada à capacidade do *A. thiooxidans* em oxidar o enxofre com a consequente geração de ácido. Todavia, os melhores resultados foram obtidos com culturas puras de *A. ferrooxidans*. Ensaios de lixiviação em frascos na presença de *A. ferrooxidans* crescido em enxofre mostraram solubilização de cobre muito similar a obtida com células crescidas em ferro II como fonte de energia (CURUTCHET; DONATI, 2000), indicando que a biolixiviação da covelita independe da fonte energética.

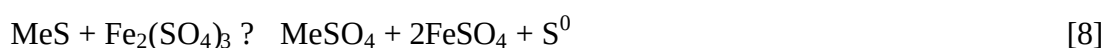
Alguns trabalhos demonstraram que a velocidade de oxidação da covelita pode ser acelerada pela adição de íons férricos ao meio (SAKAKUCHI; TORMA; SILVER, 1976; DONATI; PORRO; TEDESCO, 1988). Todavia, após algum tempo pode haver a precipitação de sais de ferro, como as jarositas, os quais recobrem a superfície da covelita e dificultam o ataque bacteriano (DONATI; PORRO; TEDESCO, 1988).

II.3. Mecanismos envolvidos na oxidação dos sulfetos metálicos

Silverman e Ehrlich (1964) foram os primeiros a tentar explicar o mecanismo da biolixiviação, baseados em duas possibilidades: o mecanismo direto e o mecanismo indireto. O mecanismo direto caracteriza-se pela adesão obrigatória da bactéria à superfície do sulfeto durante a dissolução oxidativa do mineral. Segundo este mecanismo, a solubilização do metal é promovida pelo ataque de um sistema enzimático presente na bactéria, diretamente sobre a superfície do mineral, promovendo a oxidação do S^{2-} e a conseqüente solubilização do metal de interesse. Abaixo pode ser vista a equação que representa a reação de oxidação direta da pirita, o sulfeto mais estudado no processo de biolixiviação:



Por outro lado, no mecanismo indireto, não há a adesão da bactéria sobre a superfície do mineral. Neste caso, a bactéria produz agentes lixiviantes pela oxidação de substratos solúveis, os quais oxidam quimicamente o sulfeto mineral. O principal produto dessa atividade bacteriana é o íon férrico, um poderoso oxidante que promove a solubilização do metal, como descrito na seguinte equação geral:



O sulfato ferroso (íon Fe^{2+}) e o enxofre elementar produzidos segundo a equação [8] serão constantemente oxidados pela bactéria num processo cíclico, conforme as equações [2] e [3], produzindo o sulfato férrico e o ácido sulfúrico, os quais terão uma ação lixivante sobre os sulfetos metálicos em geral, promovendo a solubilização dos metais. De tal modo, no mecanismo indireto, a bactéria participa somente com uma função catalítica, uma vez que as reações [2] e [3] são muito lentas na sua ausência. Em meio ácido, a bactéria chega a aumentar cerca de 500 000 vezes a velocidade de oxidação do íon ferroso (KARAVAIKO; GROUDEV, 1988).

Contudo, esta categorização quanto aos mecanismos envolvidos na biolixiviação de sulfetos metálicos foi redefinida com a inclusão de uma terceira categoria: o mecanismo indireto de contato (SILVERMAN, 1967), como mostra a Figura 3. A principal característica deste modelo é a hipótese de que íons férricos ou prótons são os únicos agentes lixiviantes dos sulfetos metálicos. Por conseguinte, o mecanismo direto proposto originalmente para a dissolução bacteriana está sendo revisto e, sua existência é questionada por vários autores (SAND et al., 1995, CRUNDWELL, 2001, KINZLER et al. 2003).

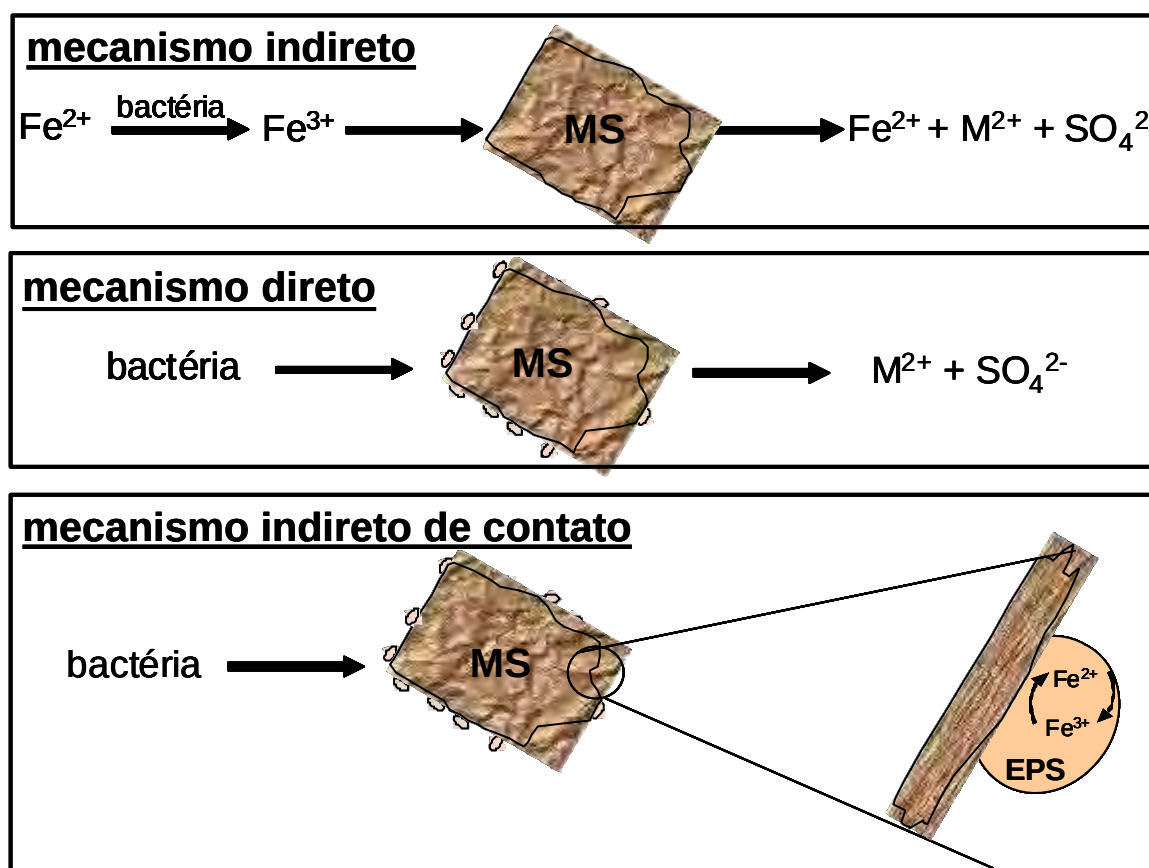


Figura 3. Esquema dos possíveis mecanismos de interação bactéria-substrato envolvidos na biolixiviação dos sulfetos minerais. MS – sulfeto metálico.

Um outro mecanismo ainda importante na dissolução dos sulfetos metálicos é a formação de um par galvânico (NATARAJAN, 1990). Sabe-se que muitos sulfetos metálicos

são condutores ou semi-condutores. Portanto, em um sistema de biolixiviação, estes diferentes sulfetos se comportam como eletrodos, possuindo cada qual um determinado potencial de óxido-redução. De tal modo, quando mais de um sulfeto mineral encontra-se em um mesmo sistema de biolixiviação, um deles se comporta como catodo enquanto o outro se comportará como anodo. Desta forma ocorrerá a dissolução preferencial de um sulfeto em detrimento do outro. No entanto, este mecanismo não tem grande importância dentro do contexto deste trabalho, uma vez que os sulfetos metálicos utilizados são sintéticos e apresentam elevado grau de pureza.

Neste contexto, os fundamentos bioquímicos da lixiviação bacteriana assim como a função do enxofre durante o processo são objetos de intensas investigações. Recentemente, alguns autores propuseram que apenas dois principais mecanismos de reação controlam a dissolução dos sulfetos metálicos, o mecanismo dos polissulfetos e o mecanismo do tiosulfato, sendo a configuração eletrônica dos sulfetos aspecto determinante no caminho a ser seguido (SAND et al., 2001; ROHWERDER et al., 2003). A Figura 4 mostra um esquema de ambos os mecanismos com seus principais produtos intermediários e finais.

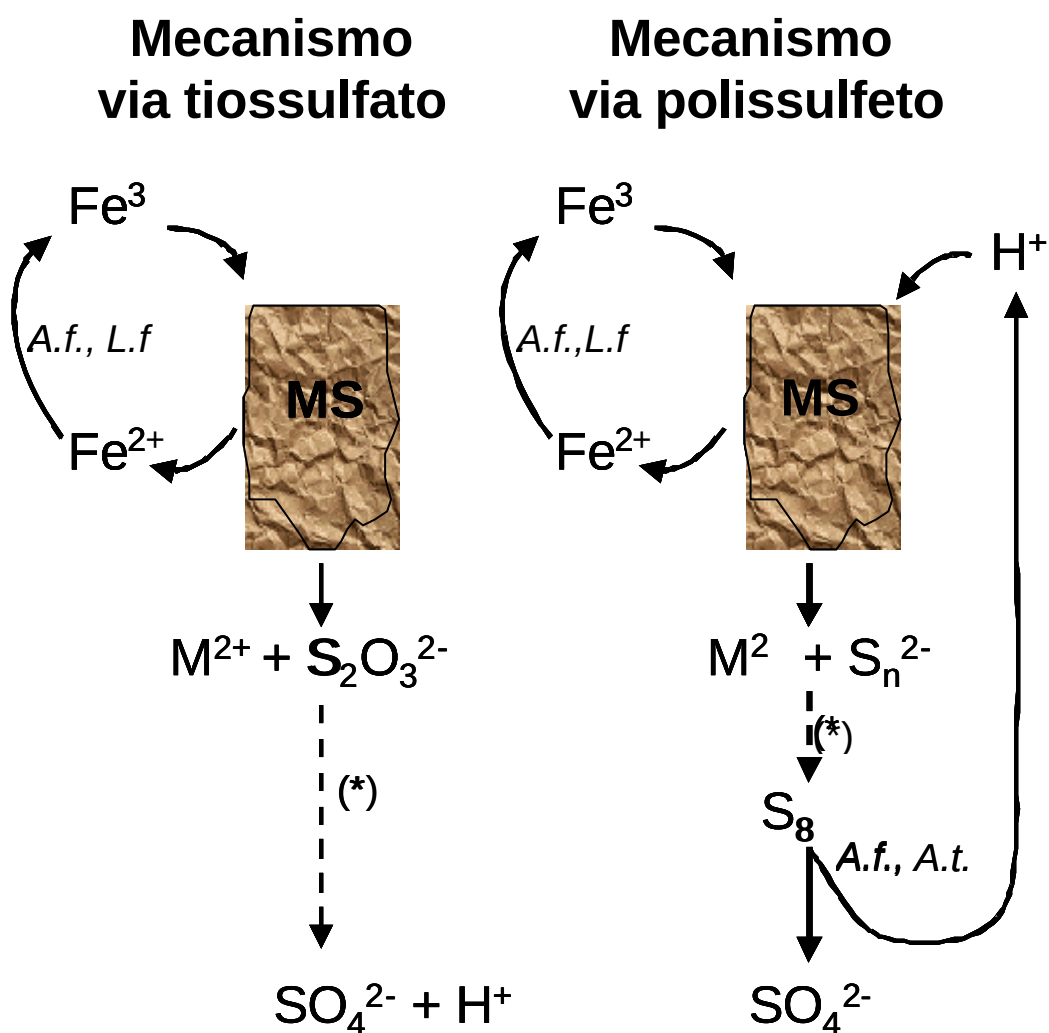


Figura 4. Esquema comparativo do mecanismo de biolixiviação via tiosulfato (A) e polissulfetos (B). *A.f.* – *A. ferrooxidans*; *A.t.* – *A. thiooxidans*; *L.f.* – *Leptospirillum ferrooxidans*. $(*)$ passos que podem envolver tanto *A.f.* quanto pelo *A.t.* (ROHWERDER et al., 2003)

II.3.1 Os mecanismos dos polissulfetos e do tiosulfato

De acordo com a Teoria do Orbital Molecular (TOM) e a Teoria da Ligação de Valência (TLV), os orbitais dos átomos ou moléculas constituem bandas com diferentes níveis energéticos, sendo a banda de mais alto nível de energia ainda preenchida com elétrons, designada banda de valência. No caso dos sulfetos metálicos, quando esta banda de valência é derivada tanto do átomo metálico quanto do átomo de enxofre, a ligação metal-enxofre tem seu rompimento facilitado pelo ataque de prótons H^+ . Assim, sulfetos como covelita (CuS), calcocita (CuS₂) e esfarelita (ZnS), os quais possuem a banda de valência preenchida com elétrons do átomo metálico e do enxofre, são denominados solúveis em ácido.

Como consequência, a solubilização destes sulfetos pode ocorrer tanto pela ação oxidante dos íons férricos, quanto pelo ataque de prótons. Nesta classe de sulfetos, as reações de oxidação ocorrem via mecanismo dos polissulfetos, e acontecem somente após a clivagem da ligação metal-enxofre (SCHIPPERS; JOZSA; SAND, 1996; SCHIPPERS; SAND, 1999; SAND et al., 2001). No caso do ataque por prótons, o primeiro passo na oxidação dos sulfetos ditos solúveis em ácido é descrito pela formação de H₂S e solubilização do metal correspondente (TRIBUTSCH; BENNET, 1981; TRIBUTSCH, 2000; SAND et al., 2000), como mostra a equação geral abaixo:



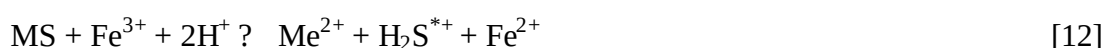
Um importante e crítico fator desta solubilização dos sulfetos em ácido são as constantes dos produtos de solubilidade (Kps) destes sulfetos metálicos (TRIBUTSCH; BENNET, 1981). Quanto maior for o valor de Kps de um determinado sulfeto maior será sua susceptibilidade ao ataque ácido e, por conseguinte, ao ataque bacteriano (TRIBUTSCH; BENNET, 1981; TRIBUTSCH, 2000). Assim, a solubilidade do sulfeto em ácido é proporcional ao seu valor de Kps e a concentração de prótons em solução.

De acordo com Tributsch e Bennet (1981), o ataque de prótons aos sulfetos gera grupos SH⁻ em sua superfície pela protonação de átomos de enxofre. Estes grupos SH⁻ são caracterizados por estados eletronicamente diferentes dos átomos de enxofre não protonados, e por sua vez enfraquecem a ligação com a estrutura cristalina. A formação desta ligação enfraquecida permite que um posterior ataque de prótons remova uma molécula de H₂S.

Na ausência de bactérias oxidantes de enxofre, bem como de outros oxidantes químicos, como por exemplo, o íon férrico, o H₂S formado pode ser oxidado a enxofre de acordo com as equações [10] ou [11]. Na presença de bactérias como o *A. ferrooxidans*, este H₂S gerado pode ser oxidado tanto quimicamente quanto microbiologicamente a enxofre, o qual é posteriormente oxidado a sulfato.



No caso do ataque pelos íons férricos, o rompimento das ligações químicas entre o metal e o enxofre pode ser provocado pela remoção de um elétron do átomo de enxofre. Este passo acontece concomitantemente ao ataque de prótons (SAND et al., 2001, ROHWERDER et al., 2003), pelo qual é formado o radical H₂S^{*+}, como mostra a reação [12]:



Posteriormente, como demonstraram Steudel (1996) e Sand et al. (2001), uma série de reações envolvendo a formação de polissulfetos radicais ocorrem até a formação de enxofre elementar. Por isso este mecanismo foi denominado de “polissulfetos”. Por este processo, mais de 90% do sulfeto é transformado em enxofre elementar, sendo formados também, embora minoritariamente, tiosulfato, politionatos e sulfato (STEUDEL, 1996; SCHIPPERS & SAND, 1999). As equações [13], [14] e [15] resumizam estas etapas para o caso da covelita, sulfeto utilizado no presente trabalho. Apenas na presença do *A. ferrooxidans* o S⁰

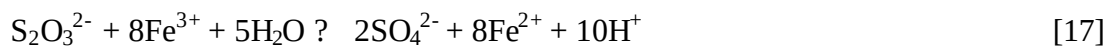
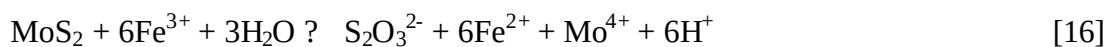
formado pode ser oxidado a sulfato, o que além de regenerar os prótons H^+ remove a camada de enxofre elementar da superfície do sulfeto metálico.



Em contrapartida, este mecanismo de reação via ataque de prótons não é válido quando a banda de valência do sulfeto não é derivada dos orbitais 3p do átomo de enxofre, mas sim dos orbitais 'd' do átomo metálico, fato que dificulta a quebra da ligação metal-enxofre. Importantes exemplos são o MoS_2 , WS_2 e FeS_2 , os quais são classificados como sulfetos insolúveis em ácido. Logo, sulfetos como MoS_2 , WS_2 e FeS_2 , os quais exibem altos valores de Kps devido suas peculiares estruturas eletrônicas, não são solubilizados pelo ataque de prótons, sendo também mais resistentes ao ataque bacteriano e à oxidação química (SAND et al., 2001).

Estudos realizados (SCHIPPERS; JOZSA; SAND, 1996; SAND et al., 2001, ROHWERDER et al., 2003) com estes sulfetos, classificados como insolúveis em ácido, indicaram que os mesmos são oxidados apenas pelo ataque do íon férrico, via mecanismo do tiosulfato. Neste sentido, estes autores (SCHIPPERS; JOZSA; SAND, 1996; SAND et al., 2001, ROHWERDER et al., 2003) argumentam que na ausência de íons férricos o *A. ferrooxidans* não é capaz de oxidar os referidos sulfetos. Nesta classe de sulfetos, o rompimento da ligação química metal-enxofre ocorre após seis passos sucessivos de extração de elétrons por íons férricos, com a conseqüente formação de tiosulfato (SCHIPPERS; JOZSA; SAND, 1996; SAND et al., 2001, ROHWERDER et al., 2003). Anteriormente a oxidação do tiosulfato a sulfato, alguns produtos intermediários como tetrations e politions são formados. Na ausência de bactérias oxidantes de enxofre, pode ser formada

uma quantidade significativa de enxofre (entre 10 e 20%). As equações [16] e [17] sumarizam o mecanismo do tiosulfato, mostrando os principais produtos intermediários e finais.



Na equação [17], a oxidação do tiosulfato pode ocorrer tanto quimicamente, por ação do íon férrico, quanto biologicamente, pela ação do *A. ferrooxidans* ou *A. thiooxidans*, com conseqüente consumo de oxigênio (equação [4]). A função da bactéria, neste modelo, é regenerar os íons férricos responsáveis pela oxidação.

Um fator determinante nos modelos descritos acima; em detrimento do mecanismo direto; é que, quando aderida a superfície do mineral, o ataque da bactéria aos sulfetos ocorre por mediação das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), as quais circundam as células bacterianas. Estas substâncias, por sua vez, complexam íons férricos presentes no meio, os quais serão os responsáveis pelo processo de biolixiviação. A bactéria, nestes modelos, tem apenas a função catalítica de regenerar os íons Fe^{3+} e/ou H^+ , tal qual no mecanismo indireto, bem como de concentrá-los na interface mineral-solução ou mineral-célula bacteriana através dos EPS, de forma a elevar a degradação do sulfeto mineral. Desta forma, o papel preponderante da oxidação dos sulfetos insolúveis em ácido é dos íons férricos complexados aos EPS. Ao mesmo tempo, nos sulfetos solúveis em ácido, além dos íons férricos os prótons H^+ também podem contribuir com a solubilização dos sulfetos.

II.3.2 As substâncias poliméricas extracelulares e as interações com os sulfetos metálicos

Pelo fato dos sulfetos metálicos serem substratos sólidos, grande parte das células bacterianas se encontra aderida à superfície mineral. Embora já se tenha demonstrado que os EPS não são um pré-requisito para que ocorra a adesão bacteriana (BEVILAQUA et al.,

2004), também é conhecido que as células bacterianas aderidas ao sulfeto têm sua produção de EPS estimulada (VANDEVIRE; KIRCHMAN, 1993; GERHKE et al. 1998), o que colabora com o fato dos exopolímeros possuírem importante papel no processo de adesão. Gerhke et al. (1998) demonstraram que células de *A. ferrooxidans* quando crescidas em pirita produzem cerca de 13 vezes mais EPS do que quando crescidas em meio contendo íon ferroso.

A hidrofobicidade e as interações eletrostáticas são os mais importantes fatores na adesão bacteriana. De acordo com Rohwerder et al. (2003), fundamentalmente interações eletrostáticas entre as células bacterianas carregadas positivamente (causado pela complexação de íons Fe^{3+}), e a superfície da pirita carregada negativamente, são responsáveis pela adesão bacteriana neste sulfeto. Neste caso, interações hidrofóbicas não contribuem significativamente para a adesão bacteriana. Sendo assim, células crescidas em meio contendo enxofre como fonte energética, por possuírem uma considerável mudança na composição do EPS em relação às células crescidas em pirita, têm a adesão sobre este sulfeto desfavorecida.

Em relação a covelita, a adesão bacteriana é mediada por interações hidrofóbicas (CURUTCHET; DONATI, 2000; POGLIANI; DONATI, 1999), embora, assim como na pirita, interações eletrostáticas possam mediar tal processo. Curutchet e Donati (2000) mostraram que quanto maior a concentração de íons H^+ na superfície das células bacterianas, maior foi a adesão em covelita. Isto porque o CuS , em valores baixos de pH, possui a superfície carregada negativamente e, por sua vez, a elevada concentração de prótons nas células bacterianas deixam as mesmas carregadas positivamente, favorecendo a interação eletrostática. Ao mesmo tempo, células crescidas em S^0 têm sua adesão na covelita favorecida devido a maior hidrofobicidade, a qual supera a contribuição eletrostática (POGLIANI; DONATI, 1999). No que concerne a adesão bacteriana na molibdenita, o fator preponderante é o caráter hidrofóbico (PISTACCIO et al., 1994).

Para o caso de linhagens bacterianas de *A. ferrooxidans* crescidas em pirita e meio contendo íon ferroso, os EPS consistem basicamente de açúcares (principalmente glicose, ramnose, fucose, xilose e manose), ácidos graxos com cadeias de 12 a 20 carbonos, ácido glicurônico e Fe^{3+} (KINZLER et al., 2003; GERHKE et al., 1998). Quando crescidas tendo o S^0 como fonte energética, além de não conter íons férricos (GERHKE et al. 1998), a composição dos exopolímeros das células de *A. ferrooxidans*, no que se refere aos açúcares, é drasticamente modificada. Os açúcares presentes nos EPS passam a ser constituídos quase exclusivamente de glicose (em torno de 40%), contendo uma pequena fração de ácido glicurônico (0,6%). Em relação aos ácidos graxos, a relação percentual aumenta de 42% para 60%, o que confere um caráter mais hidrofóbico às células crescidas neste substrato, como discutido por diversos autores (POGLIANI; DONATI, 1999; NATARAJAN; DAS, 2003).

Apesar de haver uma aceitação sobre o papel dos EPS no processo de oxidação dos sulfetos metálicos, mediando os processos de adesão e ataque por meio dos íons férricos, nada pode ser ainda considerado definitivo a respeito destes fatos. Deste modo, a elucidação destes mecanismos poderá contribuir para um melhor entendimento de tal processo visando a otimização do processo de biolixiviação. Além disso, a maior parte dos estudos pelos quais são descritos os mecanismos de ação bacteriana foram conduzidos com pirita, cujo metal presente é o ferro, o que possibilita a ocorrência dos três mecanismos possíveis de ação bacteriana.

III. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de oxidação do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos sintéticos molibdenita e covelita (classificados diferentemente quanto suas suscetibilidades ao ataque bacteriano), no contexto dos mecanismos do polissulfeto e do tiosulfato, destacando-se os seguintes aspectos:

- Avaliar o efeito da concentração de ambos sulfetos na atividade bacteriana
- Estudar a cinética de oxidação bacteriana da covelita e molibdenita
- Verificar a influência das diferentes fontes energéticas de crescimento na capacidade de oxidação dos sulfetos pela bactéria
- Analisar a importância dos EPS e do íons férricos na atividade bacteriana
- Verificar a possível existência de uma ação direta da bactéria sobre os sulfetos metálicos

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Linhagem bacteriana

Para a realização dos estudos foi utilizada a linhagem bacteriana *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR, isolada de licor de lixiviação estática de minério de urânio proveniente da mina de Lagoa Real-Bahia (GARCIA, 1991).

IV.2. Amostras minerais

Foram utilizados dois sulfetos metálicos sintéticos, covelita (CuS) e molibenita (MoS₂), fornecidos pela Aldrich Chemical Company Incorporation (Milwaukee, EUA). A granulometria das amostras foi 100% < 0,2 mm e a pureza > 99,0%. As amostras também foram caracterizadas por difratometria de Raios-X em equipamento X D5000 – Siemens.

IV.3. Meios de cultura

Para a manutenção periódica da linhagem bacteriana assim como para a obtenção de células para a realização dos estudos de oxidação dos sulfetos utilizou-se o meio de cultura “T&K” (TUOVINEN; KELLY, 1973), bem como o meio 9K (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959). Abaixo pode ser vista a composição e o modo de preparo dos meios de cultura citados:

IV.3.1 Meio T&K

A. Reagentes

Solução A:

(NH₄)₂SO₄ 0,5 g

K_2HPO_4 0,5 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
 pH (H_2SO_4 concentrado).....1,8
 água destilada q.s.p 800 mL

Solução B:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33,3 g
 pH (H_2SO_4 concentrado).....1,8
 água destilada q.s.p. 200 mL

B. Procedimento

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

IV.3.2. Meio 9K

A. Reagentes

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g
 K_2HPO_4 0,5 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
 pH (H_2SO_4 concentrado).....2,8
 água destilada q.s.p 700 mL
 S^0 1%

B. Procedimento

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

IV.4. Preparo da suspensão celular

Para a realização dos ensaios de oxidação dos sulfetos metálicos utilizou-se suspensões concentradas do *A. ferrooxidans* LR. As suspensões do *A. ferrooxidans* LR foram obtidas de culturas crescidas em um volume de 1,5 L do meio de cultura “T&K” por 48 horas. Este crescimento foi acompanhado pela oxidação do íon ferroso a íon férrico, caracterizado pela mudança da coloração do meio, do verde característico do íon Fe^{2+} ao vermelho característico do íon Fe^{3+} . Para as suspensões crescidas em meio 9K, o crescimento foi acompanhado por medidas de pH, o qual diminui com a oxidação bacteriana do enxofre. O crescimento em meio 9K foi realizado por três gerações em um volume de 0,5 L do meio 9K, por um período de cerca de 15 dias, tempo hábil para a obtenção de considerável massa celular sem que a diminuição do pH (em torno de 1,5) cause inibição na linhagem bacteriana. Todas as culturas foram crescidas à temperatura de 30 °C em mesa agitadora com rotação de 150 rpm.

Após o crescimento, filtrou-se as culturas em papel de filtro Watman nº 1 para a retirada de precipitados do meio. A seguir centrifugou-se a solução (rotor JA-10, centrífuga Beckman Avanti J-25) à temperatura de 4 °C e 10.000 g durante 30 minutos. O precipitado contendo a suspensão celular coletada foi então lavado em água acidificada (pH 1,8) com H_2SO_4 por três vezes e novamente centrifugada. Em seguida o precipitado de células foi ressuspenso em um volume de 10 mL de água acidificada a pH 1,8 com H_2SO_4 . Para a realização dos testes onde foi retirada a camada exopolimérica das células bacterianas, a suspensão celular foi centrifugada por três vezes a 13.000 g, de acordo com procedimento descrito por Sand et al. (1995).

IV.5. Dosagem de proteínas totais (HARTREE, 1972)

Para quantificação de proteína total da biomassa celular utilizou-se 1mL da suspensão de células, a qual foi centrifugada a 4000 g por 20 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 1mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e mantidas em ebulição por 30 minutos para a completa hidrólise das células. Para a dosagem de proteína total retirou-se alíquotas dessa solução e utilizou-se o método de Lowry modificado por Hartree (1972) como descrito abaixo:

A. Reagentes

Solução A:

KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	0,5 g
Na ₂ CO ₃	25 g
NaOH 1 Mol L ⁻¹	125 mL
água destilada.....	q.s.p. 250 mL

Solução B:

KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	0,2 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,1 g
NaOH 1Mol L ⁻¹	1,0 mL
água destilada.....	9,0 mL

Solução C:

reagente de Folin-Ciocalteu.....	10,0 mL
água destilada.....	30,0 mL

B. Procedimento

A suspensão de células hidrolisadas foi diluída (1:10, 1:20) e colocada em tubos de ensaio (1 mL de cada diluição), aos quais adicionou-se 0,9 mL da solução A incubando-se em banho-maria por 10 minutos à uma temperatura de 50 °C, e resfriando em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,1 mL da solução B a cada tubo. Por último adicionou-se 3 mL da solução C incubando-se os tubos por 30 minutos a 50 °C e resfriando a temperatura ambiente. Para a quantificação da proteína total, medidas da absorbância das soluções foram feitas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando a soroalbumina bovina para a obtenção da curva padrão.

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

IV.6. Estudos de respirometria celular

A técnica de respirometria celular permite uma avaliação rápida e bastante sensível (ordem de µmol de oxigênio consumido) da oxidação do substrato. Esta técnica utiliza suspensões lavadas de células do *A. ferrooxidans* LR desacoplada de crescimento, ou seja, por ausência de CO₂ não estão em processo de divisão celular. Para executar estes ensaios as células foram incubadas na presença de massas variáveis de CuS e MoS₂ (20-300 mg para os estudos cinéticos; 100 e 200 mg para os demais ensaios).

Metodologia experimental

A. Reagentes:

- água acidificada com H_2SO_4 concentrado até pH 1,8

H_2SO_4 0,5 Mol L^{-1} 14 mL

água destilada q.s.p. 100 mL

- KOH, 20%.

- solução de Brodie:

NaCl 23 g

cloreto de sódio 5 g

azul de Evans 0,1 g

água destilada q.s.p. 500 mL

B. Procedimento

O respirômetro de Warburg (UMBREIT; BURRIS; STAUFFER, 1972) consiste basicamente de um frasco de reação, um reservatório lateral para adição de células e um poço central. Em cada um dos frascos de reação foram colocados 2,0 mL de água acidificada (pH 1,8), 0,5 mL de suspensão celular e uma massa dos sulfetos que variou de 20 a 300 mg. Em paralelo aos ensaios inoculados foram realizados ensaios como controles químicos, nos quais não houve adição da suspensão celular. Todos os ensaios respirométricos foram realizados em triplicatas.

No poço central do frasco de reação foi colocada uma tira de papel de filtro pregueada, a qual foi embebida com 0,1 mL de KOH 20% com o intuito da absorção do CO_2 . Este procedimento teve como objetivo a eliminação desse gás do sistema para evitar o crescimento da bactéria pela fixação do mesmo, pois esta é uma espécie autotrófica, e também para que não houvesse interferência nas leituras da variação de pressão. Logo, qualquer modificação na pressão foi decorrente do consumo de oxigênio durante a oxidação do substrato. No compartimento principal do frasco ocorrem as reações a serem investigadas. Para execução do

ensaio foi acoplado a esses frascos manômetros graduados, os quais contém um líquido de densidade conhecida (solução de Brodie). Um esquema deste sistema é mostrado na Figura 5.

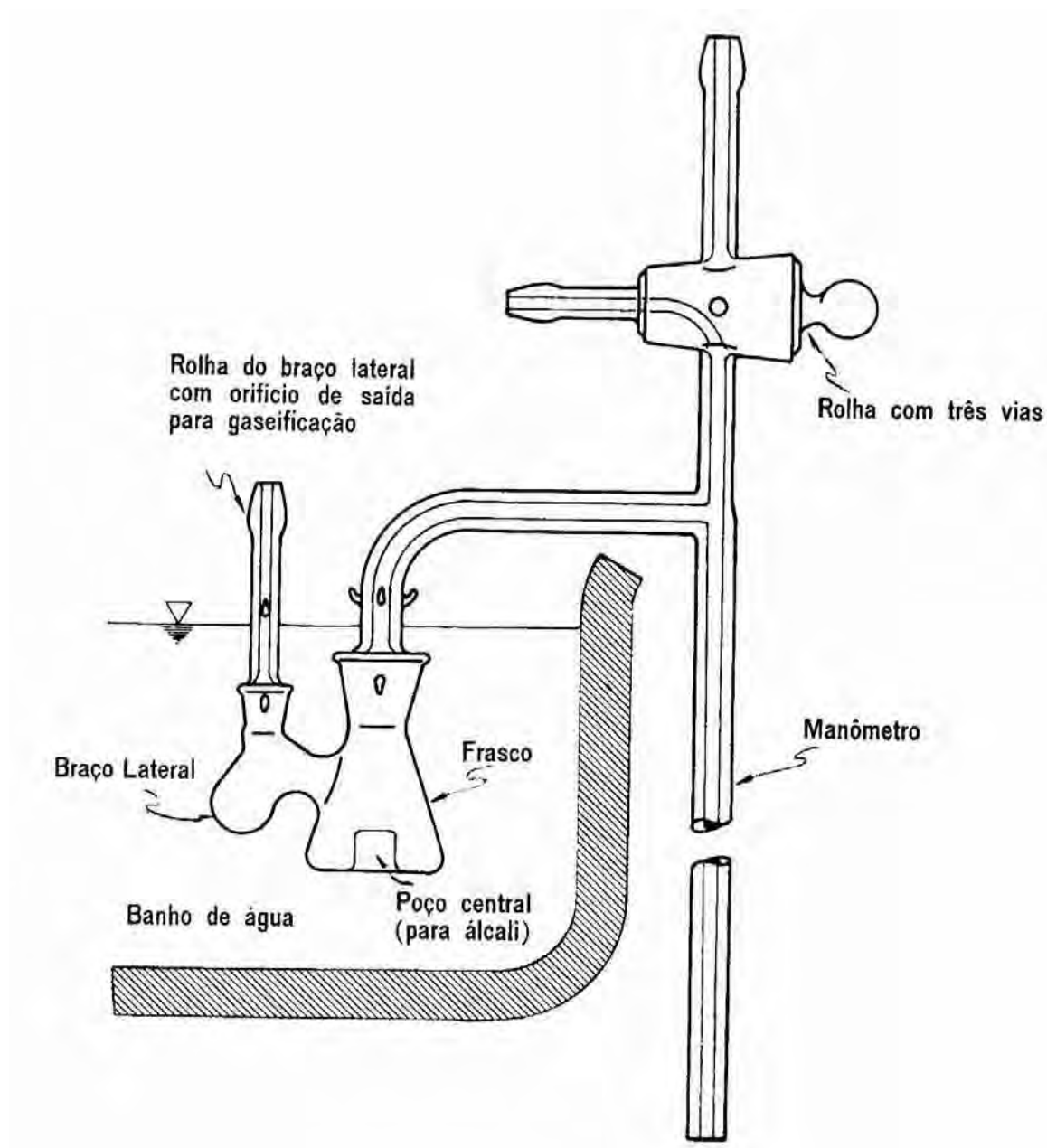


Figura 5. Esquema básico do aparelho de Warburg.

O manômetro é constituído de dois ramos que se comunicam entre si em suas bases através de um tubo de borracha, obturado na extremidade inferior. Um dos ramos (esquerdo), permanece constantemente aberto durante o experimento enquanto o da direita termina no frasco de reação. Quando ocorre o consumo de oxigênio há uma diminuição da pressão e o menisco da solução de Brodie no ramo da direita se eleva. Essa diferença é indicada em milímetros na escala graduada e deve ser transformada em microlitros. Para tanto, multiplica-se a variação da altura em milímetros por uma constante (K), cujo cálculo é o que se segue:

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

onde:

V_T - volume do conjunto frasco-manômetro.

V_f - volume final do sistema experimental.

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

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

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

Frascos de reação contendo o mesmo volume, porém sem células, foram utilizados como controles para avaliar a oxidação química natural dos substratos. Junto com o experimento também foi colocado um conjunto chamado de termobarômetro, contendo o mesmo volume do sistema experimental, porém só com água, o qual indicou variações de pressão causadas por mudanças de temperatura do ambiente. Essa variação foi registrada no mesmo instante da leitura dos manômetros dos ensaios e descontada das medidas destes, pois tal variação não foi causada pelo sistema experimental. Todo o conjunto frasco-manômetro foi mantido em um banho de água a 30°C e sob agitação constante. As leituras da variação de pressão no manômetro, realizadas a cada 15 minutos na primeira hora e a cada 30 minutos

após a primeira hora de ensaio, foram então convertidas em volume de oxigênio consumido, como mostrado abaixo:

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

onde:

L - representa a leitura do manômetro.

K - constante do sistema frasco-manômetro.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Caracterização das amostras por difratometria de raios-X

As Figuras 6 e 7 mostram os difratogramas de raios-X obtidos para as amostras sintéticas de molibdenita e covelita respectivamente. A análise dos difratogramas revela, como esperado, apenas a presença destes sulfetos, uma vez que ambos possuem elevado grau de pureza.

V.2 Ensaio respirométrico com *A. ferrooxidans* LR crescido em íon ferroso

De acordo com as equações simplificadas [5] (pg. 8) e [6] (pg. 10), de oxidação da molibdenita e da covelita respectivamente, pode-se notar que as mesmas ocorrem concomitante ao consumo de oxigênio e formação de sulfato e dos metais molibdênio IV e cobre II. Logo, as medidas do consumo de oxigênio obtidas a partir dos ensaios respirométricos estão diretamente relacionadas a oxidação dos referidos sulfetos metálicos.

A Figura 8 mostra o consumo de oxigênio de covelita na presença e ausência do *A. ferrooxidans* LR. Para todas as massas utilizadas pode ser observado um maior consumo de oxigênio nos ensaios realizados na presença de bactéria, quando comparado aos respectivos ensaios realizados como controles químicos. Este fato evidencia a capacidade do *A. ferrooxidans* LR em aumentar a velocidade de oxidação da covelita (CuS), como já demonstrado por diversos trabalhos (POGLIANI et al., 1990; MONTEIRO; GARCIA; TUOVINEN, 1999). Outro aspecto que merece ser ressaltado é o aumento do consumo de oxigênio pela bactéria, à medida em que se aumenta a massa de sulfeto utilizada no ensaio, o que sugere uma cinética de saturação pelo substrato.

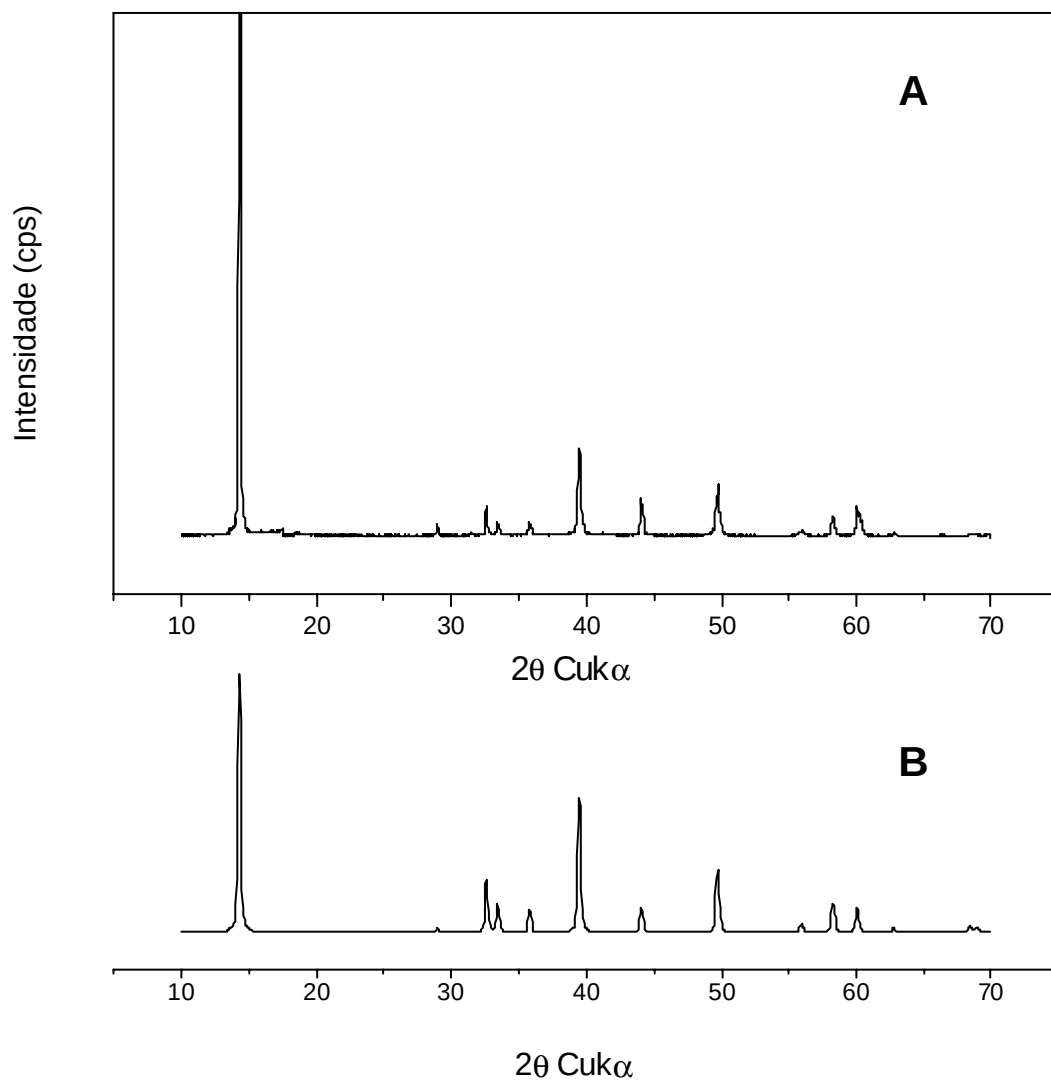


Figura 6. Difratomogramas de Raios-X obtidos para a amostra de molibdenita (A) utilizada nos estudos de respirometria com o respectivo do padrão de molibdenita PDF 37-1492 (B).

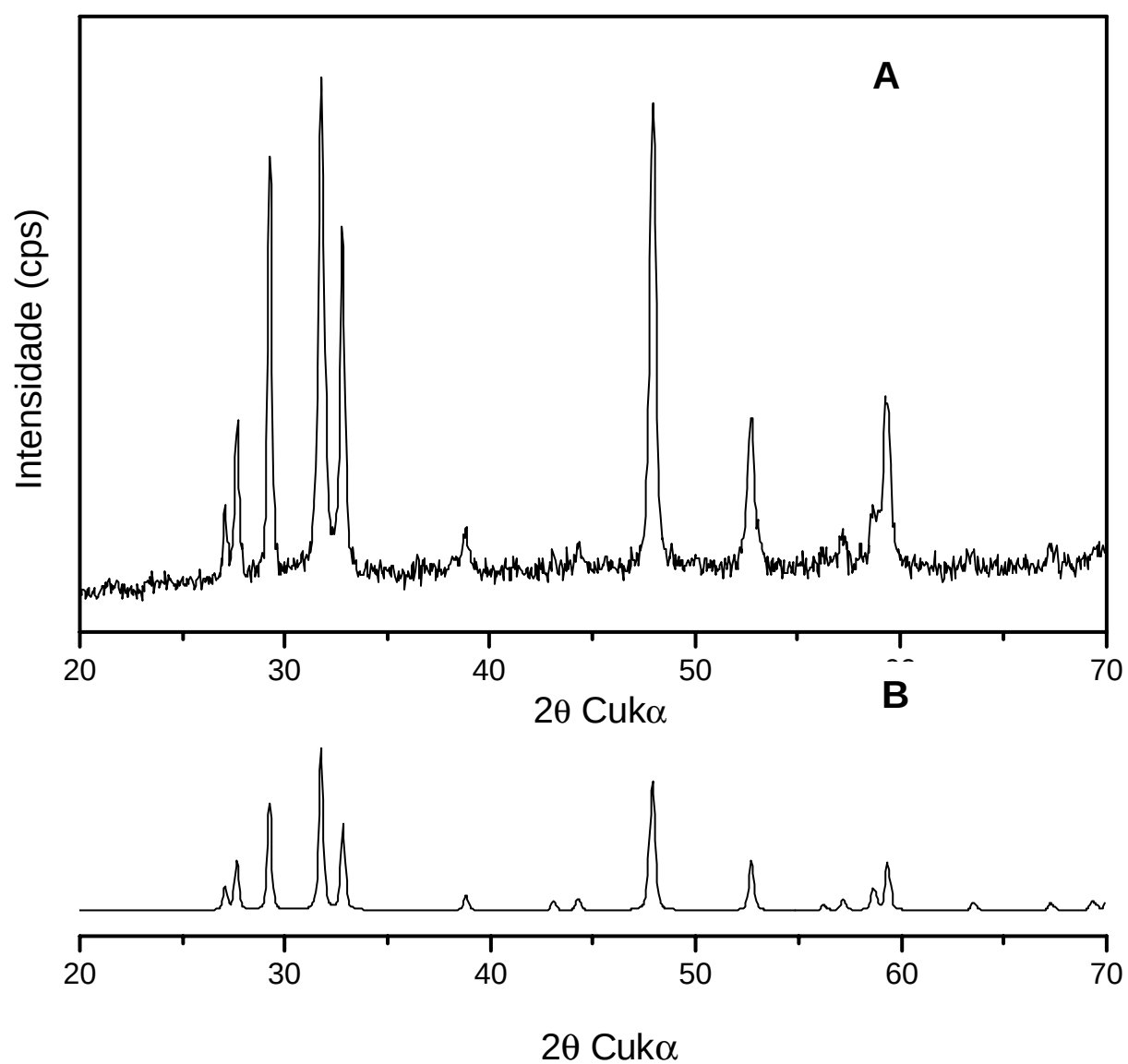


Figura 7. Difratogramas de Raios-X obtidos para a amostra de covelita (A) utilizada nos estudos de respirometria com o respectivo do padrão de covelita PDF 6-464 (B).

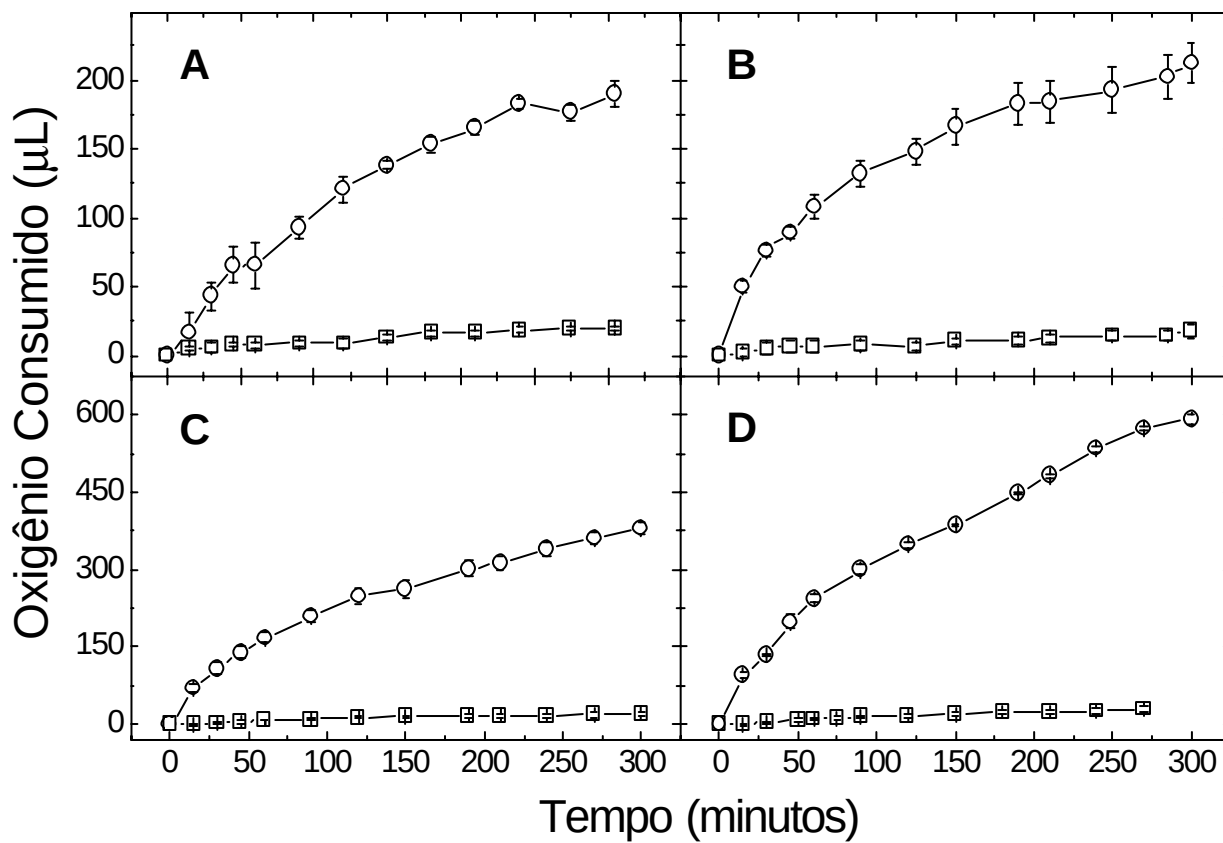


Figura 8. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (500μg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A), 150 mg (B), 200 mg (C) e 300 mg (D) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

Já em relação aos ensaios realizados com o sulfeto de molibdênio, não se observou atividade de oxidação no mesmo, caracterizado pelo não consumo de oxigênio pela bactéria durante os experimentos, como mostra a Figura 9. Tal fato deve estar associado a alta hidrofobicidade apresentada pela molibdenita (PISTACCIO et al., 1994), não permitindo, portanto, o ataque da bactéria ao sulfeto metálico. Para contornar tal problema testou-se a utilização do agente surfactante Tween 80 nos ensaios respirométricos. Foram testadas as concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5%. A concentração de 1% não foi testada pois a mesma provoca a inibição da atividade bacteriana (PISTACCIO et al., 1994). Como demonstra a Figura 10, o melhor comportamento foi observado para a concentração de 0,5% de Tween 80. Pistaccio et al., (1994) demonstraram que esta concentração também foi a que apresentou os melhores resultados tanto na solubilização de molibdênio, quanto na adesão bacteriana.

Como mostra a Figura 11, a atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR em molibdenita realmente foi observada na presença do agente surfactante, devido a diminuição da hidrofobicidade do sulfeto. Entretanto, em nenhum dos experimentos, o O₂ consumido atinge valores elevados, permanecendo sempre abaixo dos 100 µL. Alguns estudos (ROMANO et al. 2001a, 2001b) já haviam revelado a natureza refratária da molibdenita em ensaios de lixiviação bacteriana, nos quais a solubilização de molibdênio foi menor do que 1%. Em relação à concentração do substrato, o comportamento foi similar ao observado para a covelita, ou seja, o aumento da massa de sulfeto ocasionou também um aumento do consumo de oxigênio.

Outro aspecto importante e que deve ser salientado foi o maior consumo de oxigênio nos ensaios com covelita em relação aos ensaios com molibdenita (em torno de 10 vezes), o que pode ser facilmente notado quando se compara as Figuras 8 e 11.

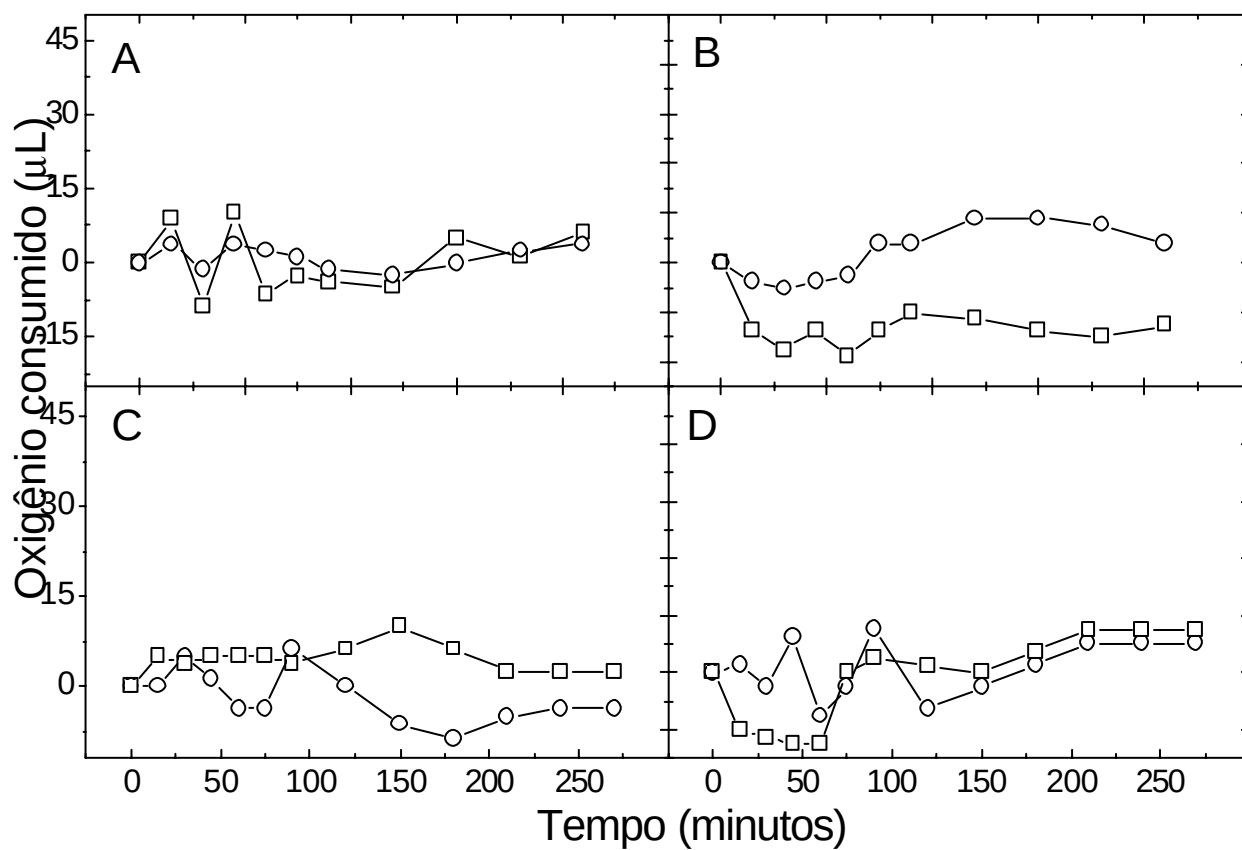


Figura 9. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (420µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A), 150 mg (B), 200 mg (C) e 300 mg (D) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

A maior susceptibilidade da covelita em relação a molibdenita frente ao ataque químico-bacteriano já foi demonstrado anteriormente (TRIBUTSCH e BENNET, 1981). Possivelmente, tal comportamento decorre das estruturas eletrônicas destes sulfetos metálicos. Desta maneira, a covelita, cujo valor de K_{ps} é da ordem 10^{-35} , possui maior solubilidade em ácido, diferentemente da molibdenita, cujo valor de K_{ps} é mais baixo, da ordem 10^{-48} . Assim, a covelita é denominada um sulfeto solúvel em ácido, o que facilita sua oxidação. Por outro lado, a molibdenita pertence a classe dos sulfetos insolúveis em ácido, podendo ser atacada apenas por íons Fe^{3+} (SCHIPPERS; SAND, 1996; SAND et al., 2001). Este fator parece ser preponderante na eficiência da oxidação de um e outro sulfeto metálico, e mostra ser a principal razão para as diferentes susceptibilidades dos sulfetos ao ataque químico-bacteriano.

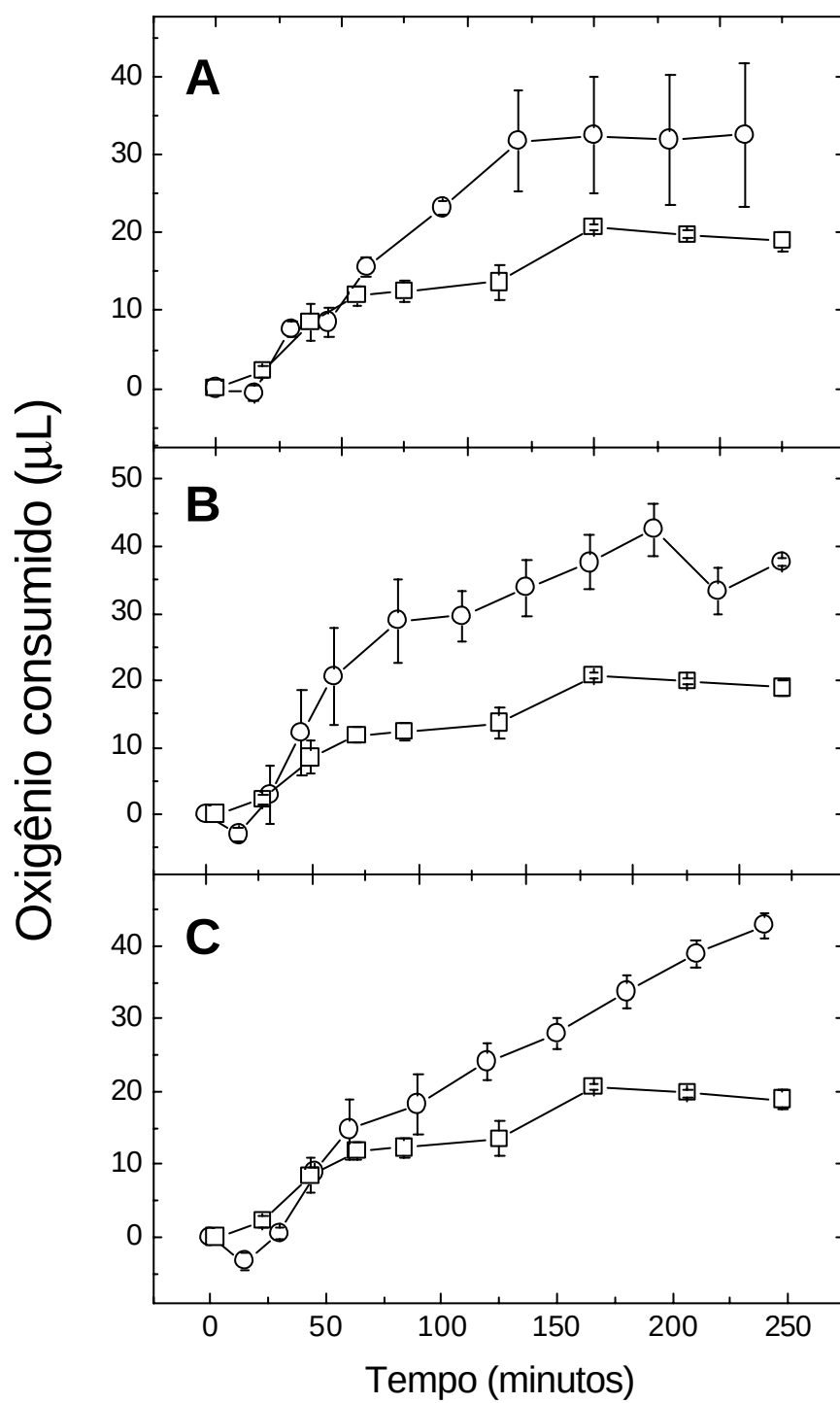


Figura 10. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (420µg de proteína total) na presença de molibdenita (100 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) com diferentes concentrações de Tween 80. A (0,1%), B (0,25%) e C (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

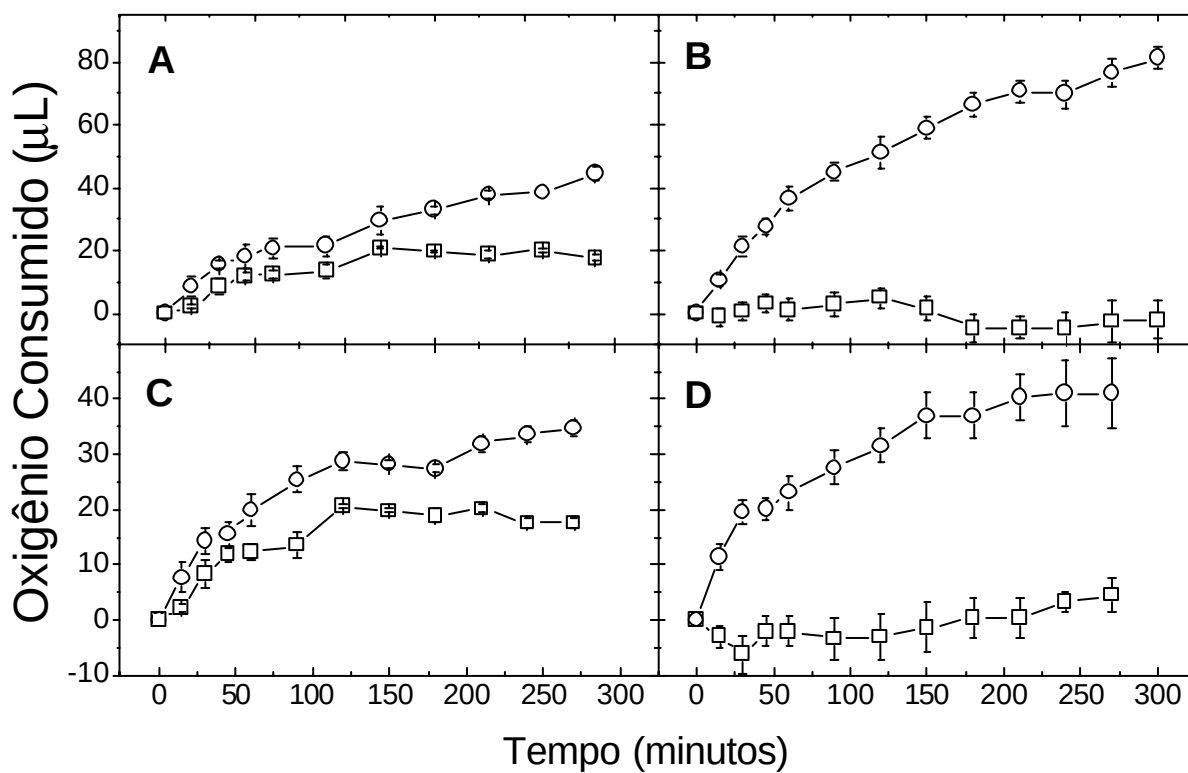


Figura 11. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR (420 μg de proteína total) na presença de massas de 20 mg (A), 50 mg (B), 100 mg (C), e 200 mg (D) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

V.3. Estudos da cinética de oxidação da covelita e da molibdenita

Nenhum estudo preliminar a respeito da cinética de oxidação da covelita e da molibdenita pelo *A. ferrooxidans* foi encontrado na literatura, portanto, os resultados obtidos neste trabalho parecem ser pioneiros. Para o estudo da cinética de oxidação dos sulfetos metálicos, foram calculadas as velocidades iniciais de oxidação em cada massa de sulfeto utilizada, e a partir destas, construída uma curva das velocidades de oxidação em relação à massa de substrato. As velocidades iniciais de oxidação foram obtidas a partir do coeficiente angular da parte linear das curvas de consumo de oxigênio de ambos os sulfetos.

Como observado pela Figura 12, a covelita apresenta um típico comportamento de saturação pelo substrato, embora sua oxidação não siga a clássica cinética de Michaelis-Menten, como pode ser visto pelo aspecto sigmoidal da curva em oposição à hipérbole retangular característica de Michaelis-Menten. Como também pode-se notar, a velocidade de oxidação da covelita pelo *A. ferrooxidans* LR não tende a se alterar significativamente para massas acima de 300 mg, indicando a saturação pelo substrato.

Uma curva sigmoidal deste tipo indica que o início da oxidação da covelita facilita sua subsequente oxidação. A relação sigmoidal entre a velocidade de oxidação e a concentração do substrato pode ser avaliada pela equação de Hill (WHITAKER, 1972). Esta equação foi derivada da interação entre a hemoglobina e o oxigênio, a qual mostra um clássico comportamento sigmoidal.

Equação de Hill:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]^n}{K^{1/2} + [S]^n}$$

onde V_0 é a velocidade inicial de oxidação, n é a constante de Hill cujo valor é igual ao número de sítios ativos de uma enzima e $K^{1/2}$ representa a concentração de substrato na qual a velocidade é a metade da velocidade máxima da reação. Esta equação pode ser rearranjada para:

$$\log \frac{V_0}{V_{\max} - V_0} = n \log[S] - \log k^{1/2}$$

a qual apresentará uma relação linear com os dados experimentais caso exista um grau de cooperatividade envolvido. Como revela a Figura 13, no caso da covelita, a curva da equação logarítmica de Hill é linear, sugerindo, portanto, que existe uma cooperatividade para a oxidação deste sulfeto.

Esta cooperatividade pode ser medida pela razão entre a concentração de substrato necessária para alcançar 90% da velocidade máxima de reação ($0,9V_{\max}$), e a concentração de substrato necessária para atingir 10% da velocidade máxima ($0,1V_{\max}$) (WHITAKER, 1972). Esta razão é denominada R_s . Para cinéticas de reação com comportamentos sigmoidais, este valor de R_s pode distinguir cooperatividades positivas e negativas. Quando o valor de R_s for menor do que 81, isto indica que o sistema mostra uma cooperatividade positiva, ou seja, após o início da reação a velocidade tende a aumentar. Em contraste, quando o valor de R_s for maior do que 81, a cooperatividade será negativa, indicando que após o início da reação a velocidade desta tende a diminuir.

O valor de R_s obtido para a reação de oxidação da covelita foi de aproximadamente 5, o que sugere uma cooperatividade positiva, evidenciado pelo aumento exponencial da velocidade de oxidação do CuS. A partir da Figura 13 foram obtidos os valores da constante de Hill e do $k^{1/2}$. Os resultados mostraram um valor de 2,55 para a constante de Hill, sugerindo que podem haver dois tipos de “sítios ativos” na bactéria. O valor de $k^{1/2}$ foi igual a 104 mg de

CuS, o que indica a massa de covelita na qual a velocidade de oxidação tem metade de seu valor máximo. Por sua vez, o $V_{\max}$ para a covelita foi de $0,37 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteína}}$.

Provavelmente, este comportamento sigmoidal ocorre porque a dissolução da covelita é governada tanto pelo ataque das células bacterianas aderidas à superfície do mineral, quanto pelas células bacterianas em suspensão, fato condizente com o valor obtido para a constante de Hill ($n = 2,55$). Assim, quando as bactérias aderidas ao sulfeto mineral iniciam a oxidação do mesmo, são liberados substratos intermediários para a solução (H_2S , HS^- , etc), como mostram as equações [13] e [14], os quais passam a ser utilizados pelas células livres originando o aumento do consumo de oxigênio. Neste caso se estabelece uma cooperação entre as células bacterianas aderidas no sulfeto e as células em suspensão.

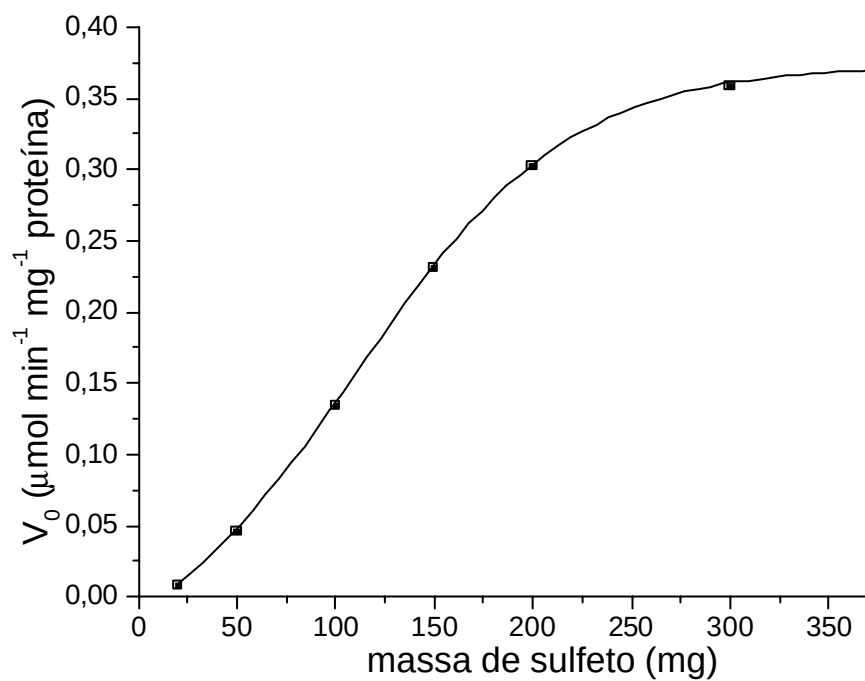


Figura 12. Curva da velocidade inicial de oxidação em função da massa de covelita.

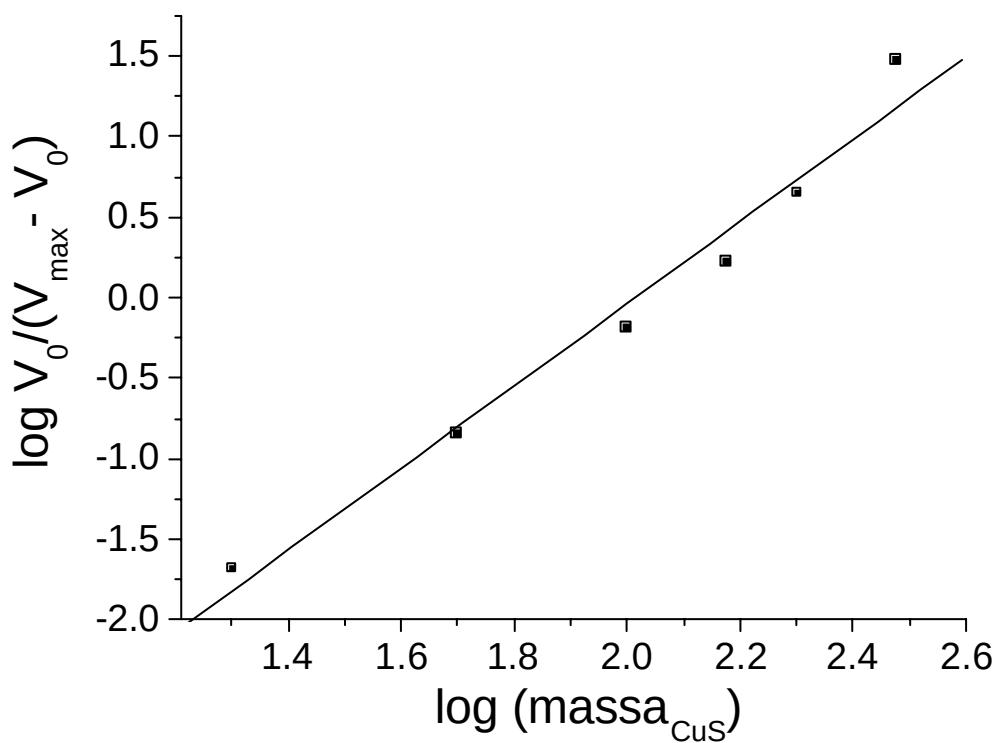


Figura 13. Curva da equação de Hill linearizada para o sulfeto de cobre covelita.

Em relação a molibdenita, como mostra a Figura 14A, a mesma também apresentou um comportamento de saturação pelo substrato. Contudo, diferentemente da covelita, o MoS_2 segue a clássica cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração testada, pois o gráfico de suas taxas de oxidação em função das massas de sulfeto é melhor ajustado por uma hipérbole retangular. Como a oxidação do MoS_2 só poderia acontecer com a aderência das células bacterianas sobre a superfície do mineral, uma vez que não há outro oxidante no meio e este sulfeto não apresenta susceptibilidade ao ataque ácido, esta adesão governa a velocidade de oxidação. Por sua vez, a velocidade de oxidação aumenta quase proporcionalmente com o aumento da concentração de substrato, até a saturação. Com base nisso, foi construído o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 14B) para a obtenção de importantes parâmetros cinéticos, como a velocidade máxima de oxidação ($V_{\max}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m), respectivamente $5,7 \times 10^{-2} \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteína}}$ e 28,0 mg de MoS_2 .

Estudos cinéticos da oxidação da pirita e do íon ferroso revelaram que ambos também seguem uma cinética de Michaelis-Menten. O valor de K_m obtido para a pirita foi de 2,5% de densidade de polpa (LIZAMA; SUZUKI, 1989), o qual corresponderia a 62,5 mg MoS_2 no presente estudo, e para o íon ferroso foi 0.37 mmol L^{-1} (NEMATİ et al., 1998). Quando compara-se os valores de K_m obtidos para os sulfetos metálicos e para o íon ferroso, evidencia-se a diferença de afinidade do *A. ferrooxidans* LR, associada a complexidade do fenômeno de oxidação dos sulfetos. Por envolver substratos sólidos, uma série de fatores e complicações estão envolvidos na oxidação dos sulfetos, como interações superficiais hidrofóbicas e eletrostáticas, processos corrosivos, etc.

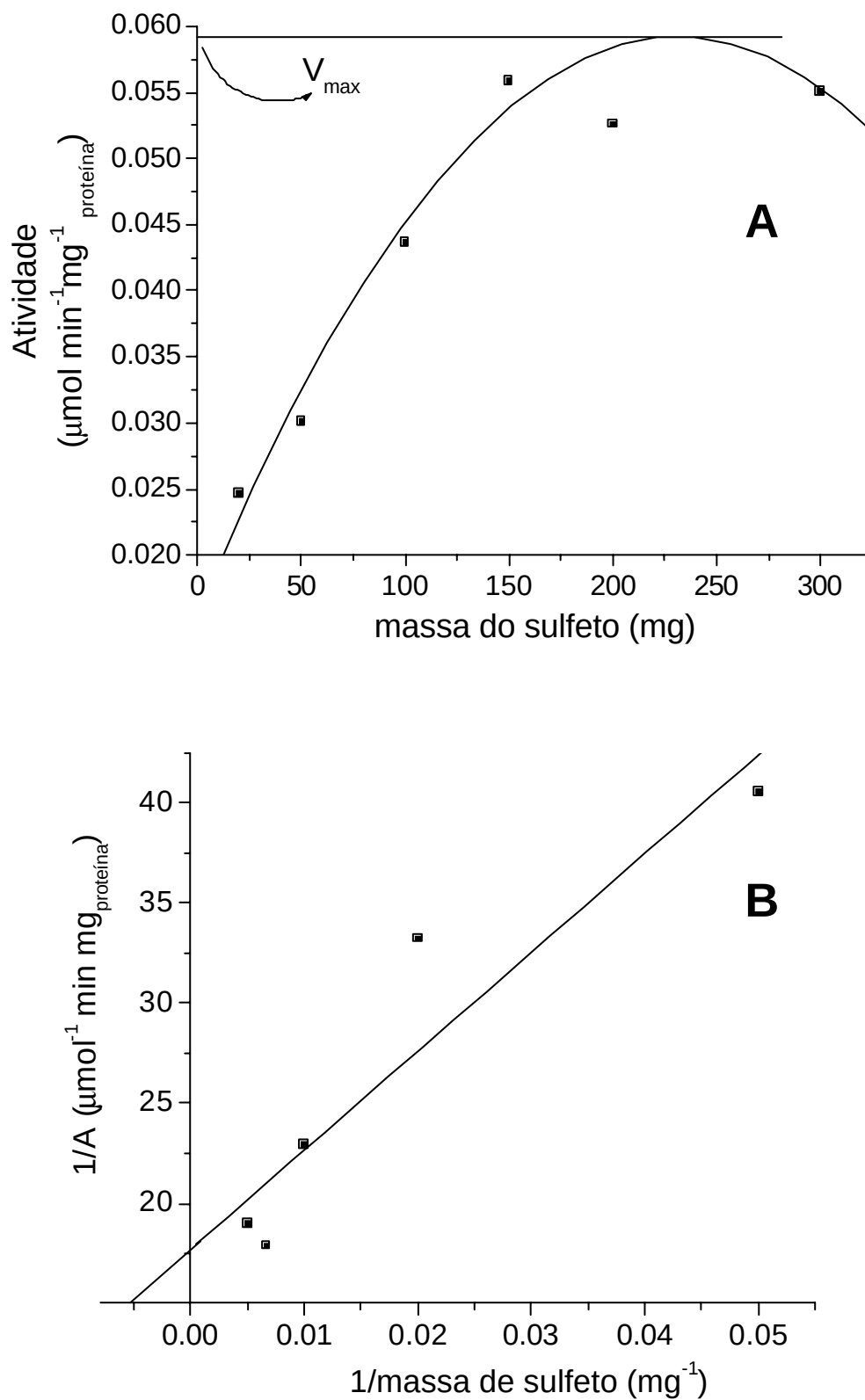


Figura 14. Curva de Michaelis-Menten (A) e o respectivo gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (B) para a molibdenita.

V. 4. Ensaios respirométricos com *A. ferrooxidans* LR deficientes em EPS

Nos ensaios realizados com a bactéria após centrifugação para retirada dos exopolímeros, se observou que tanto em covelita (Figura 15) como em molibdenita (Figura 16) a atividade de respiração não foi significativamente afetada. Como demonstrado também por Pogliani e Donati (1999), células de *A. ferrooxidans* deficientes em EPS foram capazes de oxidar a covelita, o que pode ter ocorrido devido ao ataque ácido. Outro fato que talvez também possa acontecer é a permanência dos exopolímeros (EPS) nas células bacterianas.

Entretanto, embora tenha permanecido EPS suficientes para iniciar a oxidação da molibdenita, se esperaria ao menos uma diminuição na velocidade de oxidação como demonstrado por Pogliani e Donati (1999). Estes autores mostraram que a extensão da adesão do *A. ferrooxidans* em covelita é diminuída quando os EPS são removidos. Ao mesmo tempo, a velocidade de solubilização de cobre decresce quando células deficientes em EPS são utilizadas. Um fator que pode ter influído nos resultados apresentados pelos ensaios respirométricos foi a elevada concentração de células utilizadas nos experimentos. Logo, um elevado número de células pode ter aderido à superfície do sulfeto, fazendo com que a deficiência nos EPS não tivesse significativa influência, embora, como será discutido posteriormente, acreditamos que não há a necessidade dos EPS para a biolixiviação dos sulfetos metálicos.

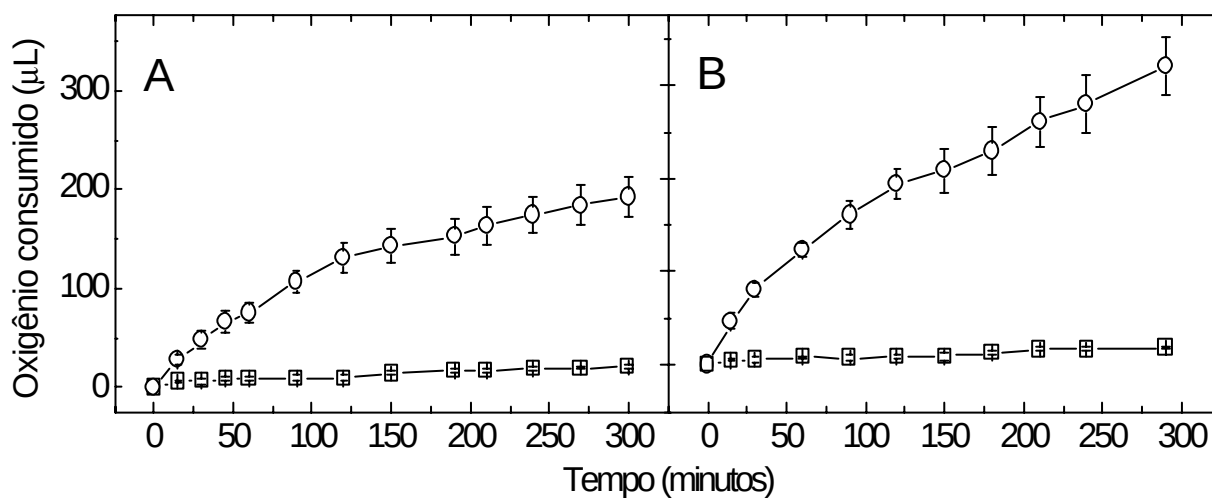


Figura 15. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR deficiente em EPS (525 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

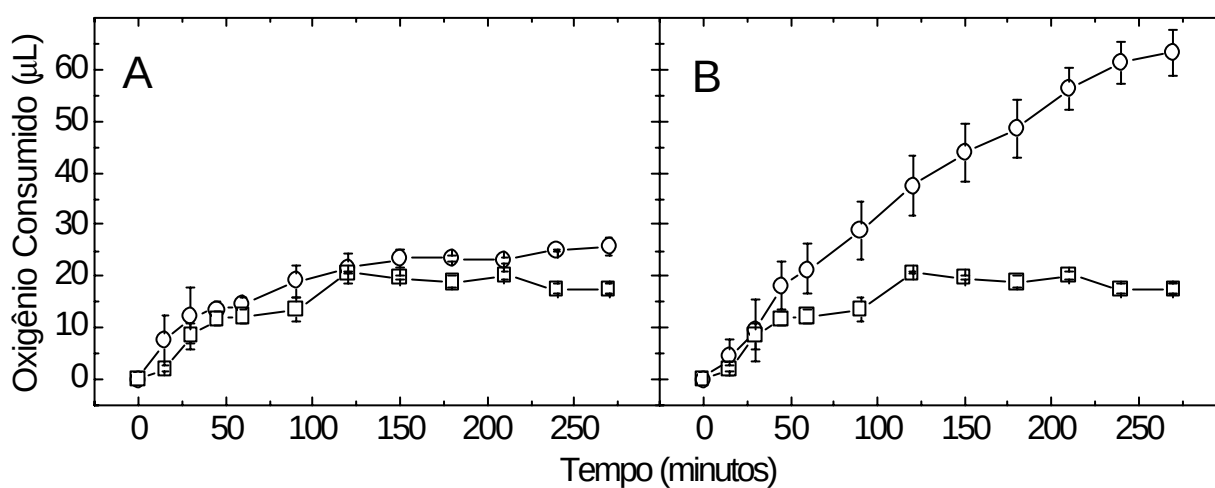


Figura 16. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR deficiente em EPS (525 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

V.5. Ensaio respirométrico com *A. ferrooxidans* LR crescido em enxofre

O acompanhamento do crescimento do *A. ferrooxidans* LR em enxofre foi feito por medidas periódicas de pH. Como demonstra a Figura 17, o crescimento do *A. ferrooxidans* LR em enxofre é evidenciado pelo decréscimo do pH, devido a oxidação do enxofre elementar com a conseqüente produção de ácido.

Como já demonstrado, o *A. ferrooxidans* LR quando crescido normalmente em meio de cultura contendo íon ferroso como fonte energética é capaz de utilizar os sulfetos molibdenita e covelita como substratos oxidáveis. Não obstante, resultados muito semelhantes a estes foram obtidos nos estudos realizados com o *A. ferrooxidans* LR crescido por três gerações em S^0 . Pelas Figuras 18 e 19 observa-se que, tal como para a bactéria crescida em ferro (II), o volume de oxigênio consumido é significativamente diferente entre CuS e MoS₂. Enquanto o consumo de O₂ atinge valores de aproximadamente 250 e 400 µL para a covelita (100 mg e 200 mg respectivamente), no caso da molibdenita estes valores não superam os 50 µL. De tal forma, os dados obtidos sugerem que não há diferenças expressivas na atividade de oxidação do *A. ferrooxidans* LR frente os sulfetos estudados, no que concerne a fonte energética de crescimento.

Se por um lado a presença de íons férricos não é condição para a oxidação da covelita, pois isto também pode ocorrer pelo ataque ácido, para os ensaios realizados com a molibdenita se esperaria resultados negativos quanto sua oxidação na presença de células crescidas em S^0 , pois de acordo com o mecanismo do tiosulfato, os íons férricos são mediadores dos primeiros passos na degradação desta classe de sulfetos metálicos (SAND et al., 1995; SCHIPPERS; SAND, 1999). Como discutido anteriormente, o *A. ferrooxidans* quando crescido em S^0 como fonte energética tem a composição dos EPS modificada, não apresentando mais íons férricos (GERHKE et al., 1998). Logo, a oxidação dos sulfetos

metálicos não pode ser atribuída a presença de íons férricos nas substâncias exopoliméricas das células bacterianas. Estas informações são fortes evidências de que, o papel dos íons férricos na mediação do processo de oxidação microbiológica dos sulfetos insolúveis em ácido, sobretudo a respeito da complexação com os EPS, é muito questionável.

Ensaio de respirometria celular da molibdenita também foram conduzidos com suplementação de íons férricos (120 mMol L^{-1}), uma vez que a adição dos mesmos pode aumentar a velocidade de oxidação do referido sulfeto (TRIBUTSCH; BENNET, 1981). Teoricamente, os íons férricos, como agentes oxidantes, são capazes de iniciar a oxidação do sulfeto metálico, e os íons ferrosos resultantes são posteriormente oxidados pela bactéria num processo cíclico, o qual resulta em uma elevação do consumo de oxigênio e da velocidade de oxidação. Lizama e Suzuki (1989) obtiveram um considerável aumento no consumo de O_2 da pirita após adição de íons férricos. Entretanto, os resultados aqui obtidos, como mostra a Figura 20, não apresentaram nenhum acréscimo seja no consumo de oxigênio seja na velocidade de oxidação. Isto sugere a não oxidação do sulfeto pelos íons férricos devido a um processo de cinética lenta e, como consequência, a não regeneração dos íons férricos pela bactéria.

Provavelmente, devido a rapidez do ensaio (cerca de 300 minutos), o tempo pode não ter sido suficiente para a oxidação do MoS_2 pelos íons férricos. De qualquer modo, os resultados obtidos contrariam a teoria na qual os íons férricos complexados aos EPS desempenham papel fundamental na dissolução dos sulfetos denominados insolúveis em ácido.

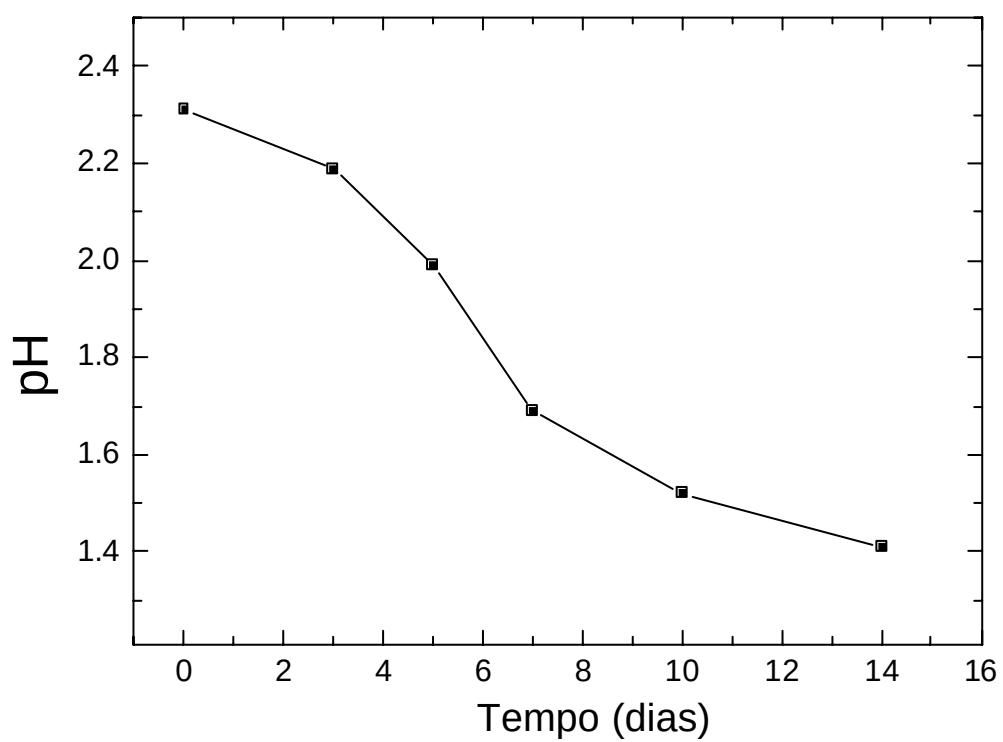


Figura 17. Variação do pH durante o crescimento do *A. ferrooxidans* LR em enxofre elementar.

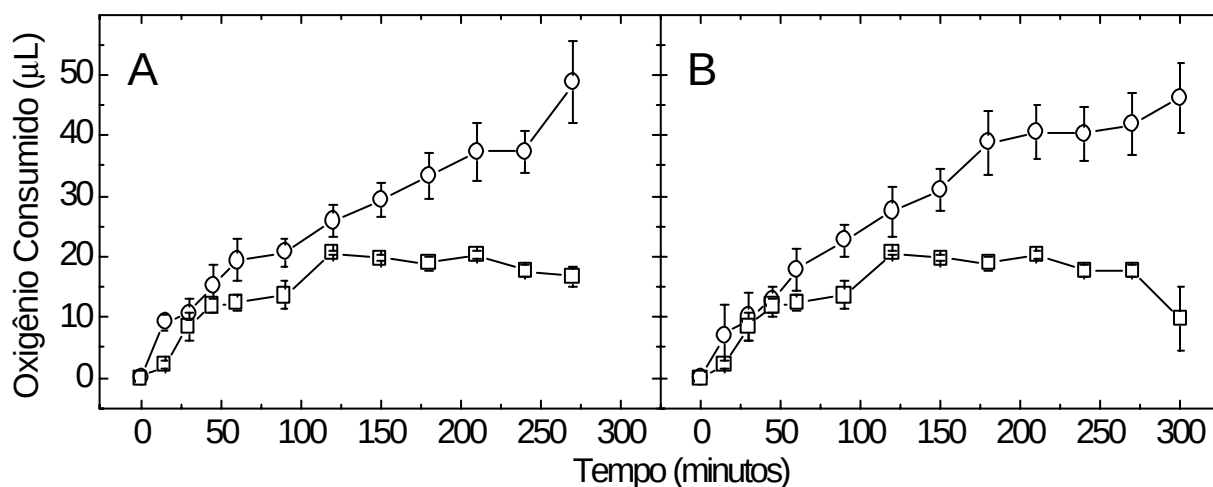


Figura 18. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de molibdenita como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%). Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

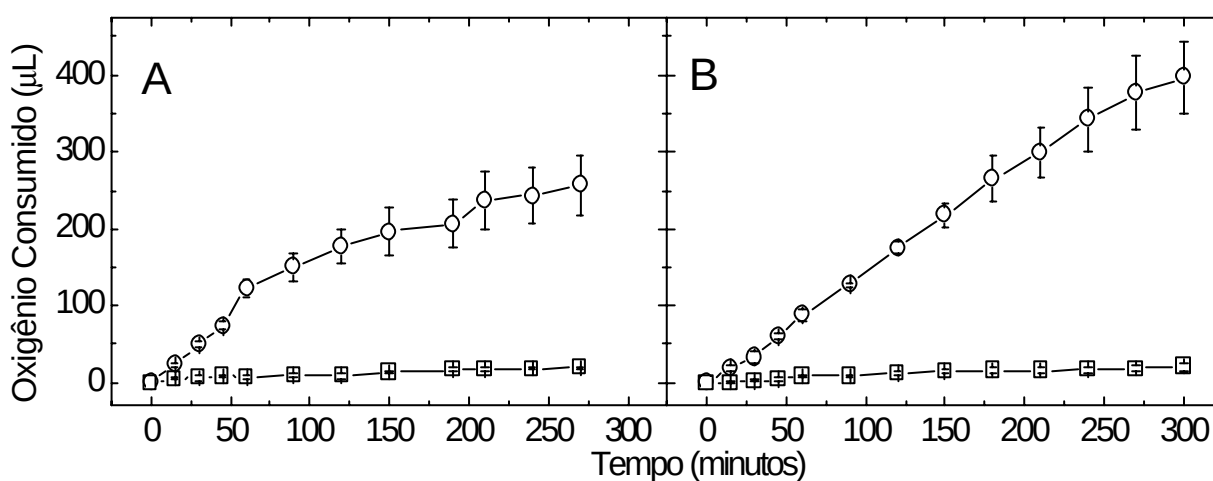


Figura 19. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 µg de proteína total) na presença de massas de 100 mg (A) e 200 mg (B) de covelita como substrato oxidável. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

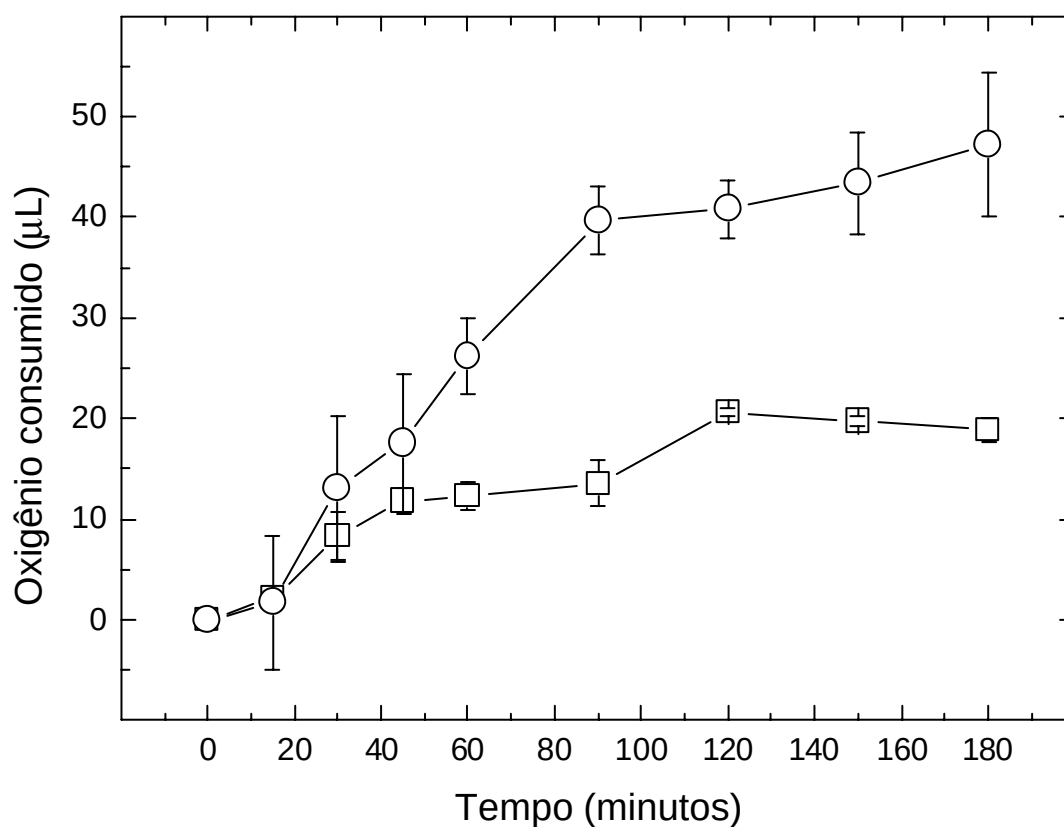


Figura 20. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 µg de proteína total) na presença de molibdenita (100 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8) de Tween 80 (0,5%) com suplementação de 120 mMol L⁻¹ de Fe³⁺. Símbolos: (○) inoculado, (□) controle químico.

No que se refere à covelita, os resultados obtidos com as células crescidas em enxofre podem ser explicados pela solubilização em ácido, como apresentam alguns autores (PORRO et al., 1997; POGLIANI; DONATI, 1999.) Contudo, a Figura 21 mostra ensaios de respirometria da covelita conduzidos na presença de diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Como pode ser observado, o oxigênio consumido, em nenhuma das concentrações de ácido testadas, superou os 40 μL , indicando uma lenta oxidação química comparada com a microbiológica. De acordo com o mecanismo dos polissulfetos, o primeiro passo na oxidação da covelita é a solubilização de Cu^{2+} e a formação de H_2S , como mostra a equação [9]. Crundwel (2001) propôs que este H_2S gerado, uma vez saturado em solução, poderia inibir a dissolução química do sulfeto. De tal maneira, o elevado consumo de oxigênio observado nos ensaios de respirometria na presença do *A. ferrooxidans* LR seria caracterizado pela oxidação deste H_2S , o que removeria a inibição e aumentaria a velocidade de dissolução do sulfeto.

Em contrapartida, ensaios respirométricos realizados com o sobrenadante de ensaios de lixiviação ácida da covelita (Figura 22) não apresentaram consumo de oxigênio pelo *A. ferrooxidans* LR. Estes ensaios indicaram que nenhum H_2S , ou outro substrato como produto intermediário, foi formado em quantidade significativa para ser oxidado pelo *A. ferrooxidans* LR. Possivelmente as reações [9] e [10], responsáveis pela formação deste substrato em meio ácido, não ocorrem no tempo dos ensaios de respirometria. Os ensaios de lixiviação ácida foram conduzidos em frascos erlenmeyers sob as mesmas condições (tempo, densidade de polpa, pH, agitação e temperatura) dos ensaios respirométricos.

Outro fator que poderia ter influenciado na oxidação da covelita em meio ácido é a formação de uma camada passivadora de enxofre sobre a superfície do sulfeto (TEIXEIRA et al., 2000). Entretanto, os difratogramas de Raios-X dos resíduos de covelita após a lixiviação ácida revelaram que mesmo após 48 horas, não houve formação de enxofre, como mostra Figura 23. Além disso, ensaios respirométricos realizados tendo o S^0 como substrato, em

proporções estequiométricas, demonstraram que a velocidade de oxidação deste é inferior à velocidade de oxidação do CuS (100 mg). Estes ensaios foram conduzidos considerando que toda a covelita (100 mg) tivesse sido transformada em enxofre.

Este conjunto de resultados sugerem que o oxigênio consumido nos ensaios respirométricos da covelita não deve estar associado a oxidação de compostos reduzidos de enxofre, seja o H_2S ou S^0 , os quais seriam gerados como intermediários da oxidação química deste sulfeto. Outrossim, o O_2 consumido nos ensaios conduzidos na presença de molibdenita também não deve estar associado a oxidação de íons ferrosos a íons férricos, os quais estariam eventualmente presos aos EPS bacterianos, como defendem diversos autores (SAND et al., 2001; CRUNDWEL, 2001, ROHWERDER et al., 2003).

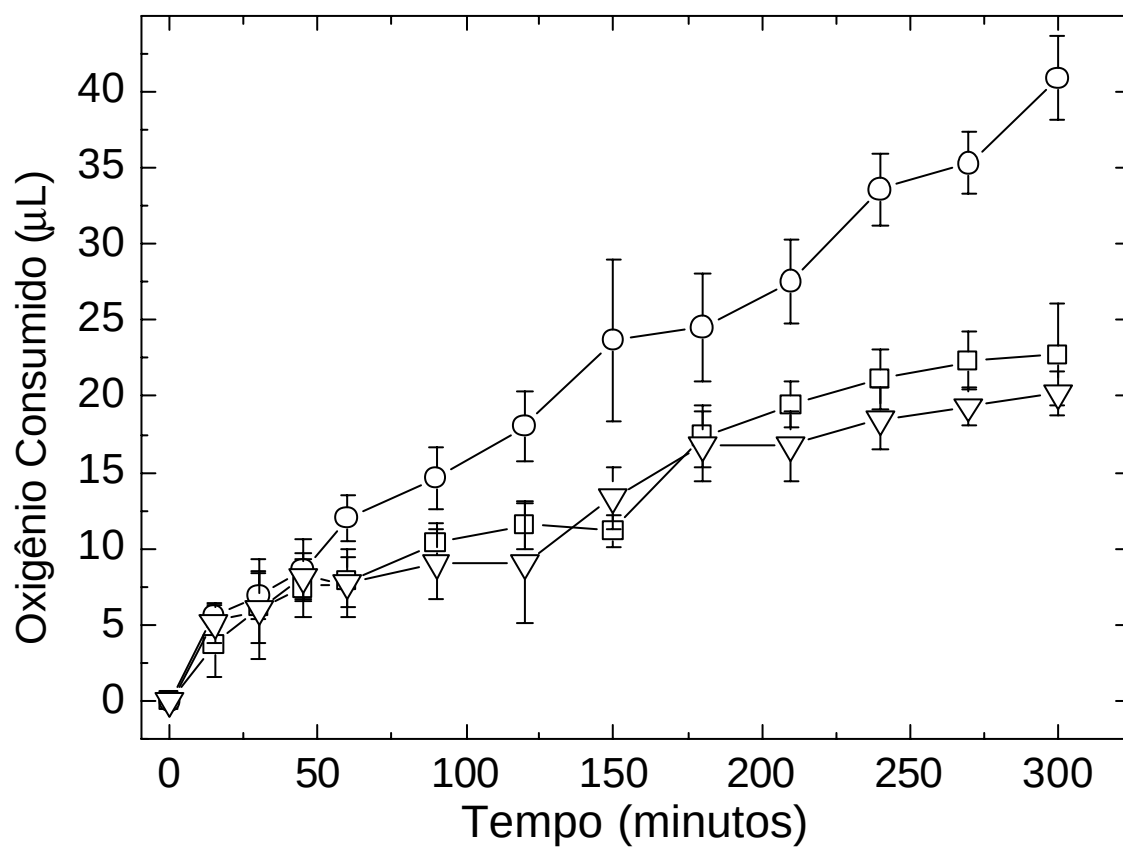


Figura 21. Oxidação da covelita (100 mg) sob diferentes concentrações de ácido sulfúrico.

Símbolos: (○) 10 Mol L⁻¹, (□) 2 Mol L⁻¹, (▽) 1 Mol L⁻¹.

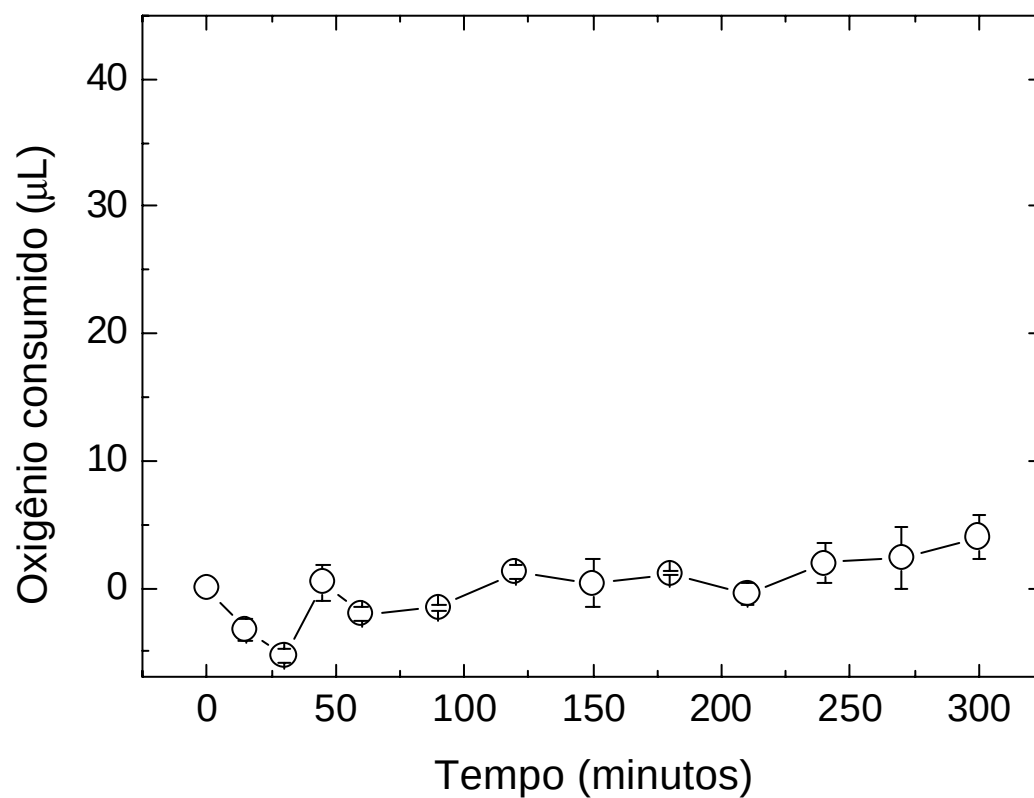


Figura 22. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μg de proteína total) na presença do sobrenadante de lixiviação ácida da covelita.

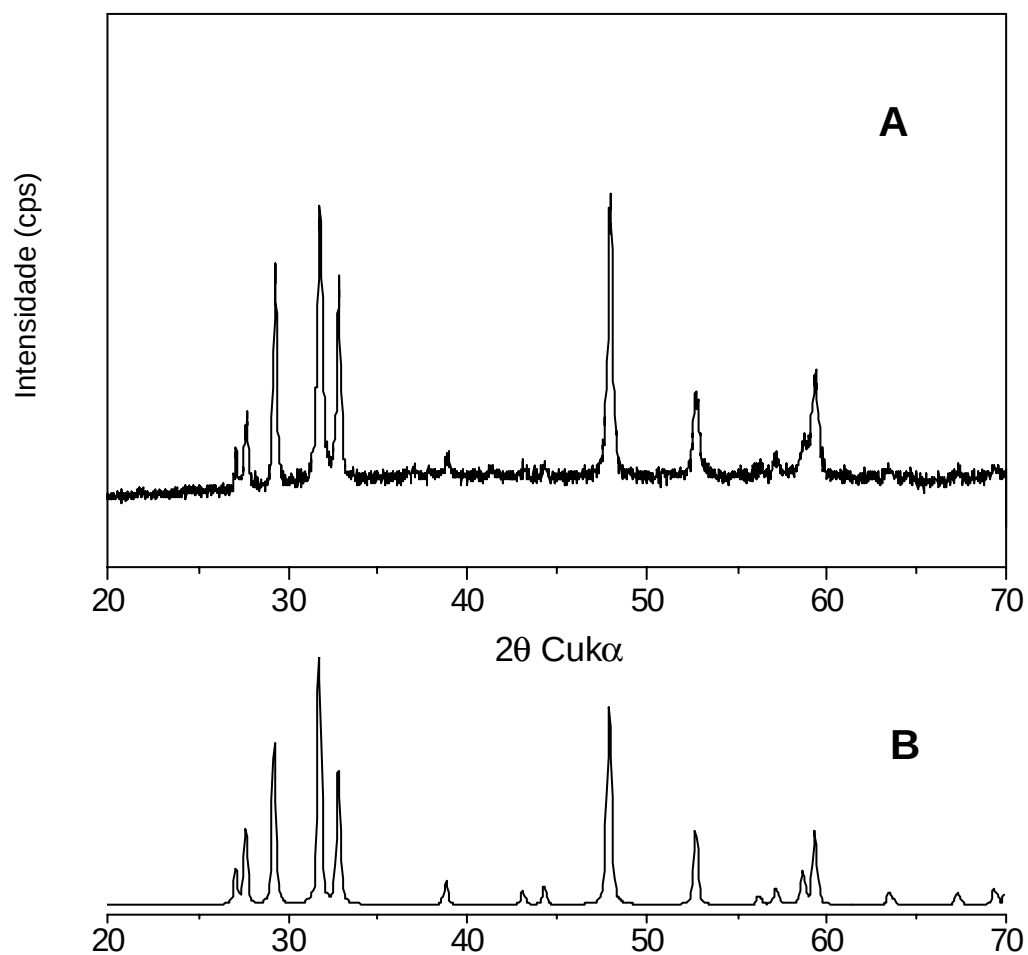


Figura 23. Difratoograma de Raios-X obtido para o resíduo de lixiviação ácida da covelita após 48 horas (A) com o respectivo padrão de covelita PDF 6-464 (B).

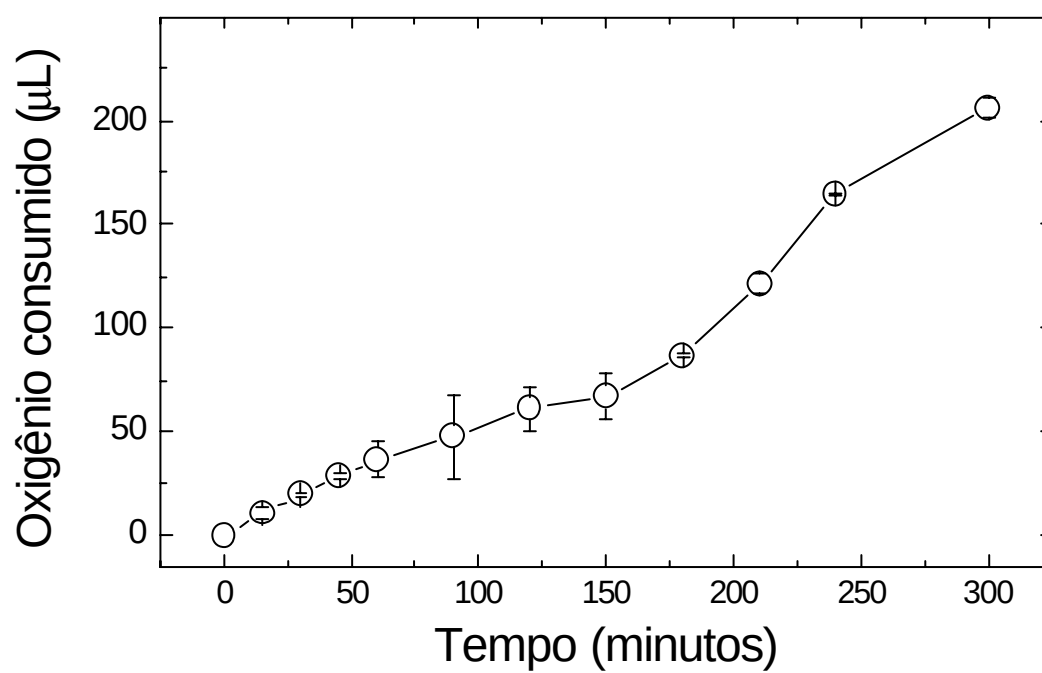


Figura 24. Atividade de respiração do *A. ferrooxidans* LR crescido em S^0 (262 μg de proteína total) na presença de enxofre (32,6 mg) como substrato oxidável em solução ácida (pH 1,8).

Para um melhor efeito de comparação, as taxas de oxidação dos sulfetos, tanto para o *A. ferrooxidans* LR crescido nas diferentes fontes energéticas como para as células deficientes em EPS, foram calculadas e são apresentadas na Tabelas 3. A Tabela 3 mostra os valores da taxa de oxidação respectivamente da covelita e molibdenita para as massas de 200 mg.

Tabela 3. Taxas de oxidação do *A. ferrooxidans* LR em covelita e molibdenita para os diferentes tratamentos realizados.

Sulfeto (mg)	Taxa de oxidação para o <i>A.f</i> LR crescido em Fe^{2+} ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)	Taxa de oxidação para o <i>A.f</i> LR crescido em S^0 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)	Taxa de oxidação para o <i>A.f</i> LR sem EPS ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)
MoS_2	0,055	0,047	0,035
CuS	0,303	0,246	0,282

Como pode ser visto, o *A. ferrooxidans* LR apresenta valores muito similares nas taxas de oxidação da covelita, tanto para as células crescidas em Fe^{2+} , em enxofre e para as células crescidas em ferro cujos EPS foram removidos. O mesmo comportamento é apresentado no caso da molibdenita. Isto sugere que o *A. ferrooxidans* LR pode lixiviar ambos sulfetos da mesma forma, independentemente da fonte energética e da presença ou não de ferro nos exopolímeros.

Rojas-Chapana, Giersig, e Tributsch (1996) propuseram que o processo de oxidação ocorre fora da célula bacteriana e, provavelmente pela interação de algum lixivante químico excretado pela bactéria. Rojas-Chapana e Tributsch (2001) argumentaram que grupos tióis estão envolvidos na lixiviação dos sulfetos pelo *A. ferrooxidans*. De acordo com estes autores a bactéria pode ocasionar a dissolução dos sulfetos minerais, tanto os denominados solúveis quanto os denominados insolúveis em ácido, por outros mecanismos, como o ataque de

grupos tióis, que não somente a oxidação eletroquímica mediada por íons férricos e o ataque por prótons.

Alguns estudos realizados com cisteína demonstraram um aumento na velocidade de biolixiviação de camadas de pirita sintética na presença deste aminoácido (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2001; TRIBUTSCH, 2001). Em concentrações de cisteína de 10^{-4} e 10^{-5} Mol L⁻¹, a biolixiviação da pirita se iniciou de forma praticamente instantânea, enquanto na ausência do aminoácido a oxidação mostrou uma fase lag de cerca de uma semana. Ao mesmo tempo, após cerca de 13 dias a camada de pirita foi completamente oxidada na presença de cisteína, já em sua ausência esta alcançou apenas 80% após 17 dias. Neste sentido, novos estudos devem ser conduzidos sob o ponto de vista destas e de outras substâncias as quais podem ser responsáveis pela oxidação dos sulfetos metálicos.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciam uma clara diferença no comportamento do *A. ferrooxidans* LR em relação a cada um dos sulfetos metálicos, sendo a oxidação do MoS_2 , possível apenas com adição de um agente surfactante, devido sua hidrofobicidade. Apesar da molibdenita e da covelita serem oxidadas pela bactéria, a oxidação da última é mais eficiente. Isto decorre das diferentes estruturas eletrônicas de ambos sulfetos, as quais facilitam a solubilização do CuS em ácido, fato que não ocorre com a molibdenita.

Em relação aos estudos da cinética de oxidação, estes revelaram que ambos os sulfetos seguem uma cinética de saturação de substrato. Contudo, apenas a molibdenita segue uma cinética de Michaelis-Menten, possivelmente por este processo ser governado apenas pela aderência das células bacterianas à superfície do sulfeto. Por sua vez, a oxidação da covelita pode se dar tanto pelas células imobilizados ao mineral, quanto pelas células em suspensão.

Tendo em vista os demais resultados, parece evidente que o papel das substâncias exopoliméricas e dos íons férricos eventualmente neles complexados, não é tão primordial na oxidação dos sulfetos quanto descrito na literatura (SAND et al., 2001; CRUNDWEL, 2001, ROHWERDER et al., 2003). Parece claro que o mecanismo de oxidação dos sulfetos metálicos pelo *A. ferrooxidans* LR independe da fonte energética de crescimento, bem como da presença de íons férricos. Entende-se também que outros fatores, como a influência da cisteína, não estão completamente elucidados, e podem estar determinando a interação entre a bactéria e os sulfetos metálicos.

VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como uma complementação dos ensaios de respirometria celular, ensaios eletroquímicos, que incluem medidas de impedância e ruído eletroquímico, podem fornecer importantes informações a respeito da oxidação dos sulfetos covelita e molibdenita. Estas técnicas podem avaliar a cinética do processo e a estrutura de interface eletrodo/eletrolito, por isso tem sido empregada no estudo de corrosão, semicondutores, eletrodeposição, dentre outros. A grande vantagem destas técnicas é poder associar um circuito elétrico à interface eletrodo/solução, possibilitando obter os parâmetros do circuito por simulação e relacioná-los às características físico-químicas desta interface. Isto permite distinguir a resposta da ação bacteriana sobre os sulfetos metálicos quando comparado à ensaios na ausência da bactéria, bem como estudar o comportamento do *A. ferrooxidans* frente a cada sulfeto e as diferentes fontes energéticas de crescimento.

A microscopia eletrônica também é uma importante técnica que pode complementar os estudos de respirometria na investigação da interação bactéria-sulfeto, podendo também ser utilizada para uma comparação da adesão bacteriana entre os sulfetos, sob os diferentes aspectos no que concerne a fonte energética de crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Embora esta espécie seja a mais estudada no processo de biolixiviação, a utilização de outras espécies na oxidação dos sulfetos metálicos também é um modo de se aprofundar nestas buscas para uma melhor compreensão do processo. Ensaios com *Leptospirillum ferrooxidans*, um microorganismo que também é capaz de oxidar íons ferroso, mas por outro lado não utiliza compostos reduzidos de enxofre, pode ser uma das alternativas para um aprofundamento das interações entre bactéria e sulfetos minerais.

VIII. REFERÊNCIAS

- BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS_2) e Bornita (Cu_5FeS_4)**. 2003. 99 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- BEVILAQUA, D.; DIÉZ-PÉREZ, I.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JR., 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.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JR., O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochem.**, v. 38, p. 587-592, 2002.
- CRUNDWELL, F. K. How do bacteria interact with minerals. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 14., 2001, Ouro Preto. **Biohydrometallurgy: fundamental, technology and sustainable development**. Amsterdam: Elsevier, 2001. v. 1, p. 149-157.
- CURUTCHET, G.; DONATI, E. Iron-oxidizing and leaching activities of sulphur-grown *Thiobacillus ferrooxidans* cells on other substrates: effect of culture pH. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 90, p. 57-61, 2000.
- DONATI, E.; CURUTCHET, G.; POGLIANI, C.; TEDESCO, P. Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Process Biochem.**, v. 31, p. 129-134, 1996.
- DONATI, E.; PORRO, S.; TEDESCO, P. H. Direct and indirect mechanisms in the bacterial leaching of covellite. **Biotechnol. Lett.**, v. 10, p. 889-894, 1988.
- EHRlich, H. L. Past, present and future of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 127-134, 2001.
- GARCIA JR., O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 1-6, 1991.
- GARCIA JR., O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Spharelite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 578-554, 1995.
- GARCIA JR., O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 508-514, 1995.
- GEHRKE, T.; TELEGDI, J.; THIERRY, D.; SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2743-2747, 1998.
- HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1994. p. 436.

HUTCHINS, S. R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Microorganisms in reclamation of metals. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 311-336, 1986.

JOHNSON, D. B.; BACELAR-NICOLAU, P.; BRUHN, D. F.; ROBERTO, F. F. Iron-oxidizing heterotrophic acidophiles: ubiquitous novel bacteria in leaching environments. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 11., 1995, Viña del Mar. **Biohydrometallurgical processing**. Santiago: University of Chile, 1995. v. 1, p. 47-56.

KARAVAIKO, G. I.; GROUDEV, S. N. Biogeotechnology of metals, its history, tasks and trends of development. In: _____. **Biogeotechnology of metals**. Moscow: Centre of International Projects, 1985. p. 6-24.

KINZLER, K.; GEHRKE, T.; TELEGDI, J.; SAND, W. Bioleaching – a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 83-88, 2003.

KLEIN, C.; HURLBT, C. S. **Manual of mineralogy**. 21st ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 681 p.

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

LIZAMA, H. M.; SUZUKI, I. Rate equations and kinetic parameters of the reactions involved pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 2918-2923, 1989.

LUNDGREN, D. G.; SILVER, M. Ore leaching by bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 263-283, 1980.

LYALIKOVA, N. N.; LEBEDEVA, E. V. Bacterial oxidation of molybdenum in ore deposits. **Geomicrobiol. J.**, v. 3, p. 307-318, 1984.

MONTEIRO, V. F.; GARCIA JR., O.; TUOVINEN, O. H. Oxidative dissolution of covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 13., 1999, Madrid. **Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century**. Amsterdam: Elsevier, 1999. v. 1, p. 283-290.

NASERNEJAD, B.; KAGHAZCHI, T.; EDRISI, M.; SOHRABI, M. Bioleaching of molybdenum from low-grade copper ore. **Process Biochem.**, v. 35, p. 437-440, 1999.

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

NATARAJAN, K. A.; DAS, A. Surface chemical studies on “*Acidithiobacillus ferrooxidans*” group of bacteria with reference to mineral flocculation. **Inte. J. Miner. Process.**, v. 72, p. 189-198, 2003.

NEMATİ, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. **Biochem. Eng. J.**, v. 1, p. 171-190, 1998.

OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 249-257, 2003.

PISTACCIO, L.; CURUTCHET, G.; DONATI, E.; TEDESCO, P. Analysis of molybdenite bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans* in the absence of iron (II). **Biotechnol. Lett.**, v. 16, p. 189-194, 1994.

PIVOVAROVA, T. A.; DSHANSUGUROVA, R. S.; KARAVAIKO, G. I. Role of exometabolites in the molybdenum resistance. **Microbiologiya**, v. 60, p. 609-615, 1991.

PIVOVAROVA, T. A.; GOLOVACHEVA, R. S. Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. In: KARAVAIKO, G. I.; GROUDEV, S. N. (Ed.). **Biogeotechnology of metals**. Moscow: Centre of International Projects, 1985. p. 27-55.

POGLIANI, C.; CURUTCHET, G.; DONATI, E.; TEDESCO, P. H. A need for direct contact with particles surfaces in the bacterial oxidation of covellite in the absence of a chemical lixiviant. **Biotechnol. Lett.**, v. 12, p. 515-518, 1990.

POGLIANI, C.; DONATI, E. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 88-92, 1999.

PORRO, A.; RAMÍREZ, S.; RECHE, C.; CURUTCHET, G.; ALONSO-ROMANOWSKI, S.; DONATI, E. Bacterial attachment: its role in bioleaching processes. **Process Biochem.**, v. 32, p. 573-578, 1997.

PRONK, J. T.; JOHNSON, D. B. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. **Geomicrobiol. J.**, v. 10, p. 153-171, 1992.

RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 65-91, 2002.

RAWLINGS, D. E. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 51, p. 267-275, 1981.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T.; KINZLER, K.; SAND, W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 239-248, 2003.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; GIERSIG, M.; TRIBUTSCH, H. The path of sulfur during the bio-oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Fuel**, v. 75, p. 923-930, 1996.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 291-300, 2001.

ROMANO, P.; BLÁZQUEZ, M. L.; ALGUACIL, F. J.; MUÑOZ, J. A.; BALLESTER, A.; GONZÁLEZ, F. Comparative study on the selective chalcopyrite bioleaching of a molybdenite concentrate with mesophilic and thermophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 196, p. 71-75, 2001.

ROMANO, P.; BLÁZQUEZ, M. L.; BALLESTER, A.; MUÑOZ, J. A.; GONZÁLEZ, ALGUACIL, F. J. F. Selective copper-iron dissolution from a molybdenite concentrate using bacterial leaching. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 76, p. 723-728, 2001.

SAKAKUCHI, H.; TORMA, A. E.; SILVER, M. Microbiological oxidation of synthetic chalcocite and covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 31, p. 7-10, 1976.

SAND, W.; GERKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 961-966, 1995.

SAND, W.; GERKE, T.; JOSZA, P. G.; SCHIPPERS, A. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 159-175, 2001.

SCHIPPERS, A.; SAND, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 319-321, 1999.

SCHIPPERS, A.; JOZSA, P.; SAND, W. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3424-3431, 1996.

SILVERMAN, M. P. Mechanism of bacterial pyrite oxidation. **J. Bacteriol.**, v. 94, p. 1046-1051, 1967.

SILVERMAN, M. P.; EHRLICH, H. L. Microbial formation and degradation of metals. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 6, p. 153-206, 1964.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* 1: An improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields. **J. Bacteriol.**, v. 77, p. 642-647, 1959.

SMITH, J. R.; LUTHY, G. R.; MIDDLETON, A. C. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **J. Wat. Pollut. Control. Fed.**, v. 60, p. 518-530, 1988.

STEUDEL, R. Mechanisms for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 35, p. 1417-1423, 1996.

TEIXEIRA, C. M.; RAMIRES, I.; GARCIA JR., O.; GUASTALDI, A. C. Aplicação de técnicas eletroquímicas no estudo da dissolução oxidativa da covelita (CuS) por *Thiobacillus ferrooxidans*. **Quim. Nova**, v. 25, p. 20-26, 2002.

TRIBUTSCH, H. Direct versus indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 177-185, 2001.

TRIBUTSCH, H.; BENNETT, J. C. Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching. I. Oxidation of metal sulphides with large energy gaps. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 31, p. 565-577, 1981.

TRIBUTSCH, H.; ROJAS-CHAPANA, J. A. Metal sulfide semiconductor electrochemical mechanisms induced by bacterial activity. **Electrochim. Acta**, v. 45, p. 4705-4716, 2000.

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

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUSHUJA, H. M. Nitrogen requirements of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 954-958, 1979.

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

VANDEVIRE, P.; KIRCHMAN, D. L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. **Appl Environ Microbiol.**, v. 59, p. 3280-3286, 1993.

YAMANAKA, T.; FUKUMORI, Y. Molecular aspects of the electron transfer system which participates in the oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 401-413, 1995.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. Marcel Dekker: New York, 1972. 636 p.

WYPYCH, F. Dissulfeto de molibdênio, um material multifuncional e surpreendente. **Quim. Nova**, v. 25, p. 83-88, 2000.