

UNESP 
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA

“OXIDAÇÃO DA CALCOPIRITA (CuFeS_2) POR *Acidithiobacillus ferrooxidans* EM PRESENÇA DE CISTEÍNA E DE *Acidithiobacillus thiooxidans*.”

Aluna: Pricila Lidiane Blauth
Orientador: Dr. Oswaldo Garcia Jr.
Co-orientadora: Dra. Denise Bevilaqua

Araraquara, SP
2008

PRICILA LIDIANE BLAUTH

“Oxidação da calcopirita (CuFeS_2) por *Acidithiobacillus ferrooxidans* em presença de cisteína e de *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Tese apresentada ao instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Oswaldo Garcia Jr.

Co -orientadora: Dra. Denise Bevilaqua

O homem é um animal com instintos primários de sobrevivência. Por isso, seu engenho desenvolveu-se primeiro e a alma depois, e o progresso da ciência está bem mais adiantado que seu comportamento moral e ético.

-Charles Chaplin-

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de errar.

-William Shakespeare-

...Todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a.

-William Shakespeare-

Dedico este trabalho a Deus pela
construção incessante do bem maior e
a minha família pela confiança, apoio
e motivação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr. pela orientação e pela oportunidade de iniciar esta importante etapa de minha vida.

A Dra. Denise Bevilaqua, também pela orientação, amizade e paciência.

A FACTE pela bolsa concedida.

Aos técnicos do laboratório, Waldenir A. N de Menezes e Gustavo Pirola, pela amizade, descontração e auxílio experimentais.

A Fabiana Arena e Daniela Horta pela colaboração e convivência.

A Nury Alexandra, pela amizade, companheirismo, descontração, e ajuda e dicas laboratoriais.

A Ana Paula Felício, pelo carinho, experiência compartilhada, amizade, conversas, conselhos e cálculos.

A Heloísa Acciari, pelo exemplo de conduta moral, conselhos, amizade, companheirismo, compreensão, e esclarecimentos científicos e espirituais.

A minha mãe e ao meu pai, e minha vó, pela constante dedicação, amor, apoio, motivação e confiança depositada.

Ao meu noivo por ter sido precursor desse processo de aprendizado e pela motivação carinho, paciência, conselhos e compreensão.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pela amizade e descontração.

Ao Chico pela disposição para análises de TEM.

Ao Ricardo pelas análises de raios-X.

Ao Seu Sebastião pelas análises de MEV.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Biolixiviação.....	03
2.2 Bactérias do processo.....	05
2.2.1 <i>A. ferrooxidans</i>	05
2.2.2 Mecanismo de oxidação do íon ferroso.....	06
2.2.3 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	08
2.3 Cobre.....	09
2.4 Calcopirita (CuFeS ₂).....	11
2.5 Mecanismos de interação bactéria/substrato.....	13
2.5.1 Mecanismo Direto.....	15
2.5.2 Mecanismo Indireto.....	16
2.6 Cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S).....	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específico.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Linhagem bacteriana.....	22
4.2 Amostra mineral.....	22
4.3 Meio de cultura líquido (T&K).....	22
4.3.1 Meio de Cultura 9K.....	23
4.4 Preparo da suspensão celular.....	24
4.4.1 Dosagem de proteínas totais.....	24
4.5 Ensaio respirométrico.....	26
4.6 Ensaio de oxidação do íon ferroso.....	27
4.7 Ensaio de biolixiviação.....	28
4.8 Resíduos sólidos da biolixiviação.....	31
4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
4.8.3 Difração de Raios – X.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	63
8. ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de lixiviação bacteriana em uma pilha de minério	04
Figura 2: Mecanismos de interação bactéria/substrato propostos para a ação do <i>A. ferrooxidans</i> sobre os sulfetos minerais	16
Figura 3: Esquema dos mecanismos tiosulfato e polissulfeto de lixiviação bacteriana dos sulfetos minerais	18
Figura 4: Fórmula estrutural da molécula de cisteína	19
Figura 5: Esquema da Interação do sulfeto mineral pirita com o aminoácido cisteína	20
Figura 6: Atividade respiratória do <i>A. ferrooxidans</i> – LR (150 µg de proteína total), em sulfato ferroso na presença de diversas concentrações de cisteína (mol L ⁻¹)	34
Figura 7: Atividade respiratória do <i>A. ferrooxidans</i> – LR (150 µg de proteína total), em 0.1g de calcopirita como substrato oxidável em tampão glicina pH 2.2 na presença de diversas concentrações de cisteína	36
Figura 8: Curva de oxidação do íon ferroso pelo <i>A. ferrooxidans</i> -LR na presença de diferentes concentrações de cisteína	39
Figura 9: Variação do potencial de oxido-redução e do pH nos tratamentos inoculados e controles abióticos no experimento de biolixiviação da calcopirita por <i>A.ferrooxidans</i> -LR (não adaptada) em diferentes concentrações de cisteína	42
Figura 10: Variação do potencial de oxido-redução e do pH nos tratamentos inoculados e controles abióticos no experimento de biolixiviação da calcopirita por <i>A. ferrooxidans</i> -LR (adaptada) em diferentes concentrações de cisteína	43
Figura 11: Variação do potencial de óxido-redução e do pH nos tratamentos inoculados e controles abióticos no experimento de biolixiviação da calcopirita por <i>A. ferrooxidans</i> -LR (não adaptada) com <i>A. thiooxidans</i> em diferentes concentrações de cisteína	45
Figura 12: Variação do potencial de oxido-redução e do pH nos tratamentos inoculados e controles abióticos no experimento de biolixiviação da calcopirita por <i>A. ferrooxidans</i> -LR (adaptada) com <i>A. thiooxidans</i> em diferentes concentrações de cisteína	46
Figura 13: Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita com células de <i>A. ferrooxidans</i> adaptadas e não adaptada em diferentes concentrações de cisteína	50
Figura 14: Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita com células mistas de <i>A. ferrooxidans</i> (adaptadas), e <i>A. thiooxidans</i> não adaptada	51
Figura 15: Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita com células de <i>A. thiooxidans</i> em diferentes concentrações de cisteína	52

- Figura 16:** Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos do ensaio de biolixiviação com *A. ferrooxidans*-LR (adaptada) e não adaptada após 64 dias56
- Figura 17:** Fotomicrografia eletrônica dos resíduos do controle abiótico e do inoculado *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptado após 64 dias de lixiviação da calcopirita57
- Figura 18:** EDX dos precipitados aciculares do resíduo de biolixiviação de 64 dias na presença de *A. ferrooxidans*-LR adaptada e sem cisteína58
- Figura 19:** Difratoograma dos resíduos de calcopirita no controle abiótico e na presença de *A. ferrooxidans* – LR adaptado60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fases do procedimento experimental na adaptação do <i>A. ferrooxidans</i> -LR ao crescimento no sulfeto de cobre calcopirita.....	28
Tabela 2 - Valores referentes às velocidades iniciais da respirometria do íon ferroso.....	35
Tabela 3 - Valores referentes às velocidades iniciais da respirometria da calcopirita.....	37
Tabela 4 - Concentração do íon férrico do ensaio de biolixiviação da calcopirita	47
Tabela 5 - Rendimento final de extração do cobre dos ensaios de biolixiviação	54

RESUMO

O processo de biolixiviação é a utilização de bactérias, para a solubilização dos metais presentes em sulfetos minerais. As espécies mais estudadas são o *Acidithiobacillus thiooxidans* e o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, embora outras espécies também participem do processo. Esse processo é aplicado há muito tempo, mas somente nos anos 1950 a participação de microorganismos foi descoberta. A biolixiviação de cobre é um exemplo de aplicação industrial, embora outros metais como ouro, urânio e o níquel, venham sendo obtidos por esse método. A calcopirita (CuFeS_2) é o mais abundante mineral de cobre e também o mais refratário ao ataque químico ou bacteriano. Dessa forma, existe um grande interesse no desenvolvimento de alternativas para otimizar a solubilização desse sulfeto. Neste trabalho investigou-se a avaliação do efeito do aminoácido cisteína na biolixiviação de uma amostra de calcopirita utilizando linhagens de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. Inicialmente foram realizados testes de respirometria celular com *A. ferrooxidans* e sulfato ferroso como substrato em diferentes concentrações de cisteína (0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} mol L^{-1}) para avaliar o efeito inibitório da cisteína na atividade da bactéria. Somente 10^{-1} mol L^{-1} provocou uma inibição significativa na oxidação do íon ferroso pela bactéria. A seguir foram realizados ensaios utilizando a calcopirita como substrato, na presença das mesmas concentrações de cisteína. A cisteína em 10^{-1} mmol L^{-1} também determinou inibição significativa na oxidação do mineral. As demais concentrações provocaram um aumento na velocidade inicial de oxidação do sulfeto em comparação com o controle na ausência de cisteína. Em ensaios de crescimento da bactéria na presença de meio contendo o íon ferroso, foram obtidos resultados semelhantes aos anteriores, destacando-se que nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-5} mol L^{-1} de cisteína houve um pequeno aumento da taxa de crescimento da bactéria. Dessa forma, essas duas concentrações foram selecionadas para a realização dos ensaios de biolixiviação da calcopirita em frascos agitados. Previamente aos ensaios de biolixiviação, foi realizada uma adaptação do *A. ferrooxidans* para crescer na presença de calcopirita através de progressiva substituição do íon ferroso por calcopirita no meio de cultura em repiques sucessivos, até a eliminação total do Fe^{2+} . As células adaptadas foram utilizadas nos experimentos de biolixiviação em frascos em várias condições, incluindo a adição ou não de cultivos de *A. ferrooxidans* na condição adaptada e sem adaptação, duas diferentes concentrações de cisteína, presença ou não de cultivos de *A. thiooxidans*, e a mistura dessas duas espécies bacterianas. Devido à natureza refratária da calcopirita, os resultados de solubilização do cobre foram relativamente baixos, sendo que a presença da cisteína ou do *A. thiooxidans* praticamente não alteraram os rendimentos finais de extração. De qualquer forma, os cultivos com a cultura pré-adaptada mostraram extrações de cerca de 30% enquanto que as demais condições inoculadas mostraram valores inferiores a 25%. Os controles e as culturas somente com *A. thiooxidans*-FG01 determinaram os menores valores de extração de cobre (~15%). A análise da fase sólida revelou a presença de novos picos de bruxita e hidroxiapatita, ambos decorrentes, provavelmente, da presença significativa de cálcio na amostra original.

ABSTRACT

Bioleaching is the solubilization and recovery of metals from sulfides minerals promoted by bacterial metabolism. Although *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* are the most studied bacteria, other species contribute to that process. Despite the bioleaching has been utilized for long time, only in the 1950's the active participation of bacteria was demonstrated. Copper bioleaching is the classical industrial application example, although gold, uranium and nickel have been produced by that technique. Chalcopyrite (CuFeS_2) is the most abundant copper mineral the most refractory as such. Thus, there is an enormous interest in developing alternatives to optimize this sulfide solubilization. The effect of cysteine on the chalcopyrite dissolution in the presence of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* was evaluated in this study. Respirometric assays were used initially to test the effects of cysteine in the ferrous or chalcopyrite oxidation by *A. ferrooxidans* at pH 1.8 in the following amino acid concentrations: 0, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} mol L⁻¹. In both cases, only 10^{-1} mol L⁻¹ of cysteine was inhibitory to the bacterial oxidation and in the other concentrations a slight increase in the initial oxidation rate was observed, comparing to the control in absence of this amino acid. In growth experiments utilizing ferrous ion as substrate and in the same concentrations of cysteine, 10^{-3} and 10^{-5} mol L⁻¹ established an increase in the rate of bacterial growth. These cysteine concentrations were selected to run bioleaching tests through shaking flasks technique. Previously, *A. ferrooxidans* was acclimated to growth in medium containing only chalcopyrite as substrate, by progressive ferrous iron substitution as energy source. Acclimated *A. ferrooxidans* cells were utilized in shaking flasks experiments in several conditions such as, inoculation or not, presence or absence of cysteine, pure culture of *A. thiooxidans*, mixed culture of both species, and so on. As expected, the general results of copper solubilization were relatively low and the presence of cysteine or *A. thiooxidans* did not increase considerably the copper extraction by *A. ferrooxidans* cells. However, acclimated cells of this species showed the highest copper extraction (~30%) while the other conditions was around 20-25%. In the *A. thiooxidans* pure cultures and abiotic controls the copper extraction was approximately 15%.

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, acreditou-se que a lixiviação de metais era um processo exclusivamente químico, que ocorria mediante a ação conjunta de água e oxigênio atmosférico. O descobrimento de bactérias acidófilas oxidantes de íon ferroso foi primordial na definição de lixiviação de minerais como um processo catalisado biologicamente. (ROSSI, 1990).

A biolixiviação, ou lixiviação bacteriana, pode ser definida como um processo de dissolução de sulfetos resultante da ação de um grupo de bactérias. Tais bactérias apresentam diversas características fisiológicas e morfológicas particulares relacionadas aos fatores intrínsecos e extrínsecos em que se desenvolveram e às condições em que foram submetidas.

Uma das bactérias mais estudadas nesse processo é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por ser uma espécie que pode obter energia por duas vias a fim de suprir suas necessidades energéticas de crescimento: na principal, utiliza como substrato os íons ferrosos, e como outra opção, podem utilizar espécies inorgânicas e reduzidas de enxofre (incluindo sulfetos metálicos). Através do metabolismo oxidativo dos íons de ferro e enxofre, ocorre a produção de substâncias extracelulares que ajudam na dissolução dos sulfetos minerais solubilizando, dessa maneira, o metal contido na estrutura cristalina dos mesmos. Esse processo biológico de solubilização de sulfetos tem sido amplamente aplicado na recuperação de metais como cobre, ouro, urânio, zinco e níquel (WATLING, 2006).

Os minerais metálicos fundamentaram o desenvolvimento industrial do século XIX que se prolongou pelo século seguinte. De acordo com Perez (2001), as rochas e minerais industriais serão as matérias-primas típicas da segunda revolução industrial, as matérias-primas do terceiro milênio, por serem imprescindíveis na fabricação de produtos demandados pela sociedade pós-industrial (fibra óptica, componentes eletrônicos etc.).

O consumo *per capita* entre 1970 e 2004, mostra diferentes padrões de evolução, o cobre, por exemplo, com oscilações mais bruscas, chegou ao fim desse período com um consumo superior ao do ano 1970 (LUZ; LINS, 2005).

No Brasil, o setor de fios e cabos e semimanufaturados de cobre e suas ligas acaba de registrar um faturamento de R\$ 7,5 bilhões em volume de negócios obtidos em 2007 - o maior de sua história no Brasil. A perspectiva da indústria é manter as altas taxas de crescimento. Em 2008, por exemplo, a expectativa é de um aumento de 5,3% nas vendas. A capacidade instalada apresentou, também, um significativo aumento de 11%, passando de 679 mil toneladas em 2006

para 755 mil toneladas no ano passado (Brasil Mineral, 2008). Fatores determinantes como os projetos da província mineral de Carajás (PA) desenvolvidos, sobretudo, pela Companhia Vale do Rio Doce (CVRD) - (Projeto Sossego), a Chapada dos Guimarães (MT), região do Sucunduri (AM) com potencial comprovado, entre outros, apresentam auto-suficiência nacional e inserção competitiva no mercado internacional do cobre. A rota hidrometalúrgica será prevalente como alternativa de extração de cobre. O grande desafio que se apresenta para o país é o avanço no domínio da tecnologia, a fim de definir rotas alternativas de processos extrativos para os diferentes tipos de minério de cobre, pois rotas como a pirometalurgia, apresentam algumas restrições como: elevados investimentos, altos gastos de energia, além de problemas ambientais pela emissão de gases poluentes. O projeto Sossego, da CVRD, destaca-se como o primeiro mineiro-empendimento de cobre da Amazônia com capacidade instalada de 10.000 t Cu/ano. Admite-se que os investimentos em novas tecnologias, em diferentes estágios de desenvolvimento no mundo, elevam a probabilidade de mudanças nos processos de recuperação de cobre. (RODRIGUES; FERRAZ, 2007).

Com o propósito de se recuperar cada vez mais essa matéria prima, tem sido feito muitos estudos ao longo do tempo, a fim de minimizar custos de extração a partir de sulfetos minerais de cobre, como a calcopirita que é um dos minerais mais abundantes encontrado na natureza, e minimizar a problemática de se lixiviar esse mineral tão refratário. Klauber (2008) publicou uma revisão, considerando sob aspecto geral, os vários estudos inseridos na literatura, explorando as rotas hidrometalúrgicas, químicas e microbiológicas que podem ser empregadas para aumentar a recuperação de cobre, dentre elas podemos citar: efeito de detergentes/surfactantes, efeito catalítico do íon prata ou cloreto, uso de consórcios de microrganismos termofílicos, mesofílicos etc.

Dentro desse contexto, e em caráter exploratório, em nosso trabalho foi estudado o efeito do aminoácido cisteína na lixiviação da calcopirita em diferentes concentrações, de modo a avaliar o comportamento da atividade bacteriana nesse meio, e a adição do *A. thiooxidans*, objetivando encontrar uma melhora do processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biolixiviação

Historicamente, a correlação da presença de bactérias em processos de lixiviação de minerais somente veio ocorrer em meados dos anos 40, quando a poluição do rio Ohio, nos Estados Unidos, atingiu níveis alarmantes. Nessa ocasião várias instituições de pesquisa foram incumbidas de investigar as causas desta poluição (alta produção de ácido sulfúrico) e encontrar as alternativas para eliminá-la. Os resultados dessa investigação revelaram que:

- O ácido sulfúrico gerado era procedente da oxidação de sulfetos de ferro associados ao carvão.
- Havia a presença de bactérias oxidantes de enxofre nas drenagens ácidas de minas.
- O íon ferroso liberado pela oxidação da pirita na drenagem ácida era oxidado em uma velocidade muito maior do que a oxidação química desse íon em estudos laboratoriais; além disso, assim que essas drenagens ácidas encontravam os efluentes, um precipitado vermelho-amarelado era formado (ROSSI, 1990).

Obviamente, que o aumento das taxas da reação de oxidação era devido a alguma atividade catalítica. Essa atividade catalítica só foi atribuída posteriormente à flora microbiana presente neste ambiente extremamente ácido por Colmer e colaboradores (1950) *apud* (ROSSI,1990) e Temple e Colmer (1951), que isolaram, de águas ácidas de minas, uma bactéria quimiolitotrófica, ou seja, retira sua energia da oxidação de compostos inorgânicos, atribuindo à mesma ser responsável pela oxidação do íon ferroso e para o qual propuseram o nome de *Thiobacillus ferrooxidans*.

Os fenômenos bioquímicos nos quais microrganismos aumentam consideravelmente o processo de lixiviação, atuando como verdadeiros catalisadores biológicos na solubilização de metais, a partir dos minerais, formaram os fundamentos da biolixiviação. Atualmente a biolixiviação em escala industrial é conduzida em pilhas sobre uma área impermeabilizada, com uma leve inclinação do terreno, redirecionando o líquido lixiviante para um tanque e a partir deste, essa solução é bombeada novamente para as pilhas (Figura 1). Este processo é conduzido a partir de sulfetos minerais de baixa concentração para recuperação de certos metais como: cobre, níquel, urânio e ouro. Alguns países destacam-se na aplicação desse processo: EUA, Canadá,

África do Sul, Rússia, Espanha, Chile, México, Bulgária, Austrália, dentre outros (GARCIA; URENHA, 2001).

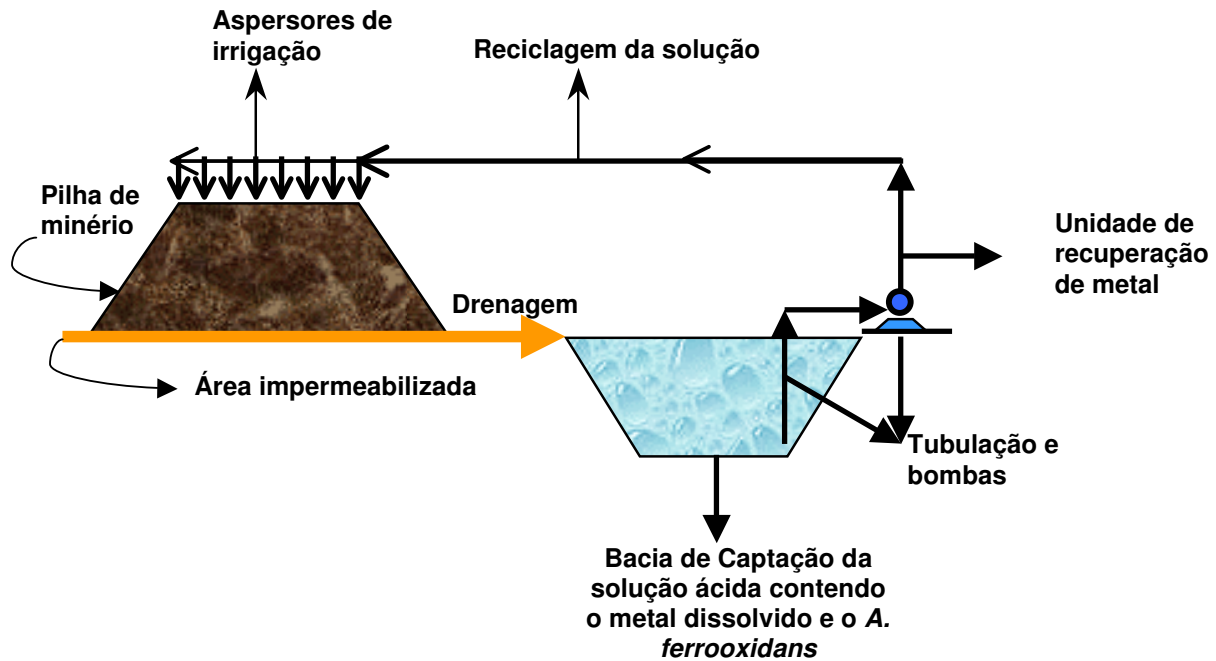


Figura 1 - Esquema geral de lixiviação bacteriana em uma pilha de minério (GARCIA; URENHA, 2001).

O processo de lixiviação bacteriana apresenta várias vantagens em relação a outros processos tradicionais como o pirometalúrgico, processo que consiste basicamente na oxidação do minério contendo o metal de interesse, pela queima em altas temperaturas (no caso de sulfetos minerais). O processo pelo qual ocorre essa oxidação é denominado de ustulação. Devido à necessidade de elevadas temperaturas nesse tratamento, o processo pirometalúrgico requer alto gasto energético, atingindo, assim, elevados custos, sendo apenas economicamente viável em jazidas nas quais o metal de interesse encontra-se em alto teor. Outra desvantagem apresentada por esse processo é referente ao problema ambiental, pois a queima de sulfetos minerais provoca a liberação de SO_2 para a atmosfera, um dos gases responsáveis pela chuva ácida (GARCIA E URENHA, 2001).

No processo hidrometalúrgico utiliza-se soluções ácidas ou básicas para o tratamento dos minérios e recuperação do metal de interesse; nessa atividade há vantagens em relação à pirometalurgia, sobretudo quanto ao gasto energético. Em termos gerais, pirometalurgia e a hidrometalurgia são processos aplicados aos minérios que contenham alto teor de metais, pois além de serem mais rápidos na aplicação em escala industrial, o valor agregado ao metal obtido no processo acabado viabiliza os custos e a sua obtenção (GARCIA; URENHA, 2001).

Dentre as vantagens que a biohidrometalurgia apresenta em relação a ambos os processos tradicionais, podem ser citados o baixo custo dos insumos (ácidos e agentes oxidantes); pois os mesmos são produzidos pela própria bactéria, reduzidos gastos energéticos, baixo investimento de capital, baixo custo operacional, reduzida mão-de-obra especializada na operação em relação aos demais processos de beneficiamento dos metais, agregando, assim, valor aos rejeitos de minérios de baixo teor, podendo ainda ser uma alternativa para jazidas de pequeno porte, longe de centros com infra-estrutura (GARCIA; URENHA, 2001).

2.2 BACTÉRIAS DO PROCESSO

2.2.1 Acidithiobacillus ferrooxidans

Como já salientado anteriormente, a observação das transformações naturais de sulfetos minerais desde a metade do século XX, foi associada à presença de microrganismos quimiolitotróficos (que utilizam como fonte de carbono o CO₂ atmosférico), sobretudo em águas de drenagem ácida de minas (COLMER, 1950 *apud* ROSSI, 1990). Temple e Colmer (1951) comprovaram que uma dessas bactérias era responsável pela rápida oxidação do íon Fe²⁺, determinando a acidez dessas águas pela hidrólise do íon férrico produzido. Denominaram essa bactéria de *Thiobacillus ferrooxidans*, que apresenta diferenças fisiológicas em relação a outras bactérias deste mesmo gênero.

A segunda edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (HOLT, 1994) traz na seção do *Thiobacillus* oito novas espécies de três novos gêneros re-classificados por Kelly e Wood (2000). Esses gêneros são *Acidithiobacillus* (contendo *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* e *Acidithiobacillus albertensis*),

Halothiobacillus (contendo *Halothiobacillus neapolitanus*, *Halothiobacillus halophilus* e *Halothiobacillus hydrothermalis*) e *Thermithiobacillus* (contendo *Thermithiobacillus tepidarius*).

O *A. ferrooxidans* foi também isolado posteriormente por numerosos pesquisadores, indicando uma ampla distribuição dessa espécie em ambientes de natureza ácida com a presença do íon ferroso e sulfetos minerais.

São bactérias quimiolitotróficas, mesófilas (sua temperatura ótima de crescimento está em torno de 30°C), acidofílicas (com pH ótimo para crescimento entre 1,5 e 3,0); a energia para seu crescimento e sua manutenção são obtidas a partir da oxidação de compostos inorgânicos de enxofre e do íon ferroso, de onde obtêm toda energia necessária para assimilar o carbono que é obtido da redução do CO₂ atmosférico; são aeróbias, porém apresentam a capacidade para oxidar enxofre elementar na ausência de oxigênio (GÓMEZ e CANTERO, 2005).

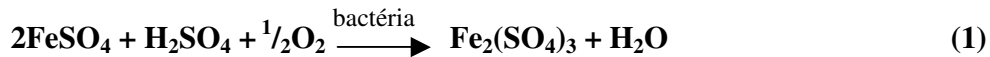
A lixiviação dos sulfetos minerais é acompanhada pelo aumento da concentração dos metais na lixívia. Em geral, os microrganismos lixiviantes, especialmente os *Acidithiobacillus*, apresentam uma característica fisiológica marcante em relação à tolerância a metais pesados, (ver anexo I); porém, diferentes espécies desse gênero mostram sensibilidade completamente diferente aos metais pesados. Frequentemente é possível adaptar linhagens individuais a altas concentrações de metais ou a substratos específicos pelo aumento gradual da concentração do metal ou do substrato (BOSECKER, 1997).

2.2.2 Mecanismo de oxidação do íon ferroso

Como já citado anteriormente, a energia para manutenção e crescimento do *A. ferrooxidans* provém da oxidação de compostos de ferro e enxofre sob condições ácidas. Quando essa bactéria utiliza seu principal substrato que é o íon ferroso sua energia provém da reação oxidativa, podendo fixar CO₂ através da redução do NAD(P) (nicotinamida adenina dinucleotídeo- fosfato).

A oxidação do íon ferroso envolve o espaço periplasmático da membrana celular em pH ácido na faixa de 1.5 a 2.0 e a redução do oxigênio no interior da membrana em pH 6,5 (PRONK; JOHNSON,1992; ELBEHTI; BRASSEUR; LEMESLE-MEUNIER, 2000; QUATRINI *et al.*, 2006).

A reação de oxidação do íon ferroso, catalisada biologicamente, é representada pela seguinte equação:

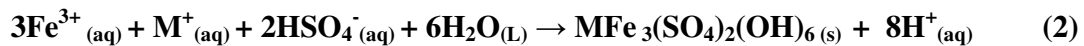


Baseando-se nas proteínas conhecidas da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans*, BOUCHAL *et al.* (2006) estudaram outras proteínas envolvidas na oxidação do enxofre e sulfetos minerais (pirita e calcopirita).

Uma das principais proteínas envolvidas nesta transferência de elétrons e a mais estudada até então, é a rusticianina. Esta é uma proteína periplasmática que contém cobre e é composta por 155 aminoácidos. É extremamente estável em meio ácido (PRONK; JOHNSON, 1992), e tem sido considerada como o principal componente da cadeia respiratória no transporte de elétrons, apesar de não ser totalmente esclarecida a função exata da mesma.

As reações que ocorrem durante o processo de oxidação do ferro causam hidrólise do íon férrico, dando origem a um produto chamado jarosita, que se apresenta como os hidroxissulfatos com fórmula geral $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, onde $\text{M} = \text{K}^+, \text{Na}^+, \text{NH}_4^+$, ou H_3O^+ (GRISHIN *et al.*, 1988;).

A formação e precipitação de jarositas são produtos de uma reação ácida, como mostrado na equação 2.



Jarositas são encontradas em sedimentos de drenagem ácida de mina, algumas vezes com oxihidróxidos de Fe^{3+} . A formação desse produto depende principalmente do pH, da composição iônica e da concentração salina do meio (SERGEI *et al.*, 1988). Stott *et al.*, (2000) e Petersen *et al.* (2001) perceberam, em seus ensaios com calcopirita, que o precipitado de sulfato de ferro pode impedir a completa dissolução do minério durante a biolixiviação.

Segundo Phradan *et al.* (2008), uma vez que a jarosita é formada, ela precipita na superfície do mineral impedindo o contato com a solução inibindo, portanto, a oxidação do mineral, uma vez que a chegada e a saída de elétrons fica restringida. Um dos problemas na lixiviação da calcopirita é superar a formação da camada passivante cuja composição é motivo de discussão na literatura (KLAUBER, 2007; BEVILAQUA *et al.*, 2004).

Apesar do *A. ferrooxidans* utilizar o íon ferroso como substrato energético e como consequência sobreviver em ambientes contendo alto conteúdo de ferro total, o íon férrico pode inibir a oxidação do íon ferroso (20 g L^{-1}) e causar a lise celular (SHRIHARI; GANDHI, 1990, e BOON *et al.*, 1999 a,b).

Na biolixiviação a região de pH que favorece a formação de jarosita é geralmente acima de 2, na qual a atividade de bactérias acidofílicas tende a ser inibida. As espécies de jarositas formadas são caracterizadas por cátion monovalentes, tipicamente K^+ ; Na^+ ; H_3O^+ NH_4^+ , provenientes também do meio de cultura para manutenção bacteriana. No trabalho de Wang *et al.* (2006), foi observada claramente, nos resíduos de lixiviação, a presença dos precipitados de jarosita principalmente pela sua coloração. Ainda os mesmos autores demonstraram a dificuldade de separação das células dos precipitados de jarosita devido à adesão das células a esses oxihidróxidos de ferro. Wang *et al.* (2006), afirmam que polissacarídeos como a dextrina pode ser responsável por promover a adesão celular a partículas de jarosita.

2.2.3 *Acidithiobacillus thiooxidans*

O *A. thiooxidans* pertence à espécie do gênero *Acidithiobacillus*, apresentando características morfológicas e fisiológicas semelhantes ao *A. ferrooxidans* descritas anteriormente, porém a principal diferença entre eles é que o *A. thiooxidans* utiliza somente o enxofre elementar e compostos inorgânicos reduzidos de enxofre como substrato e não o íon ferroso. Esse microrganismo também apresenta sensibilidade a vários tipos de compostos orgânicos como açúcares simples, aminoácidos e ácidos orgânicos (FRATTINI, *et al.*, 2000). Essa espécie foi isolada pela primeira vez em 1922 por Waksman e Joffe *apud* (HOLT, *et al.*, 1994) e também são encontradas nas drenagens ácidas de mina. A oxidação desses compostos contendo espécies de enxofre reduzido provocam uma diminuição nos valores de pH do meio, que pode chegar até 0,5. Esta elevada produção de ácido sulfúrico promove a decomposição das rochas, solubilizando, dessa maneira, compostos metálicos (HOLT, *et al.*, 1994; BOSEKER, 1997; CHAN, *et al.*, 2003).

Existem poucos trabalhos na literatura com culturas puras de *A. thiooxidans* (GARCIA *et al.*, 1995a; GARCIA, *et al.*, 1995b; KUMAR; NAGENDRAN (2007), a maioria tratando de consórcios bacterianos. Nesses consórcios, o papel do *A. thiooxidans* seria o de remover a

camada de enxofre da superfície dos minerais presentes nos meios de lixiviação, tornando esses substratos mais acessíveis aos lixiviantes do meio, incluindo-se as bactérias. (BEVILAQUA, *et al.*, 2002).

Segundo Schippers e Sand (1999), a principal função desse microrganismo é a formação de ácido sulfúrico que promove o ataque protônico sobre o mineral e mantém o íon férrico estável.

Um potencial importante do *A. thiooxidans* para a lixiviação da calcopirita seria o de prevenir o acúmulo de jarosita, uma vez que a acidez do meio (pH 0,5) não favorece a formação de precipitados, o que por sua vez possibilitaria uma maior dissolução do cobre.

Sendo o enxofre elementar um reagente sólido e não solúvel, para que a oxidação se inicie, as células bacterianas têm que necessariamente aderir-se às partículas do sólido, (SUZUKI, 2001).

A oxidação do enxofre pelo *A. thiooxidans* gera a energia necessária (ATP) a qual é utilizada para a fixação do CO₂ atmosférico como sua fonte de matéria orgânica, também pelo ciclo de Calvin, a exemplo do *A. ferrooxidans* (CHEN, 2004).

2.3 Cobre

O cobre é um metal da primeira série de transição de importância industrial. Tem característica dúctil e maleável e apresenta alta condutividade elétrica e térmica (DANA e DANA, 1966).

Desde a idade do bronze, que teve início no Oriente Médio em torno de 3300 a.C, já se utilizava o cobre misturado a outros elementos como estanho, zinco e alumínio, entre outros, para produção de ligas metálicas denominadas bronze. Essas foram as primeiras ligas fabricadas conscientemente, e que consistia na mistura de um mineral de cobre como calcopirita (CuFeS₂), malaquita (Cu₂CO₃(OH) e outros, com estanho (cassiterita (SnO₂)) em um forno alimentado com carbono (carvão vegetal). O anidrido carbônico reduz os minerais aos metais, cobre e estanho, que se fundem formando a liga (DANA e DANA, 1966).

O minério de cobre *in natura* encontra-se em duas classificações geológicas: o oxidado, de origem mais superficial na crosta terrestre e de menor teor, e o sulfetado, que ocorre em camadas mais profundas e que possui teor mais elevado. O cobre é utilizado principalmente nas indústrias de fios e cabos elétricos, que absorvem mais de 50% do metal, sendo o restante utilizado em ligas

especiais, tubos e laminados. O cobre metálico é um excelente condutor de eletricidade e calor, tendo vasta aplicação em diversos setores industriais, com destaque para os da construção civil, telecomunicações, eletroeletrônica, transmissão e distribuição de energia. A indústria de transformação do cobre tem início a partir do minério, cuja extração se dá a céu aberto ou em galerias subterrâneas. Com um teor metálico que varia normalmente entre 0,5% e 2,5%, o minério é submetido à britagem, moagem, flotação e secagem, obtendo-se o concentrado. A partir dessa etapa, dependendo do teor de cobre, aplica-se ou a pirometalurgia ou a hidrometalurgia e para concentrações muito baixas utiliza-se o processo biohidrometalúrgico (ANDRADE *et al.*, 2001).

A exploração mineral é uma atividade desenvolvida mundialmente que movimentou mais de US\$ 5 bilhões por ano em 2005. Recursos de risco dedicados exclusivamente a descobrimento de novas jazidas minerais são investidos desproporcionalmente entre poucos países privilegiados. O Brasil devido a sua reconhecida fertilidade geológica e mineral, e expoente na produção de minérios em geral, tem se mantido entre os dez países maiores captadores desses investimentos. No Brasil, o investimento em exploração mineral é liderado pelas grandes empresas como CVRD, BHP Billiton, Rio Tinto, Alcoa, Alcan, Falconbridge, Votorantim etc., mas também por um crescente número de empresas de pequeno porte, chamadas Juniores, que em 2005 foram responsáveis por 50% do orçamento global de exploração mineral. Exploração mineral é o setor da indústria mineral que apresenta o maior risco, devido às incertezas decorrentes da complexidade das jazidas minerais, mas, em contrapartida, pode proporcionar o maior retorno ao investidor. A diferença entre o sucesso e o insucesso da atividade de exploração é a descoberta de um depósito mineral que seja economicamente viável nos padrões econômicos vigentes. (REIS, 2006)

As reservas mundiais de cobre são estimadas em cerca de 650 milhões de toneladas de metal contido, estando disseminadas em muitas localidades no mundo. Entretanto, apresentam grande concentração no Chile (24,6%) e nos Estados Unidos (13,9%), enquanto no Brasil somam 11,9 milhões de toneladas de metal contido, representando 1,8% do total mundial. O Chile é o maior produtor mundial, respondendo por 35% da produção de cobre contido em concentrado. Ressalta-se o crescimento da produção desse metal no Chile, no Peru, na Indonésia e na Austrália nos últimos dez anos, países que juntamente com o Estados Unidos se tornaram líderes na produção de concentrado de cobre (ANDRADE, *et al.*, 2001). Países de relevância econômica,

tais como China, Estados Unidos, Japão, Alemanha, Coreia do Sul, Itália, Rússia e França estão entre os principais usuários desse metal (Procobre, 2007).

Porém, o mercado mundial de cobre foi afetado em 2005 pela escassez da matéria prima, principalmente por causa da exaustão de jazidas e limitação das unidades produtivas. Dessa forma, em 2006 o cobre atingiu o preço recorde de 8.800 dólares por tonelada. Em função da escassez, analistas vêm observando sinais de transferência de capital especulativo para o mercado de metais, fato que pode contribuir para manter os preços elevados. No Brasil, um dos principais projetos de cobre é a mina de Sossego, operada pela Companhia Vale do Rio Doce. Segundo informações da companhia, a usina de Sossego pode produzir cerca de 500 mil toneladas de concentrado de cobre por ano. Na retrospectiva dos 65 anos da Cia Vale, publicada por Reis, (2007) sobre os números financeiros e operacionais alcançados pela Cia Vale do Rio Doce ao longo de sua história, são citados os investimentos da CRVD em diversos setores minerais, sobretudo na área do cobre, onde a empresa aplicou US\$ 413 milhões no complexo de Sossego. A participação brasileira neste setor alcançou 0,9% na escala mundial. O Brasil não é um dos grandes produtores mundiais de cobre; em 2005 ocupou a vigésima posição entre os maiores produtores, mas especialistas afirmam que o país tem potencial por causa da sua dimensão territorial e potencial das jazidas.

Porém, ainda pode-se dizer que o Brasil é um estreante no mercado internacional de cobre. Foi somente no fim dos anos 90 que as primeiras jazidas importantes foram descobertas pela (CVRD), agora denominada companhia Vale, identificada na província mineral de Carajás (PA). Em 1997, foi descoberta a mina de cobre de Sossego, que começou a ser construída em 2002, e já no ano seguinte iniciou a produção (VILLAREZU, 2007).

O progresso tecnológico e científico da humanidade fez com que o consumo de cobre fosse vinte vezes mais alto no último quarto de século passado que no primeiro, o que mostra a enorme aplicabilidade e variabilidade de um metal que apresenta freqüentemente novos usos e aplicações. (Procobre, 2007).

2.4 Calcopirita (CuFeS₂)

O nome calcopirita é derivado da palavra grega “chalkos”, que significa cobre, ou seja, calcopirita é uma pirita que contém cobre ou pirita de cobre como era conhecida. O nome “pirita”

é derivado da palavra grega “pyros”, que significa (fogo), e está relacionado ao fato de que a pirita quando aquecida na presença de oxigênio queima. A fórmula química da calcopirita é CuFeS_2 embora uma representação mais adequada seria $\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{Fe}_2\text{S}_3$ de modo a destacar que o cobre neste mineral está principalmente no estado cuproso, enquanto o ferro está predominantemente no estado férrico (HABASHI, 1978).

Este sulfeto de cobre é o mais abundante na natureza e por sua vez o mais refratário ao ataque químico ou bacteriano (WATLING, 2006). A baixa reatividade da calcopirita tem sido atribuída à formação de um filme passivo que limita a reação de dissolução com o meio lixiviante. Essa camada passivadora e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada não foi totalmente esclarecida (STOTT *et al.*, 2000; KLAUBER, 2007).

A extração de metais de interesse comercial de sulfetos minerais pode ser realizada por processos oxidativos. Em geral, a lixiviação da calcopirita em solução ácida contendo íon férrico como agente oxidante, procede de acordo com a equação (3) (GARCIA E URENHA, 2001).



Em solução ácida e na presença de oxigênio e bactéria, também pode ocorrer a oxidação da calcopirita de acordo com a reação (4) (GARCIA E URENHA, 2001).



Como citado anteriormente, as bactérias do gênero *Acidithiobacillus* podem oxidar também o enxofre, produzindo ácido, como mostrado na equação (5) (WATLING, 2006).



Existe uma grande controvérsia sobre as razões que explicam a refratariedade da calcopirita quanto ao ataque químico, ainda que haja quase absoluta unanimidade quanto às condições de lixiviação devam ser oxidantes, utilizando meio com oxigênio e o íon férrico. Na maioria dos casos, a presença do Fe^{3+} na dissolução da calcopirita influi em dois aspectos diferentes: se a sua concentração é suficiente, ajuda a lixiviação do mineral; no entanto, se a sua concentração é

elevada, inicia o processo de passivação da superfície do mesmo e impedindo seu ataque através da formação de compostos intermediários da reação, principalmente jarositas (BALLESTER; CÓRDOBA, 2005).

2.5 Mecanismos de interação bactéria/substrato

Como já mencionado anteriormente, na biolixiviação ocorre à conversão biológica de compostos metálicos insolúveis para sua forma solúvel em meio aquoso. Os sulfetos minerais podem conduzir elétrons, pois são semicondutores; dessa maneira, os processos de oxidação química ou microbiológica podem ser considerados um sistema de corrosão (NATARAJAN, 1990, ERLICH; BRIERLEY, 1990). Nesse processo os sulfetos são oxidados a sulfato liberando íons metálicos em aerobiose. Compostos reduzidos de enxofre, além do íon ferroso, também são oxidados pelas bactérias acidofílicas. Apesar de o oxigênio molecular ser o acceptor final de elétrons nos processos de biolixiviação, o íon férrico, em algumas situações, também pode ser o acceptor final dos elétrons (WATLING, 2006). Tradicionalmente assumiu-se que a interação bacteriana com a superfície dos sulfetos minerais resulta no aumento da atividade de corrosão (WATLING, 2006).

As opiniões sobre a interação bacteriana com a interface dos sulfetos se dividem em pesquisadores que defendem uma interação direta e outros uma interação indireta. Entretanto, em todos estes estudos, o mecanismo interfacial bactéria/sulfeto permanece ainda controverso, uma vez que espécies vivas e os muitos compostos que elas secretam, interagem com a interface sólida (BEVILAQUA, 2003). Muitos desses compostos que a bactéria forma podem depositar-se na superfície do mineral, formando, conseqüentemente, um biofilme.

Geralmente o termo biofilme é associado com um agregado microbiano, consistindo em microrganismos e substâncias polissacarídicas extracelulares, produzidas sob a superfície das células. Investigações microscópicas têm indicado que o crescimento do *A. ferrooxidans* é iniciado pela adesão da bactéria a superfície. Embora a adesão do *A. ferrooxidans* sobre as superfícies minerais seja tenaz e frequentemente irreversível (KARAN *et al.*, 1996) não há muito conhecimento sobre como e quais as forças que dirigem essa interação bactéria-superfície. Obviamente, essa interação depende das características físico-químicas da superfície e do envelope celular, bem como da força iônica do meio. Como a bactéria se move em direção a uma

superfície sólida, vários fatores afetam as forças que determinam se a adesão irá ou não ocorrer. Entretanto, essas forças diferem na intensidade e na distância na qual elas influenciam a interação entre a bactéria e a superfície a ser aderida. Muito frequentemente as cargas da bactéria e da superfície são negativas e, portanto, ocorrerá uma repulsão eletrostática que pode evitar que a bactéria se aproxime o suficiente da superfície para que ocorra a adesão. Entretanto, as forças de repulsão diminuem com o aumento da força iônica do meio (FLETCHER, 1996).

Outra barreira potencial à adesão de bactéria é a água adsorvida sobre superfícies. Para que a adesão ocorra tem de haver o deslocamento dessa água adsorvida, o que é energeticamente desfavorável. Porém, se as superfícies possuem grupos não polares, esses podem auxiliar na exclusão dessa água por interações hidrofóbicas.

A superfície bacteriana é uma estrutura tridimensional, heterogênea, com uma composição química complexa e com várias macromoléculas na interface com o meio. Os processos de adesão bacteriana são provavelmente o resultado de uma série de interações que ocorrem simultaneamente (iônicas, hidrofóbicas, de van der Waals), executadas por proteínas específicas, mediadas por exopolímeros etc. A contribuição relativa de cada interação depende de alguns fatores, tais como: composição da amostra, influências ambientais, disponibilidade de substrato etc.

Estudos de adesão realizados por Harneit *et al.*, (2006) com *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, mostraram que o pré-requisito para a adesão inicial das células bacterianas é a presença dos exopolissacarídeos (EPS), mediado pelo contato. Esses autores cresceram essas bactérias em diferentes substratos e observaram que as células de *A. ferrooxidans* aderem rapidamente em vários sulfetos minerais e as células dessa bactéria crescidas em Fe^{2+} solúvel, geralmente geram menos EPS que quando crescidas em substrato sólido, e o EPS desses microrganismos apresentaram açúcares neutros, ácido glucurônico e ácidos graxos saturados e no caso das células crescidas em Fe^{2+} apresentaram íons Fe^{3+} . O EPS do *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* continham aproximadamente 40 a 50% de açúcares e 40 a 65% de ácidos graxos. O EPS do *A. thiooxidans* foi identificado como ácido eicosanóico, mas, os açúcares não foram determinados especificamente. No EPS do *A. ferrooxidans* foram identificados diferentes componentes de açúcares principalmente fucose, ramnose e glicose, e nos ácidos graxos foram encontrados principalmente, ácido decanóico, octadecanóico e hexadecanóico, e poucas quantidades de ácido glucurônico. Em relação ao crescimento em diferentes substratos, esses

mesmos autores perceberam que a composição do EPS varia conforme as condições de crescimento e do substrato, pois células de *A. ferrooxidans* crescidas em Fe^{2+} ou pirita contém mais ácidos graxos e menor quantidade de açúcar quando comparadas com as células dessa bactéria crescidas em enxofre. Ainda Harneit *et al.*, (2006) argumentam que isso ocorre devido à natureza do enxofre ser mais hidrofóbica. Sharma *et al.* (2003) faz a mesma atribuição a maior hidrofobicidade em enxofre que em ferro devido à síntese de diferentes componentes protéicos na superfície e a bactéria sintetiza sim mais moléculas de proteínas contendo grupos funcionais reativos para facilitar a adsorção aos substratos.

O entendimento, em um nível fundamental, desses mecanismos e, conseqüentemente, da adesão dessas bactérias sobre os substratos minerais é de fundamental importância para a manipulação dos processos aplicados em biolixiviação. Os principais mecanismos envolvidos nesse processo podem ser observados no esquema ilustrado na Figura 2 (CRUNDWELL, 2003).

2.5.1 Mecanismo Direto

O mecanismo de interação direta (Figura 2a), implica no ataque enzimático da bactéria sobre o mineral, sendo, portanto, necessária sua adesão à superfície do mesmo. Nesse mecanismo, a bactéria extrai elétrons diretamente do mineral e esses elétrons são transferidos ao oxigênio, receptor final (BEVILAQUA, 2003). O mecanismo direto pode ser descrito pela equação global 6:



Segundo GARCIA E URENHA (2001), no caso da calcopirita, basicamente a dissolução desse mineral ocorre numa primeira etapa pelo ataque bacteriano direto conforme a equação 4.

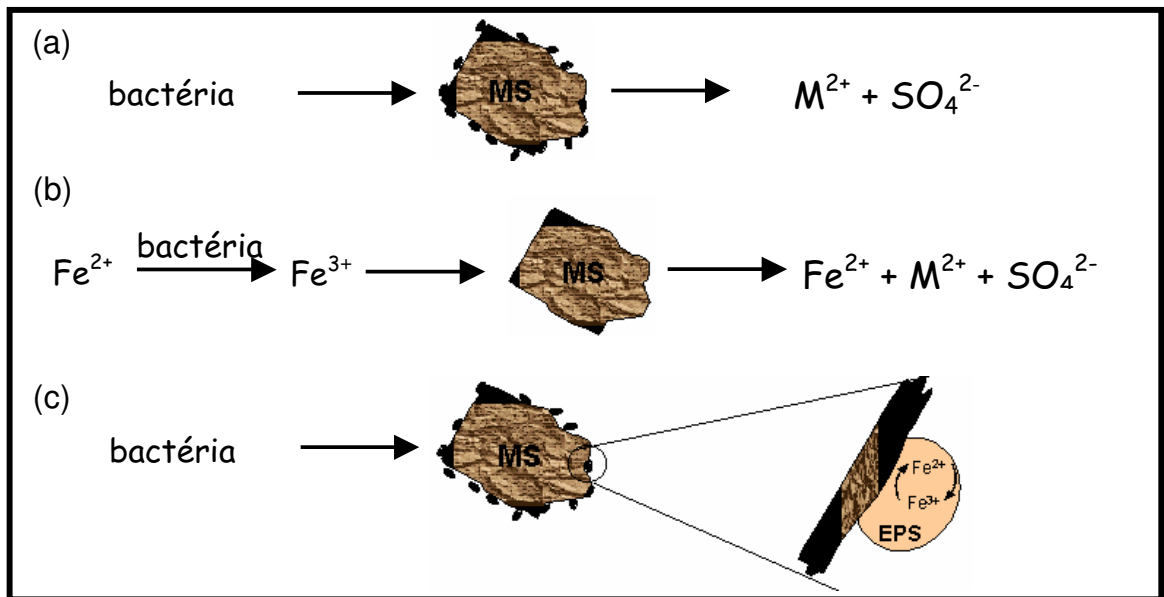


Figura 2 - Mecanismos de interação bactéria/substrato propostos para a ação do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos minerais. (a) **mecanismo direto**, no qual a bactéria oxida íons ferrosos em solução e estes, por sua vez, lixiviam o metal. (b) **mecanismo indireto**, no qual a bactéria oxida o mineral, sem requerer contato. (c) **mecanismo de contato indireto**, no qual a bactéria oxida o mineral e os íons ferrosos dentro do biofilme (formado pela própria bactéria e o material exopolimérico que ela produz), os íons férricos lixiviam o metal dentro dessa camada exopolimérica (CRUNDWELL, 2003).

2.5.2 Mecanismo Indireto

Sand e colaboradores (1995) propuseram que a lixiviação bacteriana dos sulfetos minerais ocorre essencialmente através do mecanismo indireto, iniciando-se pelo íon férrico. Nesta definição, eles concluem que o papel do íon férrico ligado a uma substância exopolimérica é essencial para a ligação das células à pirita. De acordo com o novo modelo proposto por Sand *et al.* (2001), os sulfetos metálicos são degradados pelo ataque químico de íons férricos ou pelo ataque de prótons na rede cristalina. O mecanismo e a química de degradação são determinados pela estrutura do mineral.

Nesse mecanismo, a bactéria não necessita estar em contato com a superfície do mineral (Figura 2b), sendo assim, as bactérias têm somente uma função catalítica, pois geram um agente lixivante que oxida quimicamente o sulfeto mineral (ROHWENDER *et al.*, 2003). A solubilização do metal pode ser descrita pela equação global (7).



Segundo Garcia e Urenha (2001), utilizando como exemplo o mineral calcopirita o mecanismo indireto pode ocorrer pela equação (4) citada anteriormente:

A descoberta de uma substância polimérica extracelular (EPS) que é excretada pela bactéria e adere à superfície do mineral contribuiu para melhorar o conhecimento dos mecanismos da ação microbiana. Estudos feitos por Rodríguez e colaboradores (2003a) mostraram que a formação do material exopolimérico é um requerimento importante para o ataque bacteriano e subsequente solubilização do mineral. O ferro contido no EPS confere carga positiva à célula, estabelecendo atração eletrostática entre a célula bacteriana e a superfície negativamente carregada de alguns minerais. O mecanismo envolvendo o EPS é chamado mecanismo de contato indireto (Figura 2c).

Muitos sulfetos (ZnS, CdS, PbS, CuS, por exemplo) produzem enxofre elementar como um produto de oxidação e outros (FeS₂, MoS₂, WS₂, por exemplo) produzem sulfatos. Por existirem dois tipos de sulfetos, solúveis e insolúveis em ácido conforme sua estrutura, foram propostos dois tipos de mecanismos indiretos de oxidação: tiosulfato e polissulfetos, os quais podem ser entendidos da seguinte maneira: o mecanismo do tiosulfato (Figura 3a) é baseado no ataque oxidativo dos sulfetos minerais pelo íon Fe³⁺ em meio ácido e o mecanismo indireto do polissulfeto (Figura 3b) baseia-se no ataque dos íons Fe³⁺ e ataque protônico.(SHIPPERS; SAND, 1999).

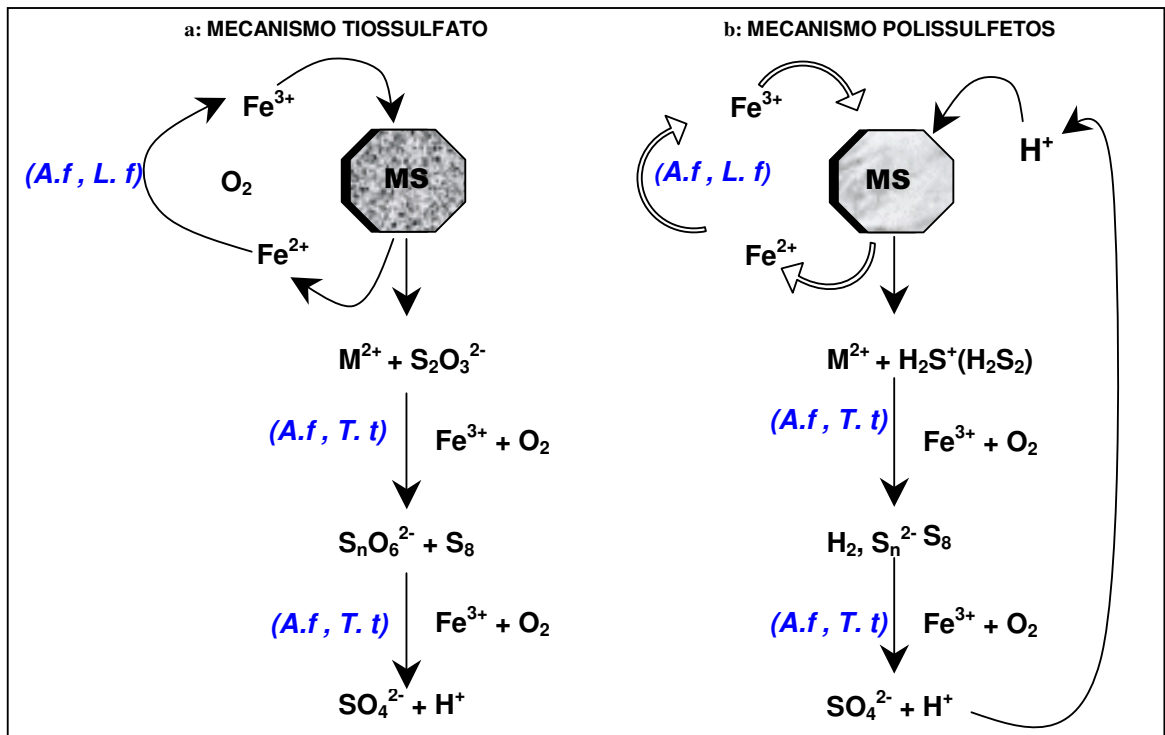


Figura 3 – Esquema dos mecanismos tiosulfato e polissulfeto de lixiviação bacteriana dos sulfetos minerais. Os íons férricos retiram elétrons dos sulfetos minerais (MS) e são, portanto, reduzidos a ferro (II). Dessa maneira são liberados cátions do metal (M^{2+}) e compostos intermediários de enxofre solúveis em água. A oxidação bacteriana do ferro (II) é catalisada pelo *A.ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*. No caso dos sulfetos minerais solúveis em ácido (B), eles também podem sofrer ataque dos prótons. Os compostos de enxofre liberados são oxidados quimicamente e também pelas bactérias oxidantes de enxofre (*A.f.*, *A.t.*). MS = sulfeto metálico; M^{2+} = íon metálico; $S_2O_3^{2-}$ = tiosulfato; S_n^{2-} = polissulfeto (SAND; SCHIPPERS 2001).

2.6 Cisteína ($C_3H_7NO_2S$)

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas tem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono ($C\alpha$). Eles diferem um dos outros através da sua cadeia lateral ou grupos “R”, os quais variam em estrutura, tamanho, e carga elétrica que influenciam a solubilidade do aminoácido em água. Os aminoácidos nas moléculas protéicas são sempre (L)- estereoisômeros, os aminoácidos (D)- estereoisoméricos foram encontrados apenas em pequenos peptídios da parede de células bacterianas. Em solução aquosa estão ionizados e podem agir como ácidos ou bases (LEHNINGER, 2004).

A cisteína é um aminoácido alifático, possui um grupo tiol na sua cadeia lateral e é principalmente encontrada em proteínas (Figura 4). Quando exposta ao ar, e sob determinadas condições fisiológicas (incluindo no interior de proteínas), a cisteína oxida-se formando cistina, composta por duas cisteínas unidas por uma ligação dissulfeto (LEHNINGER, 2004). A partir disso, originou-se seu nome, onde a palavra grega *kustis*, significa “bexiga”, pois foi isolada inicialmente a partir de cálculos renais (sob a forma de cistina). As cisteínas têm um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas. Ao formarem ligações dissulfeto entre os seus grupos tiol, aumentam a estabilidade molecular e a resistência à proteólise.

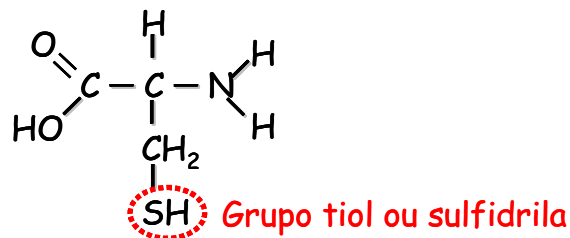


Figura 4 - Fórmula estrutural da molécula de cisteína, apresentando em sua cadeia lateral um grupo SH denominado tiol ou sulfidril (LEHNINGER, 2004).

O grupo tiol possui carácter nucleofílico. Como o pKa deste grupo é de 8,4, sua atividade química pode ser regulada pelo ambiente.

Em relação aos sulfetos minerais, foi estudado o efeito da cisteína na superfície da pirita (FeS₂). Neste estudo foi observado que na presença de cisteína a dissolução anódica da pirita aumenta. A interação do *A. ferrooxidans* com a pirita na presença de cisteína também foi investigada e observou-se que o aminoácido pode aumentar a disponibilidade da pirita como uma fonte de energia para a bactéria (MOEL, *et al.*, 2006).

Em um estudo feito por Rojas-Chapana e Tributsch (2000) (Figura 5), a adição de uma pequena quantidade do aminoácido cisteína a uma solução ácida em contato com a pirita, elevou cerca de três vezes a atividade oxidativa da bactéria *A. ferrooxidans*. Nesse estudo também foi observado que a pirita pôde ser também oxidada apenas na presença de cisteína, sem a presença da bactéria. Os autores discutiram a participação do grupo sulfidril (SH) da cisteína no processo oxidativo pela ligação desses à pirita formando pontes dissulfeto (S-S). Essa reação na superfície

da pirita seria a responsável pela liberação do ferro e enxofre da rede cristalina. A adição da bactéria apresentaria ainda vantagens no processo bioquímico de corrosão, pela oxidação das espécies liberadas de ferro e enxofre da superfície do minério, que dessa maneira serviriam como substratos para essa espécie bacteriana. Sendo ácido o pH da solução lixiviante (em torno de 2,0) a redução dos grupos SH da cisteína é favorecida, transformando a dissolução da pirita num processo contínuo e progressivo.

A interação da cisteína com outros sulfetos minerais, como por exemplo, a calcopirita, objeto desse estudo, não está descrita na literatura até o presente momento.

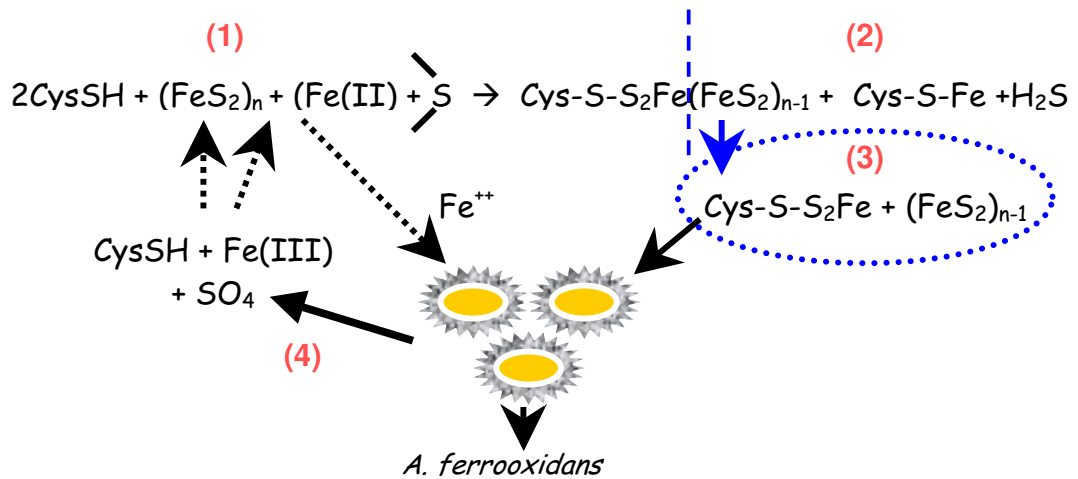


Figura 5 - Esquema da interação do sulfeto mineral pirita com o aminoácido cisteína proposto por Rojas-Chapana e Tributsch em 2000.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

- Investigar o efeito da cisteína na biooxidação da calcopirita (CuFeS_2) utilizando-se *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de cisteína na oxidação do Fe^{2+} pelo *A. ferrooxidans* em ensaios respirométricos.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de cisteína na oxidação do Fe^{2+} pelo *A. ferrooxidans* em ensaios respirométricos na presença de calcopirita.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de cisteína no crescimento do *A. ferrooxidans* na presença ou ausência de calcopirita.
- Avaliar a lixiviação de calcopirita pelo *A. ferrooxidans* e a solubilização de cobre respectivamente na presença ou ausência de cisteína e do *A. thiooxidans*.
- Avaliar a dissolução da calcopirita através da análise dos produtos da fase sólida dos ensaios de biolixiviação (resíduos).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem bacteriana

Foi utilizada a linhagem *A. ferrooxidans-LR*, isolada de lixívia ácida de minério de urânio proveniente da Lagoa Real-Bahia (GARCIA, 1991). Essa linhagem apresentou, nos trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, maior atividade catalítica da dissolução dos sulfetos de cobre e maior resistência a metais pesados. Dessa forma, essa linhagem foi utilizada em todos os ensaios. Além dessa, foi utilizada também a linhagem bacteriana, *A. thiooxidans- FG-01*, isolada de drenagem ácida de mina de urânio de Figueira-Paraná, porém somente nos ensaios de biolixiviação.

4.2 Amostra mineral

O sulfeto mineral calcopirita (CuFeS_2) utilizado, é proveniente da mina de Sossego-PA, fornecida pela Companhia Vale. Para a execução dos ensaios a amostra foi, triturada e moída com tamanho de granulometria $100\% < 0.2 \text{ mm}$ (65 mesh). Conforme análise realizada na CNEN-LAPOC, Poços de Caldas – MG, a composição química do mineral apresentou: Fe (27%); Cu (23%); S- pirítico (22,5%); S – sulfático (0,39%); S total (22,9%); Si (3,2%); e Ca (7%).

4.3 Meio de cultura líquido (T&K)

Para a manutenção periódica da linhagem bacteriana *A. ferrooxidans*, obtenção de suspensão celular para os experimentos de respirometria, dosagem de proteína e obtenção de inóculo para os experimentos de biolixiviação, foi utilizado o meio de cultura T&K desenvolvido por Tuovinen e Kelly (1973), com pequenas modificações. A composição e o modo de preparo do referido meio estão descritos a seguir: solução A, contendo os sais minerais, e solução B contendo sulfato ferroso como fonte de energia, ambas ambientalizadas a pH 1,8.

Solução A:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$0,5\text{g L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,5\text{g L}^{-1}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$0,5\text{g L}^{-1}$
800 mL de água ácida (H_2SO_4) pH = 1,8	

Solução B (fonte de energia):

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$33,3\text{g L}^{-1}$;
200 mL de água ácida (H_2SO_4) pH = 1,8	

A solução A foi esterilizada em autoclave (120°C , por 20 min, a 1atm), e a solução B foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose ($0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro – Millipore – HAWP 04700). No momento do uso as soluções foram misturadas na proporção de 4:1, respectivamente.

4.3.1 Meio de Cultura 9K

Para a manutenção e cultivo do *A. thiooxidans* foi utilizado o meio 9K desenvolvido por Silverman e Lundgren (1959). A composição e o modo de preparo estão apresentados a seguir:

Solução de sais:

NH_4SO_4	3g L^{-1}
K_2HPO_4	$0,5\text{g L}^{-1}$
MgSO_4	$0,5\text{g L}^{-1}$
KCl	$0,1\text{g L}^{-1}$

Fonte de energia:

Enxofre sublimado.....10g L⁻¹

A solução de sais foi esterilizada em autoclave (120⁰C, por 20 min, a 1atm) e o enxofre por autoclave à 110⁰C por 1 hora. No momento do uso foi adicionada 1 grama de enxofre para 100 mL de solução de sais em frascos erlemeyer de 250 mL.

4.4 Preparo da suspensão celular

O *A. ferrooxidans*-LR foi crescido em 1 L de meio T&K, à temperatura de 30°C em mesa agitadora com rotação de 150 rpm. Após o crescimento da bactéria (aproximadamente dois dias), indicado pela oxidação total de Fe²⁺, essa solução foi centrifugada (BECKMAN-Avantil J-25, com rotor J-10) à 4.000 rpm por 1 hora, sob refrigeração a 4°C. Após este procedimento o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de células obtidas foi lavado com água acidificada (pH 1,8) e centrifugada novamente na Eppendorf-Centrifuge 5415-R por 10 min, a 4.000 rpm, sob refrigeração de 4°C. Esse procedimento foi repetido até que toda suspensão celular estivesse separada do precipitado de jarosita; em seguida essas células foram ressuspensas em um volume de 5 mL de água acidificada (pH 1,8). Quando não utilizada imediatamente, a suspensão celular foi estocada em refrigerador a 4⁰C por 5 dias no máximo, sem perda significativa de sua atividade.

4.4.1 Dosagem de proteínas totais

Para a quantificação da biomassa a ser utilizada nos ensaios de respirometria celular foi realizada a dosagem de proteínas totais. Centrifugou-se 1 mL da suspensão celular por 15 minutos a 1.500 rpm (Eppendorf-Centrifuge 5415-R), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento (células) foi suspenso em 1 mL de NaOH (1 mol L⁻¹) e levado para hidrolisar por fervura em banho-maria por 30 minutos. Alíquotas dessa solução, diluídas adequadamente, foram utilizadas para a dosagem protéica (HARTREE, 1972).

4.4.1.1 Reagentes:**Solução A:**

$C_4 H_4 KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (tartarato de sódio e Potássio).....	0,5g
Na_2CO_3	25g
NaOH 1 Mol L ⁻¹	125mL
Água destilada.....	q.s.p.250mL

Solução B:

$C_4 H_4 KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (tartarato de sódio e Potássio).....	0,2g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1g
NaOH 1 Mol L ⁻¹	1,0mL
Água destilada.....	9,0mL

Solução C:

Reagente de Folin-Ciocalteu.....	10,0mL
Água destilada.....	30,0mL

4.4.1.2 Procedimento:

Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,9mL da solução-A a 1mL da solução de proteínas em diluição apropriada, e incubou-se em banho-maria a 50°C por 10 minutos, resfriando-se a seguir à temperatura ambiente.

Adicionou-se 0,1 mL a solução B e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente adicionou-se 3mL da solução C e incubou-se por 10 minutos a 50°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 650nm. Utilizou-se como padrão a soroalbumina bovina. E os ensaios foram feitos em duplicata em diferentes concentrações (1:5; 1:10; 1:20).

4.5 Ensaio respirométricos

A oxidação direta do sulfato ferroso foi estudada preliminarmente utilizando-se suspensões lavadas de células do *A. ferrooxidans*-LR em experimentos de respirometria celular, utilizando-se o respirômetro de Warburg (UMBREIT, et al., 1972) o qual consiste basicamente de um frasco de reação com reservatório lateral acoplado a um manômetro graduado. Esse tipo de ensaio permite avaliar de forma rápida a atividade oxidativa celular, por células em repouso (sem crescimento). Nos frascos de reação foram adicionados 2,5 mL de solução de sulfato ferroso (120 mmol L^{-1}), e as seguintes concentrações de cisteína (mol L^{-1}) no volume final do frasco: zero, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} e 0,5 mL de suspensão celular equivalente a $150 \mu\text{g}$ de proteína total; paralelamente para cada concentração de cisteína, foram colocados os frascos sem adição de bactéria, contendo o mesmo volume de solução, como controle químico.

No poço central dos frascos de reação foi colocado 0,1 mL de KOH 20% para imediata absorção de gás carbônico para evitar o crescimento celular. Este conjunto frasco-manômetro fechado foi colocado em banho de água com temperatura constante (30°C) e mantido sob agitação (100 a 120 pulsos por minuto). Medidas do oxigênio consumido foram realizadas por leitura direta no manômetro e transformadas em $\mu\text{L min}^{-1}$ pela seguinte expressão:

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

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).

Consumo de oxigênio (μL) = $L \cdot K$

onde:

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

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 (fluido manométrico) 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:

4.6 Ensaio de oxidação do íon ferroso

Para os ensaios de oxidação foi utilizada solução de 120 mmol L^{-1} de Fe^{2+} , na forma de sulfato ferroso, com pH inicial de 1,8. Os ensaios foram realizados em triplicata, na presença de diferentes concentrações de cisteína (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e seus respectivos controles. O volume total da solução nos frascos foi de 150 mL com inóculo de 10% de células de *A. ferrooxidans*. O qual, diferentemente da respirometria, nesse ensaio de oxidação as células promovem divisão celular. Os frascos foram mantidos por 72 h sob agitação de 150 rpm a 30°C , sendo retiradas alíquotas de 2 mL em diferentes intervalos (0; 4; 8; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 h) e tituladas com dicromato de potássio (VOGEL, 1960).

4.6.1 Determinação de Fe^{2+}

A atividade do *A. ferrooxidans* foi acompanhada pela oxidação do Fe^{2+} que foi realizada seguindo-se o procedimento descrito por VOGEL (1981).

3.6.1. a Reagentes:

H_3PO_4 : H_2SO_4 (PA).....(1:1)

$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{BaN}_2\text{O}_6\text{S}_2$ (difenilaminosulfonato de bário).....(0,3%)

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (dicromato de potássio)

4.6.1. b Procedimento:

Foram retiradas alíquotas de 2 ml de amostra e estas foram acidificadas com 1mL de solução da mistura de ácido H_3PO_4 e H_2SO_4 puros, na porção de 1:1. A seguir o volume do frasco foi completado até 50 mL com água destilada e adicionado 0,1 mL do indicador difenilaminosulfonato de bário para posterior titulação com dicromato de potássio, até atingir o ponto de viragem da cor verde clara para lilás.

4.7 Ensaio de biolixiviação

Assim como em Bevilaqua (1999), previamente aos ensaios de crescimento, foi realizada a adaptação da linhagem bacteriana *A. ferrooxidans*-LR, com o objetivo de promover o crescimento da bactéria utilizando como fonte energética o sulfeto metálico em estudo. Dessa forma foi realizada a substituição progressiva da fonte energética (Fe^{2+}) do meio T&K pelo mineral calcopirita, conforme procedimento apresentado na Tabela 1. Os frascos controle como os frascos contendo a fonte energética e os inoculados, foram submetidos durante as fases de adaptação, a uma mesa agitadora (150 rpm), sob temperatura de $30^{\circ}C$, durante o período de cada uma das fases de adaptação (15 dias).

Tabela 1 - Fases do procedimento experimental na adaptação do *A. ferrooxidans*-LR ao crescimento no sulfeto de cobre calcopirita.

Fases	Concentração de Fe^{2+} mmol L ⁻¹	Concentração do Sulfeto (% m/v)
1 – (15 dias)	60	1%
2 – (15 dias)	30	1%

Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyer-250 mL contendo a solução-A do meio T&K e % de sólidos da calcopirita de 2,5% m/v; em cada frasco foram inoculados 5% (v/v) de suspensão celular de *A. ferrooxidans*-LR. O volume final no frasco foi de 150 mL. As condições experimentais ensaiadas foram as seguintes:

1. 150 ml de solução A do meio T&K e calcopirita (2,5% m/v) na presença de (5% v/v) de suspensão celular de *A. ferrooxidans*-LR.
2. 150 ml de solução A do meio T&K e calcopirita (2,5% m/v) na presença de (5% v/v) de suspensão celular de *A. thiooxidans*-FG01
3. 150 ml de solução A do meio T&K e calcopirita (2,5% m/v) na presença de (5% v/v) de suspensão celular de *A. thiooxidans*-FG01 e 5% (v/v) de suspensão celular de *A. ferrooxidans*-LR, sendo o volume dos inóculos descontados do volume final do frasco.
4. As mesmas condições acima foram utilizadas para os outros ensaios, porém adicionando cisteína de modo que a concentração no volume final do frasco fosse 10^{-3} e 10^{-5} (mol L^{-1}).

Nas variáveis do ensaio de biolixiviação foram utilizadas células adaptadas e células não adaptadas e todas as condições experimentais foram repetidas em condições abióticas.

A evaporação de cada frasco foi calculada pela perda de massa e compensada pela adição de água destilada esterilizada. Este controle foi feito a cada sete dias.

Entre 7 e 10 dias foram retiradas alíquotas das polpas dos frascos em torno de 6 a 8 mL para separação das fases sólida e líquida por centrifugação a 4.000 rpm por 10 a 15 minutos sob refrigeração (rotor RTH-750, centrífuga Sorvall - RT7 - Du Pont). No sobrenadante foram feitas as determinações de pH, Eh, Fe^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} . As determinações de pH e Eh foram realizadas com eletrodo combinado de Pt (contra $\text{Ag}^0 \text{AgCl KCl 3M}$). As determinações de Fe^{2+} foram feitas por titulometria com dicromato de potássio, conforme Vogel (1981), enquanto as determinações de Fe^{3+} foram feitas pelo método espectrofotométrico, descrito por Karamenev (2002).

4.7.1a Dosagem de cobre

Primeiramente foi feita a padronização em triplicata da solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tiosulfato de sódio conforme a metodologia utilizada por Vogel, (1981b).

4.7.1.b – Reagentes:

$K_2Cr_2O_7$ – dicromato de potássio (padrão primário)

HCl – ácido clorídrico (concentrado)

$NaHCO_3$ – bicarbonato de sódio (1 mol L^{-1})

KI – iodeto de potássio (1 mol L^{-1})

$Na_2S_2O_3$ ($0,1\text{ mol L}^{-1}$), solução preparada com água recém-destilada e conservada em frasco de vidro âmbar com três gotas de clorofórmio para evitar contaminação microbiana.

Solução indicadora de amido: dissolveu-se 1g de amido em 100 mL sob constante agitação, aqueceu-se até a fervura.

4.7.1.c – Procedimento

Para a padronização adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, 10 mL de solução de KI, 10 mL de solução de $NaHCO_3$ (1 mol L^{-1}) e 3 mL de HCl concentrado; acrescentou-se então 25 mL da solução de $K_2Cr_2O_7$, cobriu-se com vidro relógio e colocou-se o frasco em um local isento de luz para que a reação se processasse por 5 minutos. Essa solução foi titulada com $Na_2S_2O_3$, acrescentando-se a solução indicadora de amido depois do primeiro ponto de viragem, formando uma cor violeta escura, seguindo até o final da titulação onde o ponto de viragem é indicado pela mudança da cor de violeta escuro para verde claro. Para as amostras do ensaio de biolixiviação, seguiu-se o mesmo procedimento acima, porém substituindo o dicromato de potássio pela amostra. Foram retiradas alíquotas de 2ml do sobrenadante dos frascos de biolixiviação e diluídas em ácido nítrico (2%) na concentração 1:1; a partir desta diluição, foram retiradas alíquotas de 1 mL para titulação com tiosulfato de sódio seguindo a metodologia padrão (VOGEL, 1981a).

4.7.2 Determinação de Fe^{3+}

O método foi proposto por Karamanev (2002) e consiste resumidamente em adicionar num balão volumétrico de 100 mL, 3,0 mL do ácido SSA (sulfosalicílico) 10% e 0,1mL de amostra, agitando constantemente por um minuto. Há formação de um complexo vermelho violeta com o

íon Fe^{3+} . O Fe^{3+} foi determinado, respectivamente, em $\lambda = 500 \text{ nm}$, em espectrofotômetro FEMTO 600S.

4.7.3 cisteína

Cloridrato de L- cisteína ($\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$) da Synth foi o aminoácido utilizado em todos os ensaios. As concentrações finais do aminoácido nos frascos de reação foram: (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

4.8 Resíduos sólidos da biolixiviação

Antes de retirar as alíquotas dos frascos de biolixiviação, estes foram submetidos a uma homogeneização, para retirar porcentagens relativamente semelhantes do líquido e dos sólidos. As amostras líquidas foram submetidas às análises descritas nos itens 4.6 e 4.7 e os resíduos sólidos de alguns tratamentos selecionados que apresentaram melhor solubilização do cobre, foram submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e difração de raios X (DRX).

4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras do resíduo do processo de biolixiviação foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura em um equipamento JEOL JSM – T333A Scanning microscope.

Os resíduos foram mantidos em atmosfera de argônio, e para visualização da amostra no equipamento, estes foram fixados em uma fita adesiva dupla face de carbono, e em seguida analisados.

Os minerais não condutores de corrente elétrica para serem analisados no MEV devem ser previamente metalizados. A metalização consiste na precipitação, a vácuo, de uma película micrométrica de material condutor (e.g., ouro ou carbono) sobre a superfície do mineral, possibilitando a condução da corrente elétrica. Essa técnica permite visualizar a atividade corrosiva química e bacteriana que houve nos grãos. A microscopia eletrônica de varredura é

utilizada em várias áreas do conhecimento, incluindo a mineralogia. O uso desta técnica vem se tornando mais freqüente por fornecer informações de detalhe, com aumentos de até 300.000 vezes (REED, 1996).

4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras em pó do resíduo de biolixiviação foram imersas em álcool e submetidas a ultrassom por 3 minutos; à essa mistura foi inserida uma pequena grade de ouro (porta amostra) para “pescar” amostra do mineral residual do ensaio de biolixiviação. Deixou-se secar a temperatura ambiente e em seguida analisou-se em um microscópio eletrônico de transmissão modelo (CM 200 Philips)

4.8.3 Difração de Raios – X

O equipamento utilizado para a obtenção dos difratogramas foi um difratômetro de raios-X D5000 – Siemens, equipado com monocromador no feixe difratado. Em trabalhos anteriores como de BEVILAQUA, (1999), já foram testadas condições ideais para esse tipo de amostra mineral. Foram utilizadas corrente de 30mA e voltagem de 40 KV, linha de base inferior 0,520V, linha de base superior 1.620V, tempo de contagem 2s, passo $0,05^{\circ}$ (ângulo 2θ), fendas 2/2/0,6 e ângulo de varredura de 10 a 70° (2θ).

O porta-amostra utilizado foi de teflon 47mm de diâmetro por 3mm de espessura, apresentando no centro uma cavidade de 15 ou 20 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, destinado a conter a amostra para a análise, pois além de se ajustar ao aparelho utilizado, no mesmo trabalho de Bevilaqua, (1999), este apresentou um pico bem definido em 18° (2θ) ($d=4,90$).

Os resíduos analisados foram provenientes do final do ensaio de biolixiviação de 64 dias, estas amostras sólidas foram secas a temperatura ambiente, dentro de um ependorf, estas por sua vez foram mantidas em atmosfera de argônio e vedadas para posterior análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de respirometria celular com íon ferroso como substrato

A técnica de respirometria celular permite uma avaliação rápida e bastante sensível (ordem de μmol de oxigênio consumido) da oxidação do substrato. Utilizou-se suspensões lavadas de células do *A. ferrooxidans*-LR desacoplada de crescimento, ou seja, devido à ausência de CO_2 as células não estão em processo de divisão. Os testes respirométricos foram realizados com sulfato ferroso na presença de diferentes concentrações do aminoácido cisteína, para avaliar o seu efeito na atividade oxidativa das células, em relação ao seu principal substrato solúvel. As medidas do consumo de oxigênio, obtidas a partir desses ensaios, estão diretamente relacionadas à oxidação do íon Fe^{2+} .

Os resultados obtidos na presença do íon Fe^{2+} como substrato, na presença de cisteína em diferentes concentrações, mostraram os diferentes efeitos da concentração desse aminoácido na oxidação do íon ferroso (Figura 6).

Comparativamente à ausência do aminoácido (Figura 6A), a presença de $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína (Figura 6B) reduziu em cerca de 10 vezes a velocidade inicial de oxidação, além de ter sido reduzido também o consumo total de oxigênio no ensaio, que atingiu valores finais ao redor de $450 \mu\text{L}$, enquanto que nas outras condições testadas esse valor ficou ao redor de $1.200 \mu\text{L}$. A curva obtida nesta condição apresentou característica sigmoideal, diferentemente de todas as outras condições que apresentaram características de hipérbole retangular. Por outro lado, as concentrações de cisteína de 10^{-3} , 10^{-5} e $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, determinaram velocidades iniciais (tabela 2) e consumos finais de oxigênio (acima de $1200 \mu\text{L}$) maiores que no controle sem cisteína.

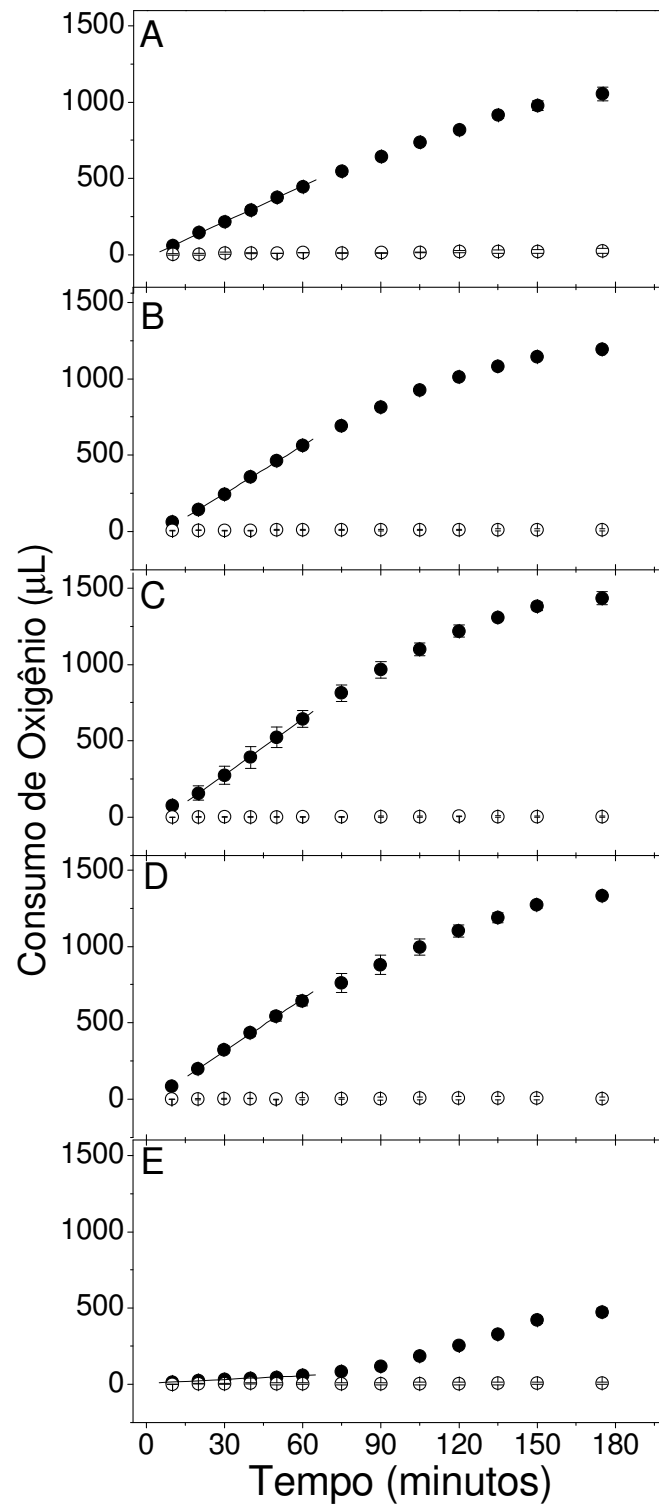


Figura 6 – Atividade respiratória do *A. ferrooxidans*-LR (150 µg de proteína total), em sulfato ferroso na presença de diversas concentrações de cisteína (mol L⁻¹). (A) sem adição do aminoácido; (B) 10⁻⁷; (C) 10⁻⁵; (D) 10⁻³; (E) 10⁻¹. Símbolos: inoculado (●); controle (○). O desvio padrão está indicado pelas barras.

Tabela 2 – Valores referentes às velocidades iniciais (V_0) do ensaio de respirometria celular na presença de diferentes concentrações de cisteína e utilizando o íon ferroso como substrato.

Variável	Concentração de cisteína	$V_0 = \mu\text{L min}^{-1}/\text{mg}$ proteína total (*)
A	Sem cisteína	52,12 (r = 0,999)
B	10^{-7} mol L ⁻¹	70,18 (r = 0,999)
C	10^{-5} mol L ⁻¹	81,22 (r = 0,999)
D	10^{-3} mol L ⁻¹	76,22 (r = 0,999)
E	10^{-1} mol L ⁻¹	5,59 (r = 0,986)

* Os valores de V_0 foram calculados pelas tangentes das curvas obtidas na figura 6 com os respectivos valores de r.

5.2 Ensaio de respirometria celular com calcopirita como substrato

Como descrito no item 4.5, o ensaio de respirometria celular teve como objetivo permitir uma avaliação rápida e bastante sensível da oxidação da calcopirita como substrato para o *A. ferrooxidans*-LR e o efeito da cisteína nessa oxidação.

Utilizou-se 0,1g da calcopirita em tampão glicina (pH 2,2), uma vez que na presença desse tampão o pH se mantém estável ao redor desse valor, pois em estudos realizados por Bevilaqua (1999), foi observado que na ausência do tampão os valores de pH aumentaram para cerca de 4,5, valor esse que pode inibir a atividade oxidativa bacteriana, pois o valor ótimo dessa espécie se encontra em torno de 2,0.

Na literatura não foram encontradas referências que pudessem ser utilizadas para fins comparativos com os resultados obtidos dos ensaios respirométricos com calcopirita e diferentes concentrações de cisteína; no entanto, já é bem difundido na literatura (AHONEN; TUOVINEN, 1993; BEVILAQUA, 1999; SHRIHARDI, *et al.*, 1991; KINGMA; SILVER, 1990) que esse sulfeto de cobre e ferro pode ser usado diretamente pelo *A. ferrooxidans* como substrato energético.

Pôde-se observar que o consumo de oxigênio obtido neste ensaio (Figura 7), para as diferentes concentrações de cisteína apresentou, em geral, comportamento semelhante, destacando-se a cisteína na concentração de 10^{-5} mol L⁻¹ (Figura 7C).

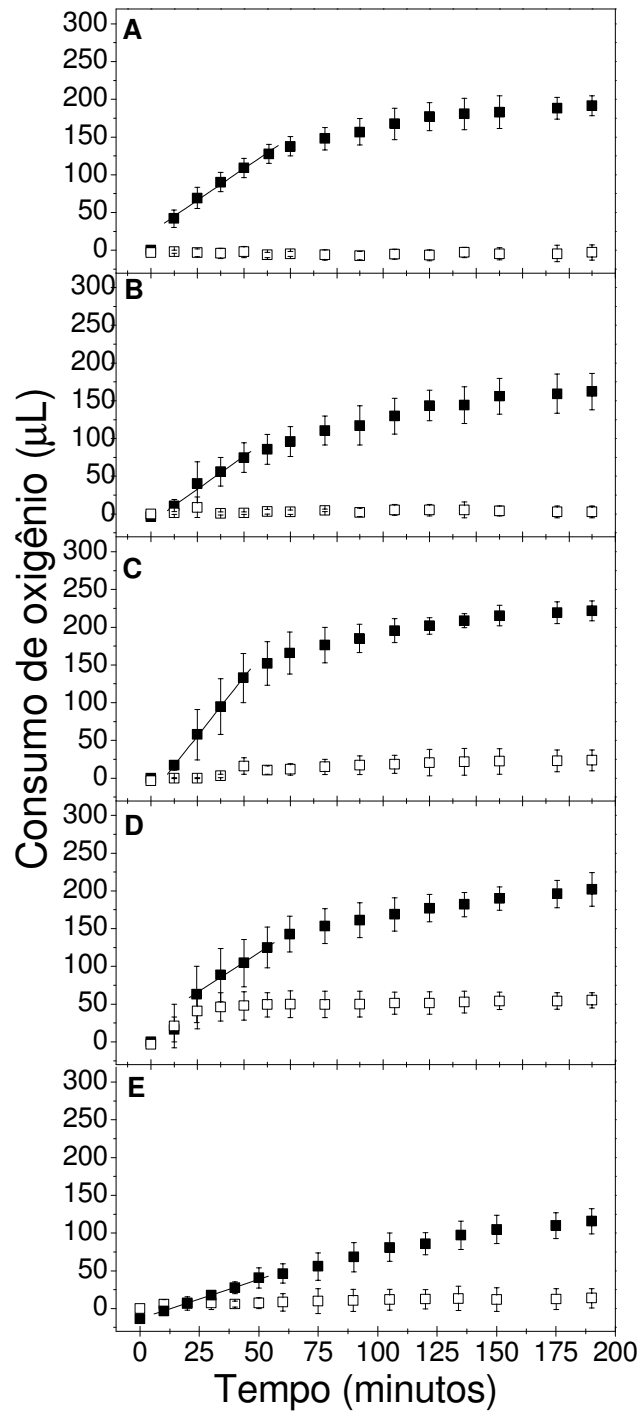


Figura 7 - Atividade respiratória do *A. ferrooxidans*-LR (150 µg de proteína total), em 0.1g de calcopirita como substrato oxidável em tampão glicina pH 2.2 na presença de diversas concentrações de cisteína (mol L⁻¹). (A) sem adição do aminoácido; (B) 10⁻⁷; (C) 10⁻⁵; (D) 10⁻³; (E) 10⁻¹. Símbolos: inoculado (■); controle (□). O desvio padrão está indicado pelas barras.

Nesta condição, foi observada a maior velocidade inicial de oxidação da calcopirita (cerca do dobro) em relação ao controle e as outras concentrações de cisteína (tabela 3) e também um consumo final de oxigênio maior (em torno de 225 μ L), porém, não muito significativo. Assim como nos resultados da respirometria do íon ferroso (Figura 6E), a calcopirita na presença de cisteína 10⁻¹ mol L⁻¹ também demonstrou inibição da atividade celular (Figura 7E) apresentando valores finais de consumo de oxigênio em torno de 110 μ L.

Vale ressaltar que nos controles abióticos praticamente não se detectou oxidação da calcopirita, conforme também demonstrado por Bevilaqua (1999).

Tabela 3 – Valores referentes às velocidades iniciais (V_0) do ensaio de respirometria celular na presença de diferentes concentrações de cisteína e utilizando a calcopirita como substrato.

Variável	Concentração de cisteína	$V_0 = \mu\text{L. min}^{-1} / \text{mg proteína total (*)}$
A	Sem cisteína	13,93 (r = 0,996)
B	10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	13,4 (r = 0,996)
C	10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	26,0 (r = 0,999)
D	10 ⁻³ mol L ⁻¹	13,2 (r = 0,997)
E	10 ⁻¹ mol L ⁻¹	6,31(r = 0,999)

* Os valores de V_0 foram calculados pelas tangentes das curvas obtidas na figura 7 com os respectivos valores de r .

5.3 Estudos de crescimento na presença de Fe²⁺

Além desse estudo metabólico de respirometria do efeito da cisteína na oxidação do Fe²⁺ e da calcopirita, foram realizados, também, ensaios preliminares de crescimento do *A. ferrooxidans*-LR utilizando o íon ferroso como substrato e na presença de diferentes concentrações do aminoácido cisteína, objetivando avaliar o efeito da cisteína no crescimento celular. A avaliação do crescimento foi realizada pela oxidação do íon ferroso durante o ensaio.

O *A. ferrooxidans*-LR na ausência da cisteína apresenta atividade metabólica normal com a oxidação completa do íon ferroso em aproximadamente 48 horas (Figura 8A). No entanto, a

presença da concentração mais elevada de cisteína utilizada nesse estudo (10^{-1} mol L⁻¹), como se pode observar na Figura 8E, determinou uma inibição significativa da atividade bacteriana, atingindo no máximo cerca de 50% de oxidação do Fe²⁺ durante o período que o ensaio foi realizado. As demais concentrações utilizadas (10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7}) não provocaram inibição ou aumento significativo na atividade de oxidação do substrato pela bactéria, conforme pode ser visto pelas figuras 8B, C e D.

Rojas-Chapana e Tributsch (2000), também observaram em seus estudos, apesar de ser utilizada a pirita e não a calcopirita, que concentrações maiores que 10^{-3} de cisteína inibiram a atividade bacteriana e abaixo disso, como a 10^{-5} mol L⁻¹, melhoram o processo dissolutivo. De qualquer forma, a ação da cisteína na oxidação de sulfetos pelo *A. ferrooxidans* obedece, provavelmente, a um padrão semelhante.

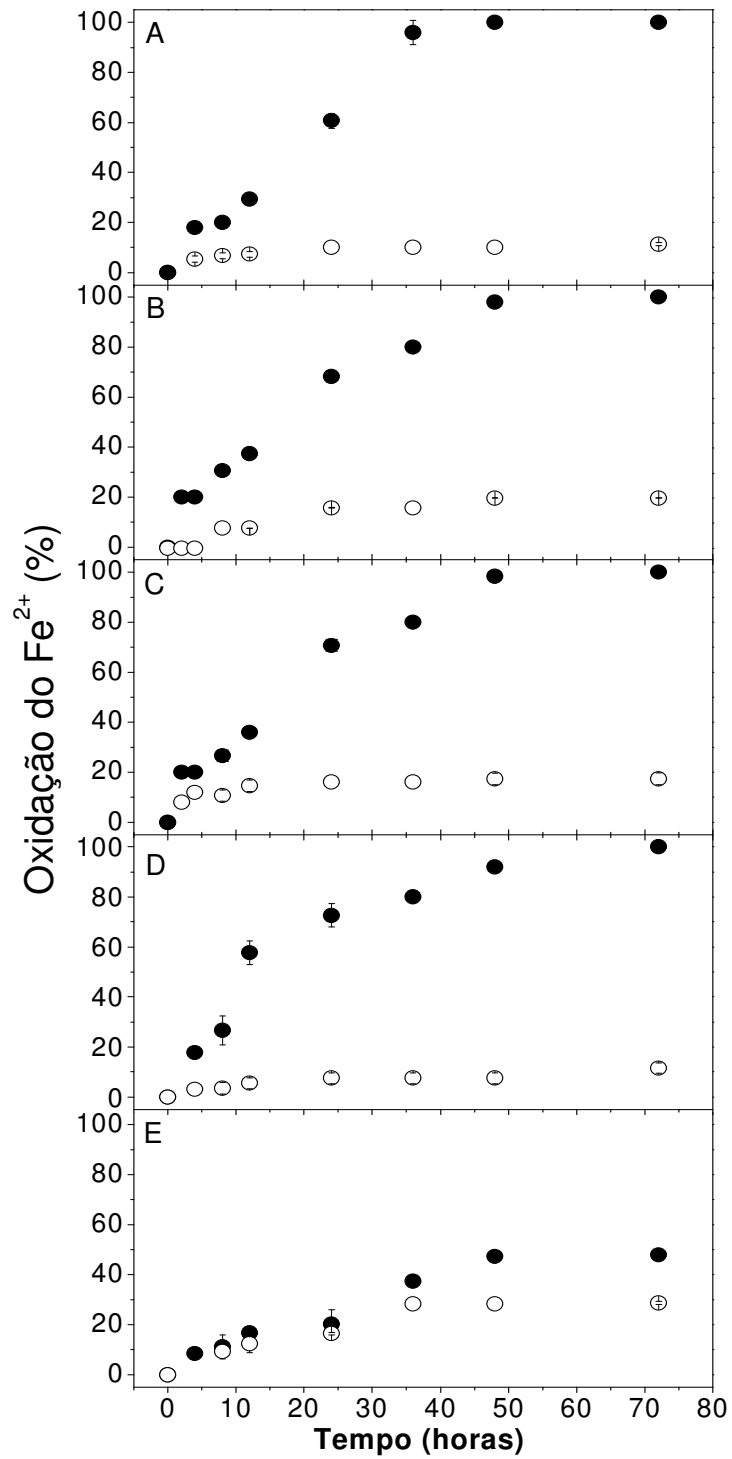


Figura 8 – Curva de oxidação do íon ferroso pelo *A. ferrooxidans*-LR na presença de diferentes concentrações de cisteína (mol L^{-1}). (A) sem adição do aminoácido; (B) 10^{-7} ; (C) 10^{-5} ; (D) 10^{-3} ; (E) 10^{-1} . Símbolos: inoculado (\bullet); controle (\circ).

5.4 Ensaios de biolixiviação

Em relação aos ensaios de biolixiviação, foi avaliada a influência das seguintes variáveis no processo de dissolução da calcopirita: a) inóculo de *A. ferrooxidans*-LR, previamente adaptado ao crescimento no sulfeto calcopirita ou não adaptado; b) efeito das concentrações de zero, 10^{-3} e 10^{-5} mol L⁻¹ de cisteína; c) efeito da presença ou não da linhagem *A. thiooxidans*-FG01. Essas variáveis foram estudadas utilizando-se os parâmetros físico-químicos como descrito no ítem 4.7, pois, normalmente em um sistema de biolixiviação, o pH, o potencial de óxido-redução (Eh), e a oxidação do íon ferroso são fundamentais no processo e são indicativos da atividade bacteriana.

A prévia adaptação da bactéria para o crescimento na presença do sulfeto em estudo pode determinar taxas iniciais de dissolução do sulfeto mais elevadas representando, assim, um procedimento que poderá influir no tempo total do processo. As concentrações de cisteína no seio do sistema de reação utilizadas nesses ensaios, foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos estudos de respirometria e de crescimento do *A. ferrooxidans*-LR, os quais apresentaram melhores desempenhos da atividade bacteriana nas concentrações de 10^{-3} e 10^{-5} mol L⁻¹ de cisteína. Finalmente, a presença do *A. thiooxidans*, uma espécie altamente eficiente na oxidação do enxofre elementar e geração de ácido sulfúrico (em geral o pH das culturas dessa espécie situam-se abaixo de 1,0), também poderá ser importante no processo por aumentar a acidez pois, conforme já discutido, a presença de camadas passivadoras de enxofre ou de jarositas inibe a oxidação da calcopirita.

5.4.1 pH/Eh

A elevação ou diminuição dos valores de pH em sistemas de biolixiviação pode indicar, respectivamente, o consumo de ácido pela amostra mineral ou a geração do mesmo através das reações bacterianas de oxidação do sulfeto. O valor de (Eh) de uma solução é a medida da tendência desta solução de ser oxidada ou reduzida, isto é, sua habilidade de capturar ou liberar elétrons. Na presença da bactéria, o potencial da solução é determinado em função da razão dos íons Fe³⁺/Fe²⁺ (Bevilaqua, 1999).

Os resultados da variação de pH e do potencial de óxido-redução no período dos ensaios de biolixiviação da calcopirita, nas várias condições testadas, podem ser observados nas Figuras 9,

10, 11, 12 e 13. As figuras 9 e 10 referem-se a esses parâmetros nos cultivos de *A. ferrooxidans*-LR (Figura 9) não adaptada ou previamente adaptada ao crescimento em calcopirita (Figura 10). Em ambos os cultivos, foi utilizada a cisteína nas concentrações (mol L^{-1}) de zero (controle) (A), 10^{-3} (B) e 10^{-5} (C).

Os valores de pH, em ambas as condições, apresentaram uma pequena elevação nos primeiros dias de ensaio, ultrapassando, em geral, o valor de 2,5. Foi então necessária a correção desses valores com ácido sulfúrico concentrado para 1,8. Após essas correções, os valores de pH se mantiveram praticamente estabilizados ao redor de 1,5 ao longo dos ensaios (64 dias). Apesar de um dos cultivos de *A. ferrooxidans*-LR ter sido previamente adaptado (Figuras 10A, B e C), não se nota diferenças significativas nos valores de pH quando comparado com células não adaptadas (Figuras 9A, B e C). Em relação aos controles abióticos, nota-se uma tendência dos valores de pH dos cultivos inoculados serem ligeiramente inferiores, porém não muito significativos. A adição de cisteína nas duas concentrações testadas, também não provocou qualquer alteração significativa no comportamento dos valores de pH, independente da adaptação ou não da bactéria à calcopirita.

Em relação aos valores do potencial de óxido-redução obtidos nos ensaios, pode-se observar pelas mesmas figuras 9 e 10, que a prévia adaptação da bactéria não determinou alterações significativas, tanto em termos da cinética como também dos valores finais, os quais situaram-se ligeiramente acima de 500 mV. Como diferença significativa deve-se salientar os valores de potencial nos frascos abióticos, os quais não ultrapassaram 380 mV nas condições testadas, evidenciando dessa forma a ação oxidativa bacteriana sobre o mineral. Em relação à adição de cisteína, pode-se notar que na concentração de 10^{-3} nos tratamentos inoculados (Figuras 9B e 10B), houve um rápido aumento dos valores de potencial nos primeiros dias de incubação. Entretanto, nos controles sem cisteína (Figuras 9A e 10A) apesar de uma taxa inicial mais lenta, houve um progressivo aumento e após alguns dias esses valores foram semelhantes àqueles dos tratamentos com a cisteína $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de 10^{-5} , não apresentou melhora significativa no processo oxidativo.

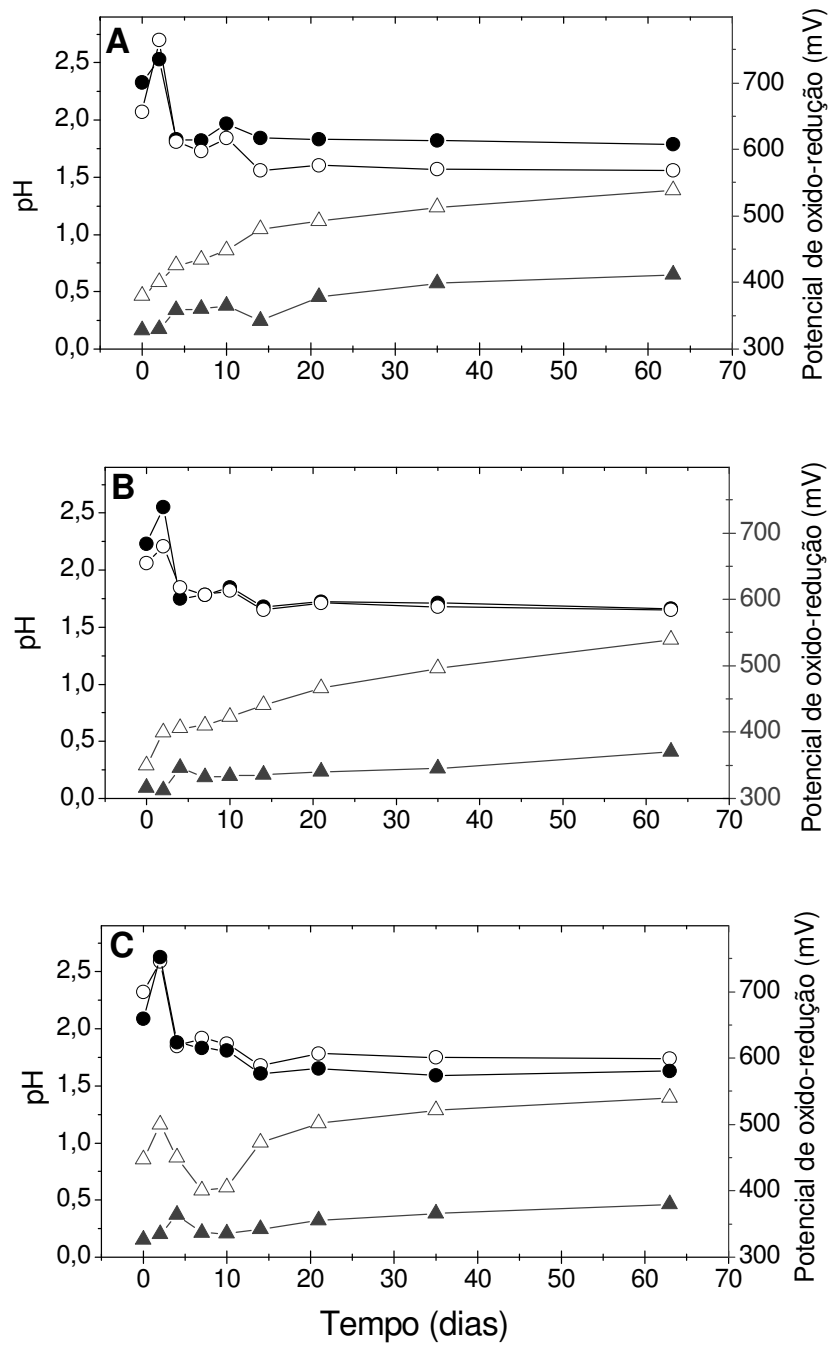


Figura 9 - Variação do potencial de óxido-redução (Δ) e pH (\circ) nos tratamentos inoculados (símbolos vazios) e controles abióticos (símbolos cheios) no experimento de biolixiviação da calcopirita (2,5% m/v) por *A. ferrooxidans*-LR sem adaptação à calcopirita. (A) sem cisteína, (B) cisteína 10^{-3} mol L⁻¹, (C) cisteína 10^{-5} mol L⁻¹.

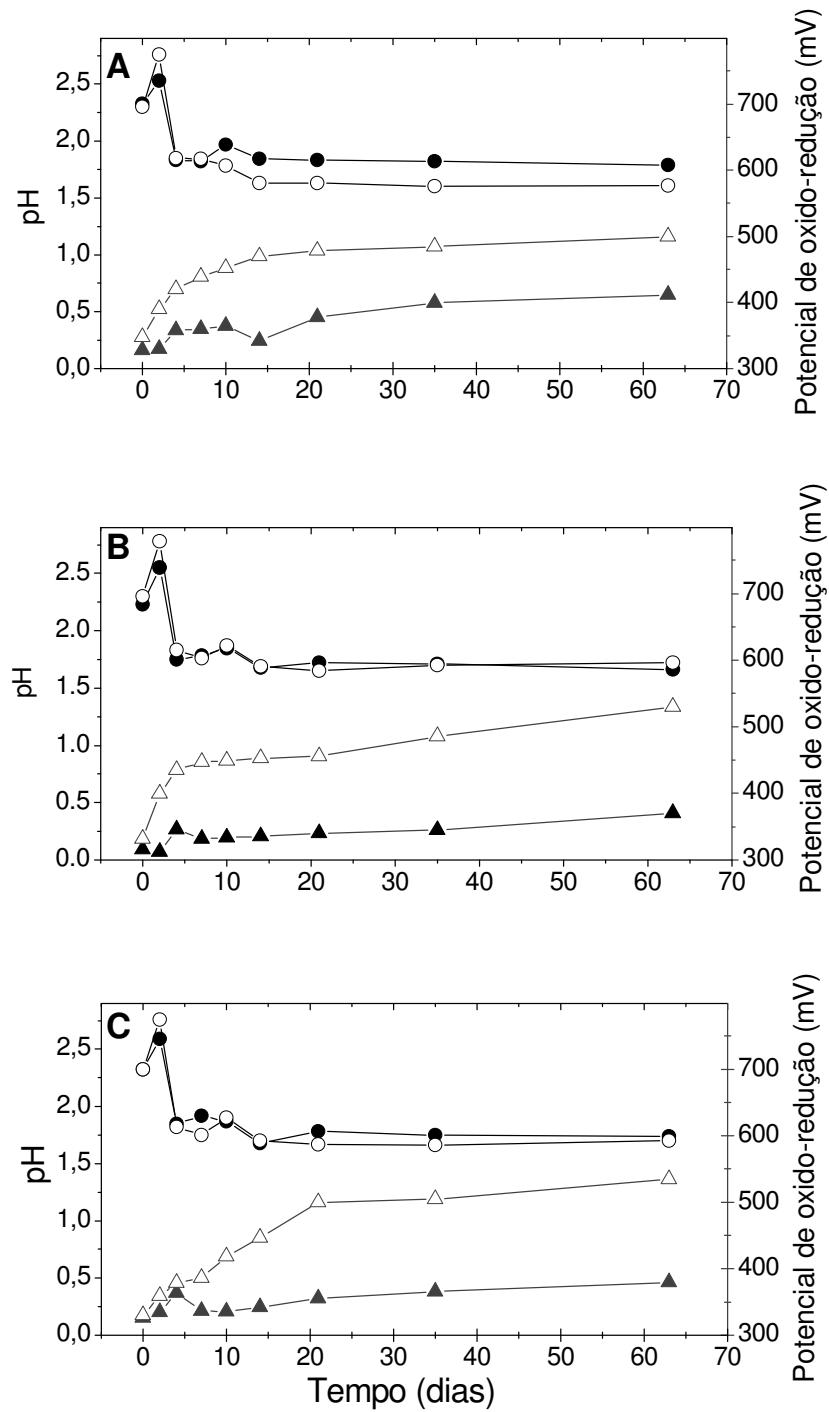


Figura 10 - Variação do potencial de óxido-redução (Δ) e pH (\circ) nos tratamentos inoculados (símbolos vazios) e controles abióticos (símbolos cheios) no experimento de biolixiviação da calcopirita (2,5% m/v) por *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptada à calcopirita. (A) sem cisteína, (B) cisteína 10^{-3} mol L⁻¹, (C) cisteína 10^{-5} mol L⁻¹.

As figuras 11 e 12 apresentam os resultados de pH e potencial de óxido-redução nos cultivos de *A. ferrooxidans*-LR (adaptada e não adaptada) na presença das mesmas concentrações de cisteína e com a adição da espécie enxofre oxidante *A. thiooxidans*, linhagem FG01. Algumas poucas diferenças podem ser notadas por essas figuras em relação aos cultivos sem a presença dessa última espécie (figuras 9 e 10). Os valores de pH inicial dos frascos inoculados apresentaram uma elevação menor em relação aos ensaios anteriores devido, provavelmente, à adição do inóculo de *A. thiooxidans*-FG01 o qual foi cultivado em meio contendo enxofre como fonte de energia; nesse meio, o valor do pH final da cultura (usada como inóculo) foi próximo de 0,5 o que determinou um pH no dia zero próximo a 1,7. De qualquer forma tanto a cinética como os valores finais de pH foram muito semelhantes àqueles obtidos na ausência do *A. thiooxidans*-FG01. Além disso, tanto a prévia adaptação como a presença de cisteína, também não determinaram nenhuma diferença significativa em relação às culturas puras de *A. ferrooxidans*-LR, com ou sem adaptação e com ou sem cisteína.

Em relação ao potencial de óxido-redução pode-se observar pelas figuras 11 e 12 que diferentemente dos ensaios anteriores (Figuras 9 e 10), sobretudo na presença de 10^{-3} mol L⁻¹ de cisteína, que a elevação dos valores iniciais nos frascos inoculados de cerca de 350 mV para 500 mV, somente ocorreu após aproximadamente 30 dias de ensaio, enquanto que na ausência do *A. thiooxidans*-FG01, essa elevação é muitíssimo mais rápida. Obviamente nos controles abióticos o potencial manteve-se estável abaixo dos 400 mV durante todo o ensaio. Novamente, esse parâmetro não indicou diferenças significativas entre adaptação ou não e presença ou não de cisteína. A cinética mais lenta na elevação do potencial nos cultivos de *A. ferrooxidans*-LR na presença do *A. thiooxidans*-FG01, provavelmente decorreu de uma possível competição pelo substrato (calcopirita) entre as espécies. Primeiramente deve ser considerado que o inóculo do *A. thiooxidans*-FG01 (5% v/v) apresenta muito mais células que o inóculo do *A. ferrooxidans*-LR (também 5% v/v), pois a primeira espécie é cultivada em enxofre e a oxidação deste a sulfato envolve seis elétrons, enquanto que a oxidação do íon ferroso para o férrico pela segunda, envolve apenas um elétron, fato esse que proporciona muito mais ATP para as reações de fixação de CO₂ e assim maior biomassa no *A. thiooxidans*-FG01. Essa maior biomassa deve aderir-se à calcopirita sem, contudo, oxidá-la, e assim diminuir a disponibilidade do substrato para o *A. ferrooxidans*-LR.

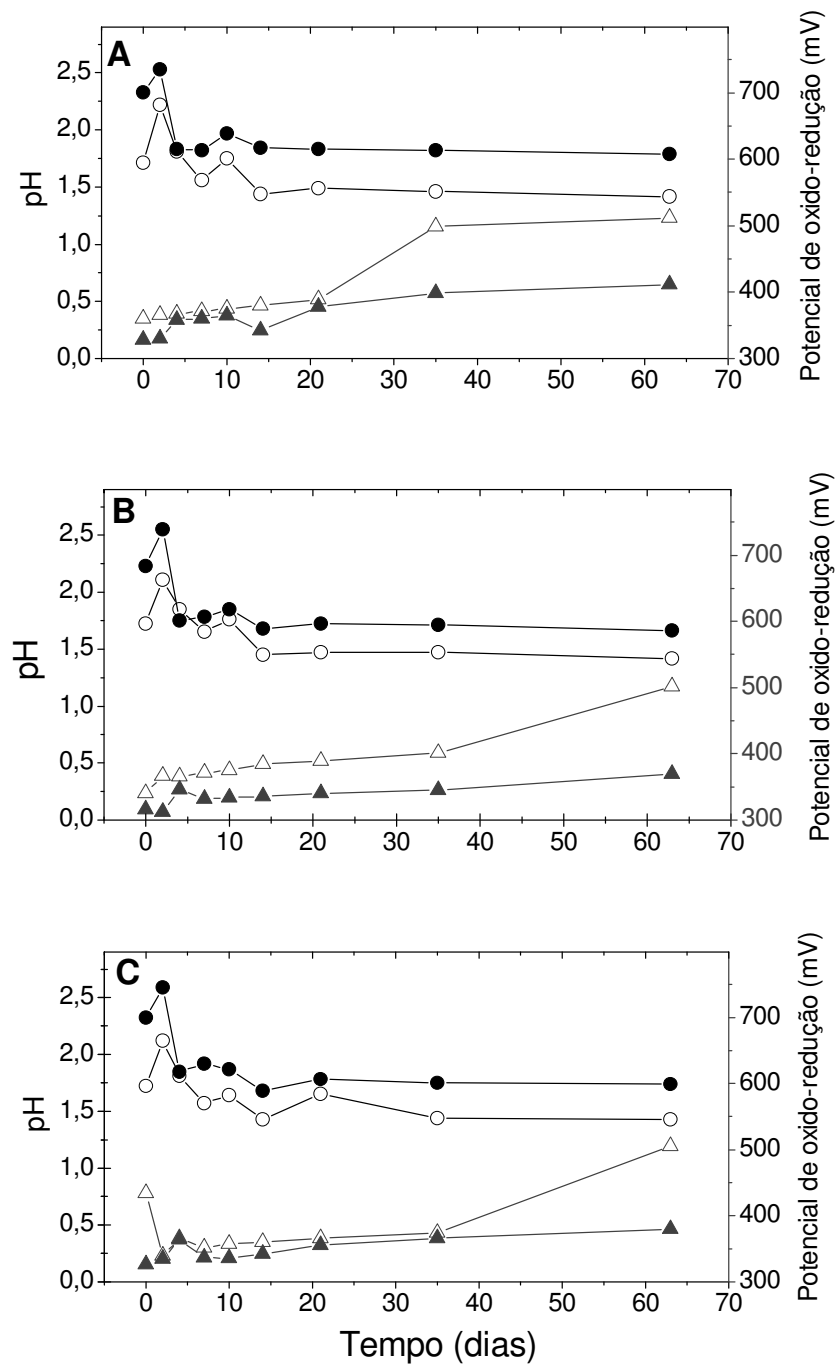


Figura 11 - Variação do potencial de óxido-redução (Δ) e pH (\circ) nos tratamentos inoculados (símbolos vazios) e controles abióticos (símbolos cheios) no experimento de biolixiviação da calcopirita (2,5% m/v) por *A. ferrooxidans*-LR sem adaptação à calcopirita e na presença de *A. thiooxidans*-FG01. (A) sem cisteína, (B) cisteína 10^{-3} mol L⁻¹, (C) cisteína 10^{-5} mol L⁻¹.

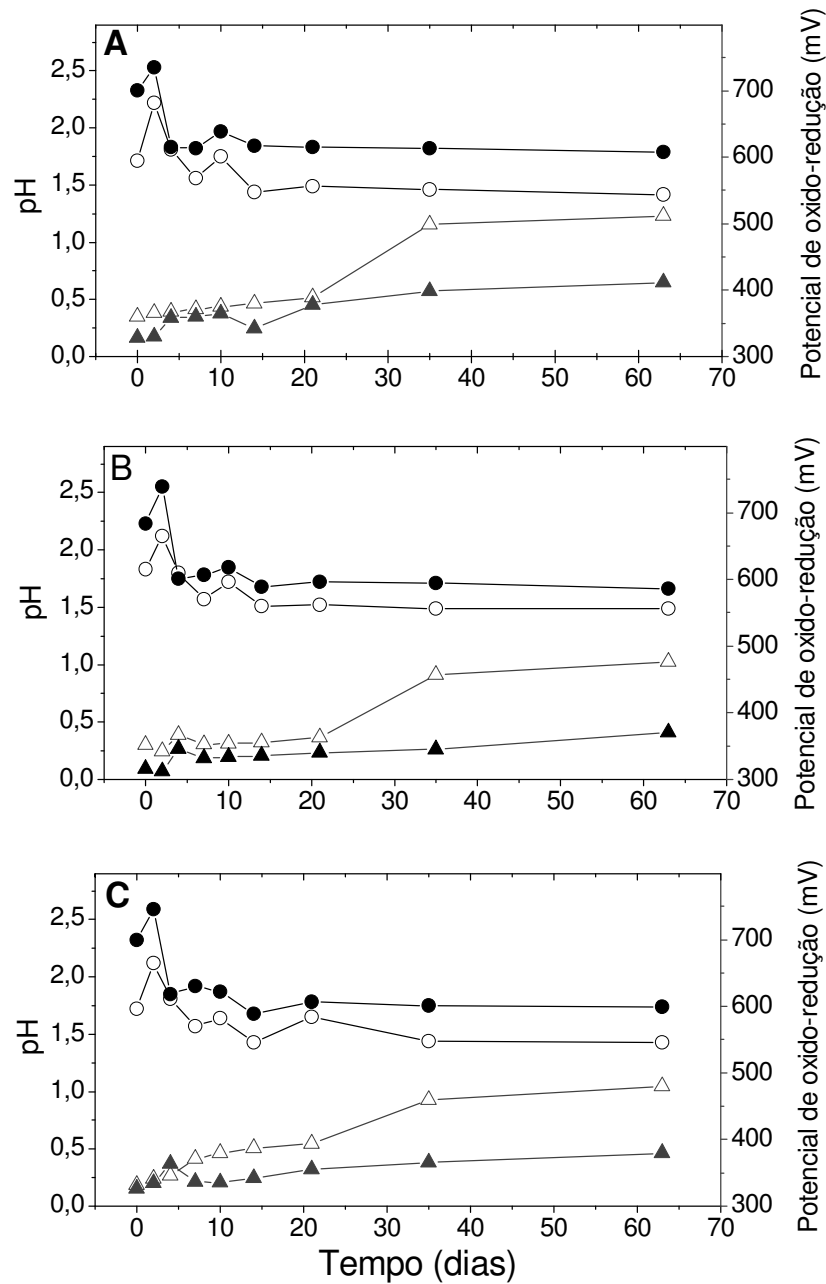


Figura 12 - Variação do potencial de óxido-redução (Δ) e pH (\circ) nos tratamentos inoculados (símbolos vazios) e controles abióticos (símbolos cheios) no experimento de biolixiviação da calcopirita (2,5% m/v) por *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptada à calcopirita e na presença de *A. thiooxidans*-FG01. (A) sem cisteína, (B) cisteína 10^{-3} mol L⁻¹, (C) cisteína 10^{-5} mol L⁻¹.

Foi também realizado um ensaio de biolixiviação da calcopirita no qual utilizou-se somente o *A. thiooxidans*-FG01, também na presença de cisteína. Os valores de pH obtidos (resultados não mostrados) foram semelhantes aos resultados apresentados anteriormente, isto é, estabilizou-se após alguns dias em cerca de 1,6. Em relação ao potencial os valores situaram-se abaixo de 400 mV durante todo o período do ensaio (resultados não mostrados), como já esperado pois essa espécie não oxida sulfetos minerais, conforme também demonstrado por Bevilaqua *et al.* (2002) e Quiu *et al.* (2005).

5.4.2 Fe³⁺

Outro parâmetro de fundamental importância no acompanhamento do processo de biolixiviação é a presença do íon férrico, pois este além de sua propriedade de oxidante dos sulfetos minerais indica, sobretudo, a atividade de bactérias ferro oxidante, como o *A. ferrooxidans* e o *L. ferrooxidans*. Pode-se observar pela tabela 4 que as concentrações obtidas ao longo do ensaio não foram muito altas, independente da condição estabelecida. Como mencionado em materiais e métodos, em nenhuma condição foi adicionada a fonte de energia (Fe²⁺) e assim o aparecimento do íon férrico, somente após 20 dias, decorreu apenas da oxidação da calcopirita pela bactéria ou pelas condições ácidas da solução lixiviante.

Tabela 4 – Concentração do Fe³⁺ (mmol L⁻¹) do ensaio de biolixiviação da calcopirita na presença de diferentes concentrações de cisteína por *A. ferrooxidans*-LR, adaptada ou não ao crescimento prévio nesse sulfeto e na presença ou não do *A. thiooxidans*-FG01.

DIAS	21			35			64			
	cisteína (mol L ⁻¹)	Zero	10 ⁻³	10 ⁻⁵	Zero	10 ⁻³	10 ⁻⁵	Zero	10 ⁻³	10 ⁻⁵
AF (NA)		24	24	24	19	32	24	19	32	16
AF (A)		16	24	24	19	24	16	19	24	16
AF (NA) + AT		7	24	10	7	10	6	7	10	6
AF (A) + AT		12	16	12	12	10	10	10	10	6
AT		9	8	6	9	16	5	9	16	5
Controles abióticos		0	5	4	5	4	5	3	5	5

AF = *A. ferrooxidans*-LR; AT = *A. thiooxidans*-FG01; NA = não adaptado; A = Adaptado

Na presença do *A. ferrooxidans*-LR, previamente adaptado ou não, obteve-se as concentrações mais elevadas do íon férrico (entre 15 e 30 mmol L⁻¹) o que determinou os potenciais de óxido-redução mais elevados dos ensaios. A presença de cisteína também não determinou diferenças significativas nesse parâmetro avaliado e a presença do *A. thiooxidans*-FG01, a exemplo dos valores de potencial, aparentemente inibiu a atividade do *A. ferrooxidans*-LR pelas possíveis razões já discutidas e, assim, a concentração do Fe³⁺ foi inferior aos cultivos puros dessa última espécie. O íon ferroso também foi acompanhado, porém em qualquer dos tratamentos sua concentração ficou abaixo do limite de detecção pela titulação redox. Em relação ao *A. thiooxidans*-FG01 e aos controles abióticos, como já era esperado, as concentrações de Fe³⁺ no meio foram bem inferiores aos demais tratamentos.

5.4.3 Solubilização do íon Cu²⁺

Tem sido demonstrado que uma adaptação prévia da bactéria ao sulfeto mineral pode exercer um importante papel no aumento das taxas de solubilização dos íons metálicos, pois nesse processo as proteínas da parede celular bacteriana e seu metabolismo vão sendo modificados para adaptar-se a um novo ambiente e garantir a sobrevivência da espécie (ELZEKY; ATTIA, 1995).

A utilização de culturas mistas de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* são exemplos de consórcios que desenvolvem um importante papel nos processos de solubilização dos sulfetos metálicos principalmente por requererem fontes energéticas distintas. Experimentos de Qiu *et al.* (2005), mostraram que essas culturas mistas aumentaram o potencial de extração do cobre em relação à utilização de culturas puras.

Por outro lado, Wang *et al.* (2006) estudaram a biolixiviação da marmatita [(ZnFe)S] em frascos agitados utilizando o *A. ferrooxidans* e o *A. thiooxidans* e perceberam que utilizando diferentes tipos de linhagens pode-se obter, também, diferentes graus de oxidação. Na presença somente do *A. ferrooxidans* a atividade oxidativa foi relativamente mais rápida que utilizando duas espécies juntas; de qualquer forma as duas culturas juntas atingiram a mesma porcentagem de biolixiviação, mas a cinética foi mais lenta.

No presente trabalho, a utilização conjunta de ambas as espécies não confirmou tais resultados da eficiência desse consórcio, pois os melhores desempenhos na solubilização do

cobre foram nos ensaios utilizando cultivo puro, conforme pode ser visto nas figuras 13 e 14, as quais mostram a evolução da concentração do cobre durante o período de realização dos ensaios de biolixiviação da calcopirita, por cultura pura de *A. ferrooxidans*-LR (figura 13) e na presença de *A. thiooxidans*-FG01 (figura 14).

Se por um lado a utilização do consórcio não indicou os resultados mencionados na literatura, a prévia adaptação da bactéria no meio contendo calcopirita parece ter proporcionado um resultado interessante, pois nessa condição ocorre um aumento significativo da concentração de cobre após cerca de 20 dias de incubação. A figura 13 (A1, A2 e A3) se refere às curvas de solubilização do cobre por *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptada, nas concentrações de cisteína de zero, 10^{-3} e 10^{-5} mol L⁻¹, respectivamente, enquanto a mesma figura, porém na série B1, B2 e B3, mostram os resultados da cultura não adaptada previamente. Como pode ser visto, nos cultivos com a linhagem adaptada na ausência ou presença de 10^{-3} mol L⁻¹ de cisteína (figura 13, A1 e A2) a concentração final do cobre atinge cerca de 30 mmol L⁻¹, enquanto que na cultura não adaptada essa concentração foi de aproximadamente 20 mmol L⁻¹, o que representa algo em torno de 45% a mais de cobre lixiviado. Uma pequena diferença em relação à ausência de cisteína e a presença de 10^{-3} mol L⁻¹ (Figura 13, A1 e A2) respectivamente, pode ser observada, porém sem uma significância maior. Por outro lado, nos controles abióticos desse mesmo ensaio houve uma solubilização rápida de cobre no início, da mesma forma que nos inoculados, e que provavelmente foi determinada pelo ataque ácido. Após esse período, a concentração do cobre estabilizou-se em torno dos 10 mmol L⁻¹, representando 1/3 da solubilização determinada pela cultura adaptada.

A figura 14 (A e B) ilustra os resultados obtidos no ensaio de biolixiviação da calcopirita pelo consórcio *A. ferrooxidans*-LR - *A. thiooxidans*-FG01. Como mencionado acima, a solubilização do cobre foi inferior ao do cultivo puro, tendo atingido um valor abaixo de 20 mmol L⁻¹, independente da presença da cisteína. As considerações feitas anteriormente sobre uma possível passivação da superfície da calcopirita, devido à adesão das células do *A. thiooxidans*-FG01, parecem também ser válidas para esse parâmetro analisado.

Como esperado, a solubilização do cobre no experimento de biolixiviação da calcopirita pela cultura pura de *A. thiooxidans*-FG01 apresentou resultados semelhantes ao dos controles abióticos (figura 15, A, B e C) situando-se bem aquém das solubilizações da cultura adaptada de *A. ferrooxidans*-LR.

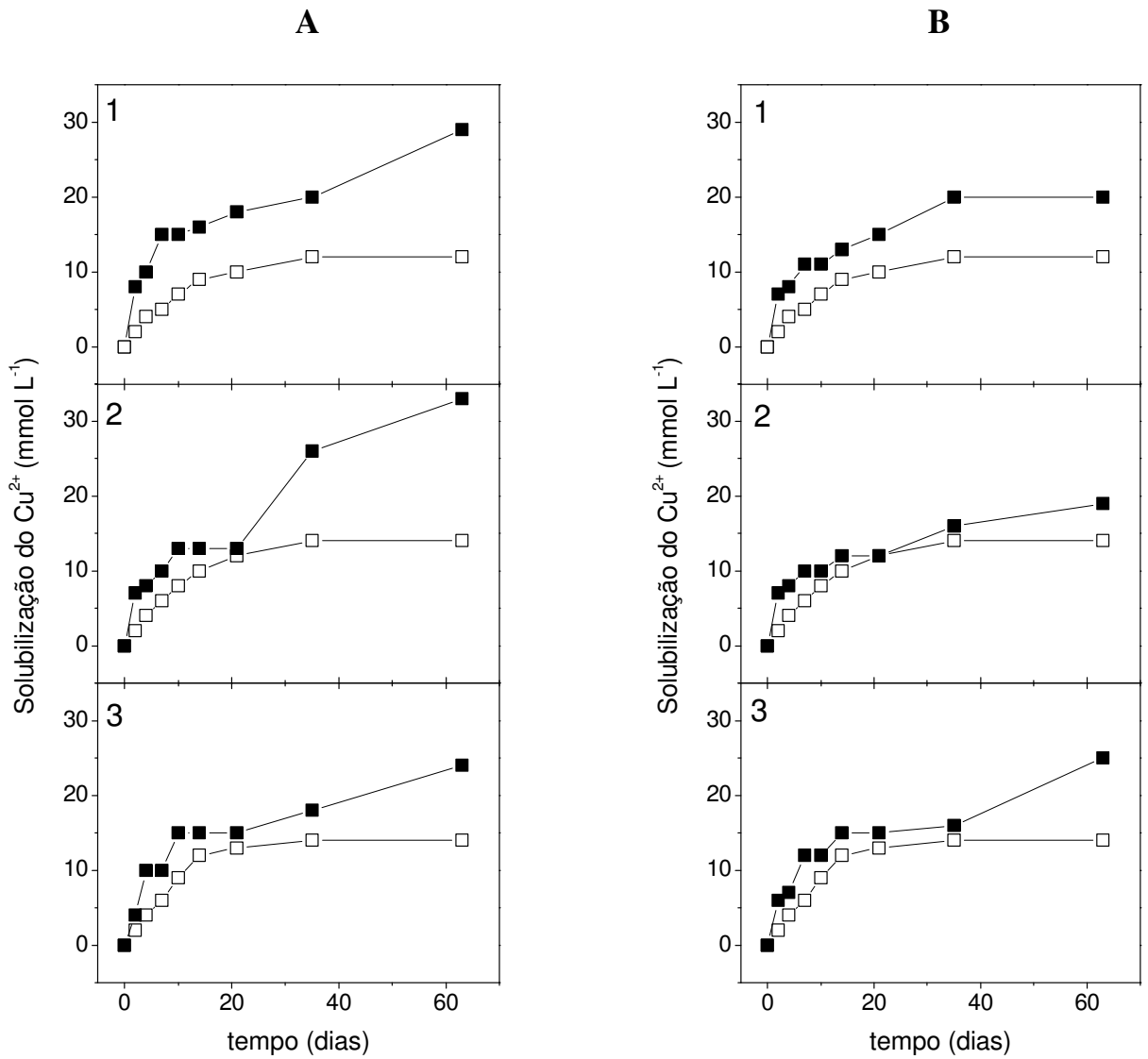


Figura 43 – Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita por *A. ferrooxidans*-LR. (A) - adaptadas e (B) - sem adaptação. Símbolos: (■) inoculados; (□) controles abióticos. 1 (sem cisteína), 2 (cisteína 10^{-3} mol L^{-1}), 3 (cisteína 10^{-5} mol L^{-1}).

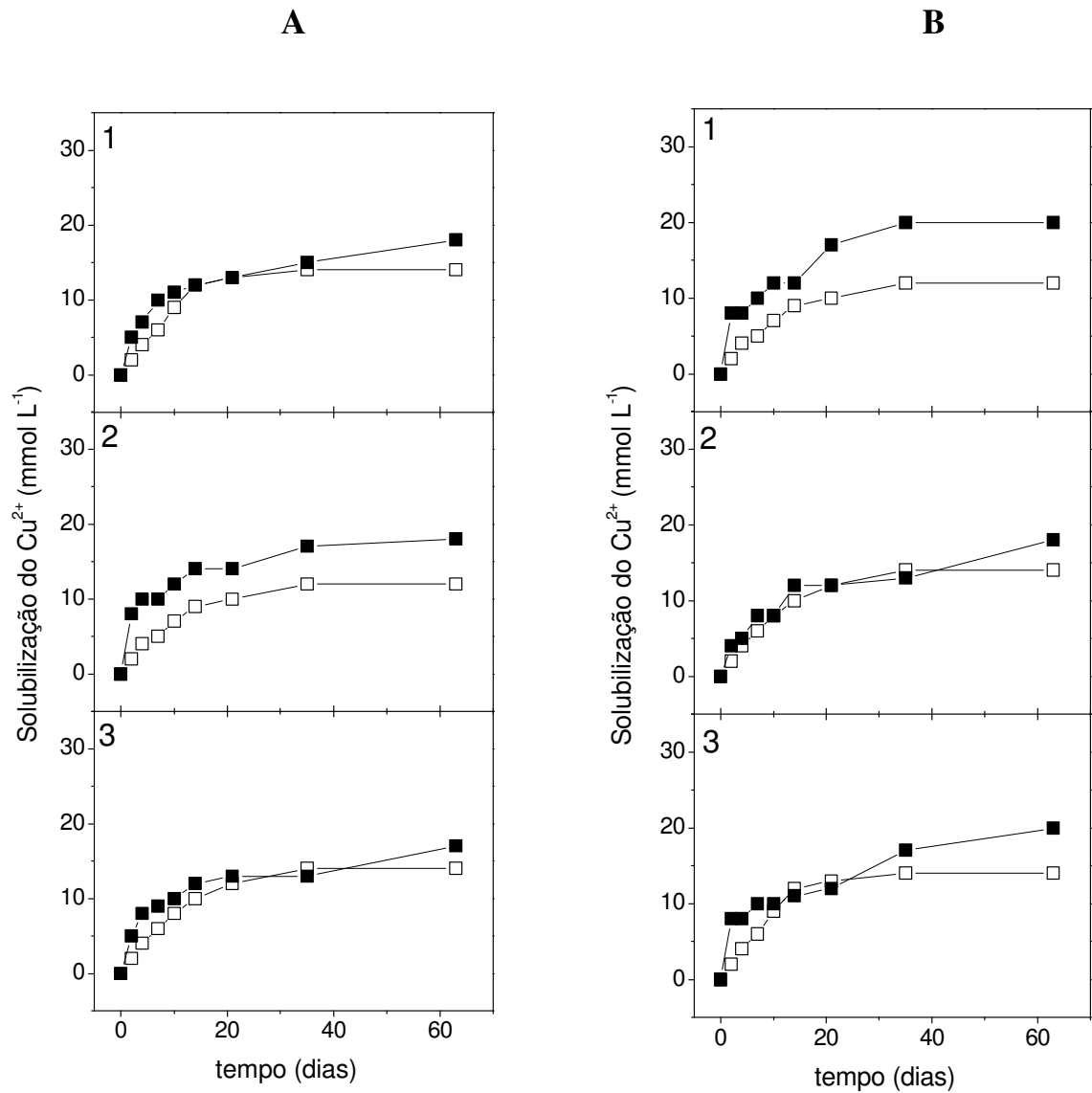


Figura 14 - Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita por *A. ferrooxidans*-LR, na presença de *A. thiooxidans*-FG01. (A) - adaptadas e (B) - sem adaptação. Símbolos: (■) inoculados; (□) controles abióticos. 1 (sem cisteína), 2 (cisteína 10^{-3} mol L^{-1}), 3 (cisteína 10^{-5} mol L^{-1}).

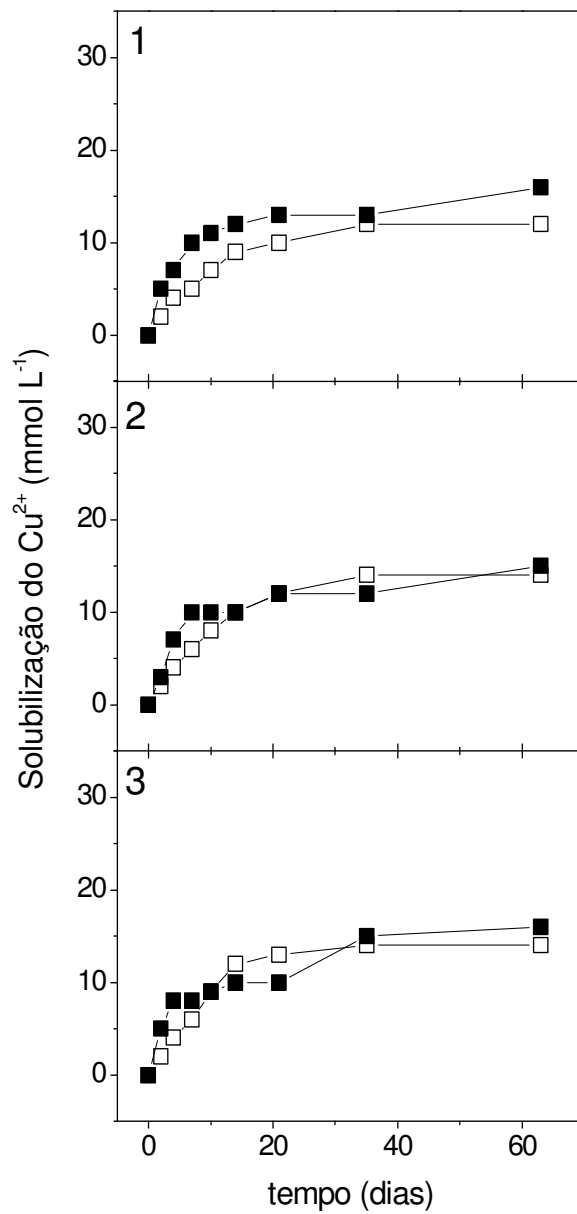


Figura 15 – Variação da concentração do cobre no ensaio de biolixiviação de calcopirita por *A. thiooxidans*-FG01. Símbolos: (■) inoculados; (□) controles abióticos. **1** (sem cisteína), **2** (cisteína 10^{-3} Mol L⁻¹), **3** (cisteína 10^{-5} Mol L⁻¹).

Porro *et al.* (1997), observaram também que o *A. thiooxidans* não é capaz de lixiviar sulfetos insolúveis, assim como no trabalho de Bevilaqua *et al.* (2002), no qual foi constatado que

essa espécie também não é capaz de oxidar a calcopirita pois esse sulfeto está inserido na classe dos polissulfetos, os quais são solúveis em ácido, segundo Sand *et al.* (2001).

Um potencial importante do *A. thiooxidans* para a lixiviação da calcopirita seria evitar a acumulação da jarosita na superfície do substrato, permitindo, assim, maior dissolução do cobre, pela manutenção de um pH adequado na solução lixiviante. De acordo com Rawlings *et al.* (1999) e Pradhan *et al.* (2008), a alta taxa de Fe(III)/Fe(II) indicando alto potencial redox, baixo pH e temperaturas mais elevadas são favoráveis para os microrganismos na operação e fatores fundamentais para o processo de biolixiviação. Plumb *et al.* (2008), estudaram a biolixiviação de minério de cobre de baixo teor, utilizando além do *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, várias outras culturas como *Leptospirillum ferrooxidans*, *L. ferriphillum* etc., em diferentes temperaturas, observando a cooperação dessa mistura nos valores finais de lixiviação.

Entretanto, no presente trabalho, mesmo considerando que os valores de pH permaneceram relativamente baixos (~1,6) em todas as condições estudadas e que a jarosita não foi apropriadamente detectada (a ser discutido mais adiante) os rendimentos finais de solubilização do cobre não foram muito expressivos. A tabela 5 mostra esses rendimentos nas várias condições avaliadas. Como pode ser visto e analisando sob um ponto de vista global, os rendimentos dos cultivos adaptados apresentaram valores da ordem de 30% enquanto que os não adaptados em torno de 20-22%, exceto na presença de cisteína 10^{-5} mol L⁻¹ o qual atingiu 27%. Entretanto a presença dessa concentração do aminoácido e mesmo na concentração inferior, não determinou resultados consistentes e reprodutíveis. Nos cultivos com o *A. thiooxidans*-Fg01 e nos controles abióticos, os rendimentos finais situaram-se, respectivamente, em torno de 18 e 15%.

De qualquer forma, foi evidente a diferença entre os cultivos de *A. ferrooxidans*-LR dos cultivos de *A. thiooxidans*-FG01 e dos controles abióticos. Também pode-se considerar como razoavelmente expressiva a diferença entre os cultivos adaptados previamente e aqueles não adaptados.

Foi demonstrado por Bevilaqua *et al.* (2002) que o *A. ferrooxidans* foi capaz de utilizar a calcopirita como fonte de energia e solubilizar íons cobre. No entanto a biossolubilização alcançada depois de 56 dias de ensaio, foi em torno de 50% de rendimento, também utilizando uma cultura previamente adaptada ao crescimento em calcopirita a 2,5% (m/v) de concentração.

Assim, se o *A. ferrooxidans*, utilizado como inóculo nos experimentos de biolixiviação, fosse submetido a um tempo de adaptação maior e a quantidade de calcopirita tivesse sido

aumentada progressivamente até atingir a densidade de polpa utilizada no ensaio (2,5%) possivelmente poderia ocorrer uma solubilização mais expressiva do metal.

Tabela 5 – Valores finais do rendimento de solubilização de cobre obtidos no ensaio de biolixiviação da calcopirita na presença de diferentes concentrações de cisteína por *A. ferrooxidans*-LR, adaptada ou não ao crescimento prévio nesse sulfeto, na presença ou não do *A. thiooxidans*-FG01 e por essa última espécie, bem como dos controles abióticos.

Condição experimental		Extração final do cobre (%)
<i>A.ferrooxidans</i>	(adaptada) sem cisteína	32,2
<i>A.ferrooxidans</i>	(adaptada) cisteína 10 ⁻³	36,6
<i>A.ferrooxidans</i>	(adaptada) cisteína 10 ⁻⁵	26,6
<i>A.ferrooxidans</i>	(não adaptada) sem cisteína	22,2
<i>A.ferrooxidans</i>	(não adaptada) cisteína 10 ⁻³	21,1
<i>A.ferrooxidans</i>	(não adaptada) cisteína 10 ⁻⁵	27,7
<i>Cultura Mista</i>	(adaptada) sem cisteína	20
<i>Cultura Mista</i>	(adaptada) cisteína 10 ⁻³	18,8
<i>Cultura Mista</i>	(adaptada) cisteína 10 ⁻⁵	20
<i>Cultura Mista</i>	(não adaptada) sem cisteína	22,2
<i>Cultura Mista</i>	(não adaptada) cisteína 10 ⁻³	20
<i>Cultura Mista</i>	(não adaptada) cisteína 10 ⁻⁵	22,2
<i>A. thiooxidans</i>	sem cisteína	17,7
<i>A. thiooxidans</i>	cisteína 10 ⁻³	16,6
<i>A. thiooxidans</i>	cisteína 10 ⁻⁵	18,8
Controle abiótico sem cisteína		13,3
Controle abiótico cisteína 10 ⁻³		15,5
Controle abiótico cisteína 10 ⁻⁵		15,5

5.4.4 Análise dos resíduos

Durante a biolixiviação dos sulfetos minerais as características dos compostos sólidos são alteradas, podendo ocorrer o aparecimento de novas fases (amorfas ou cristalinas) em função do aumento da concentração de numerosos elementos no meio lixiviante ou o desaparecimento de minerais presentes na amostra original. Os resíduos desses ensaios foram submetidos a análises por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e por difração de raios-X.

5.4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Como citado anteriormente no item 4.8.2, essa técnica permite uma observação geral do que ocorreu no processo de biolixiviação da calcopirita. Pode ser visto pela figura 16 (A, B, C, e D) que as características do resíduo do controle abiótico (Figura 16A) em relação aos tratamentos inoculados com *A. ferrooxidans*-LR adaptada (Figura 16B) ou não adaptada (Figura 16C) e a calcopirita original (Figura 16D) tornaram-se muito diferentes após o período de incubação. Enquanto que no controle abiótico assim como no sulfeto original, pode-se observar facilmente os grãos do mineral utilizado nos ensaios, nas condições inoculadas, tanto com células adaptadas ou não do *A. ferrooxidans*-LR, essa visualização é praticamente impossível. Nota-se a formação em ambos os casos de um material de cor esbranquiçada recobrendo o mineral lixiviado. Esse “precipitado” foi observado também nas outras condições experimentais (resultados não mostrados).

5.4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Com os mesmos resíduos sólidos do ensaio de biolixiviação da calcopirita, na ausência de cisteína, foram feitas análises por microscopia eletrônica de transmissão. A figura 17 mostra os resultados do resíduo do controle abiótico (17-A) e do inoculado com *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptado (17-B).

Pode-se verificar que o resíduo sólido referente ao controle abiótico do experimento não apresenta cristalinidade e suas partículas apresentam-se na forma de aglomerados de tamanhos diversos. Por outro lado o resíduo do tratamento inoculado apresenta cristais (indicados pelas

setas) os quais podem ser atribuídos a jarosita. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório a análise desse tipo de precipitado identificou esse mineral.

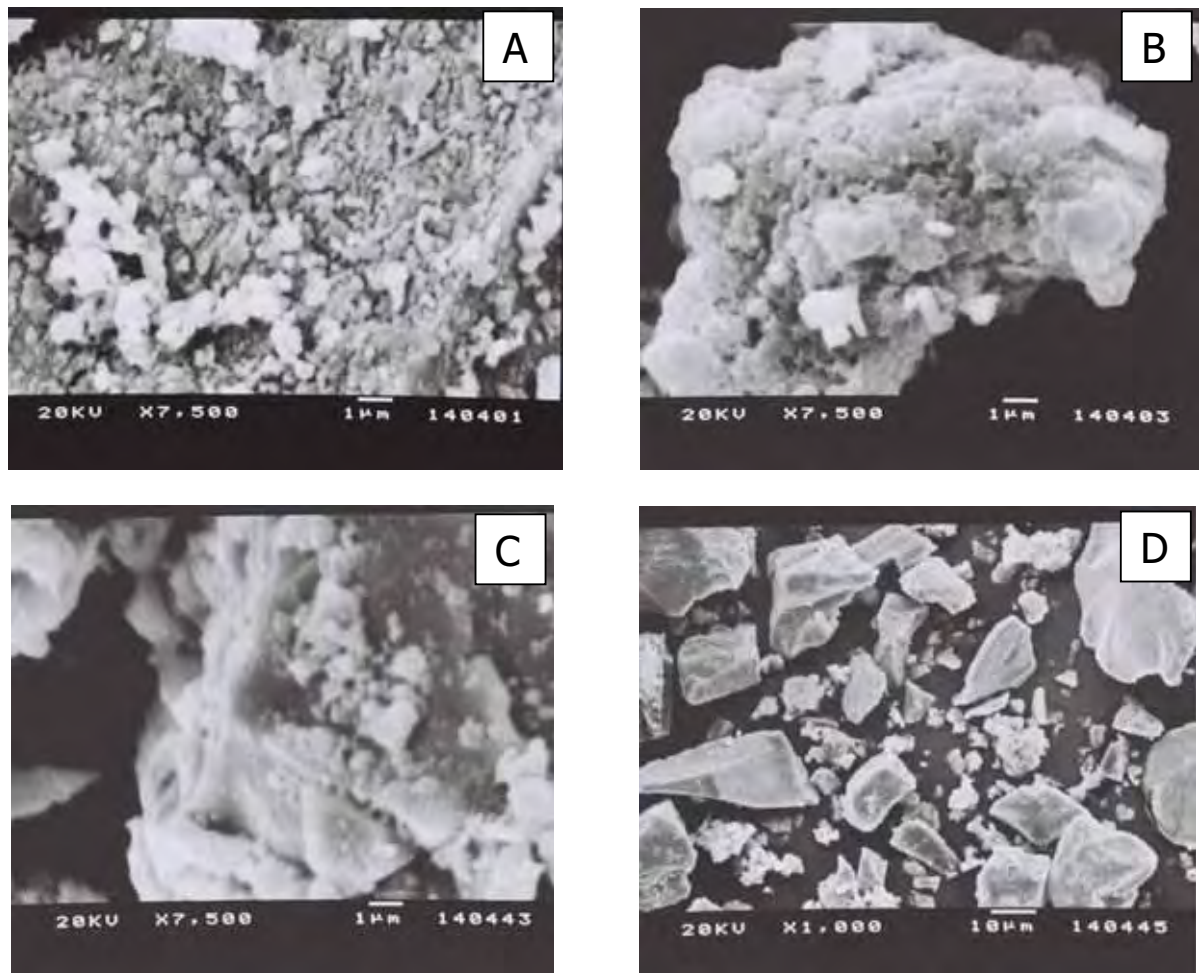


Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos do ensaio de biolixiviação após 64 dias (sem cisteína). (A) controle abiótico; (B) *A. ferrooxidans*-LR (adaptada); (C) *A. ferrooxidans*-LR (não adaptada).

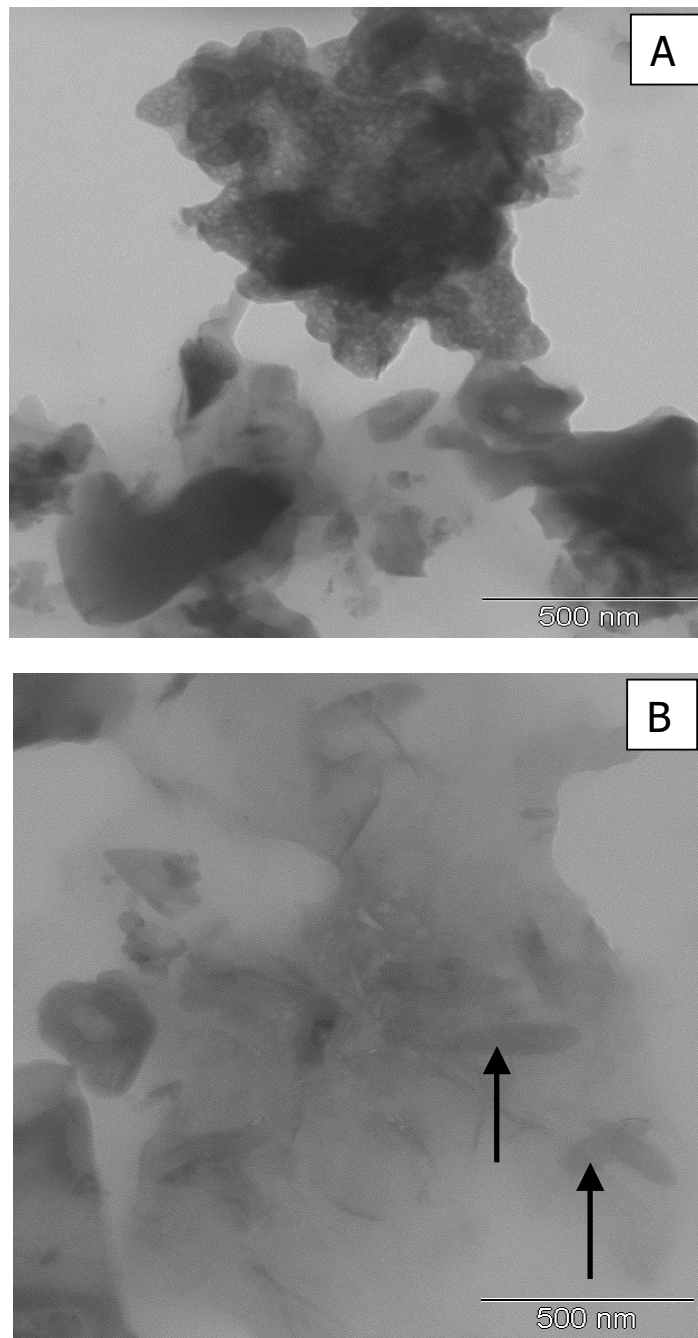


Figura 17 - Fotomicrografias eletrônicas dos resíduos do controle abiótico (A) e do inoculado com *A. ferrooxidans*-LR previamente adaptado após 64 dias de lixiviação da calcopirita. As setas mostram precipitados aciculares nanométricos.

A análise por EDX desses precipitados é mostrada na figura 18. Pode-se observar a presença de fósforo, ferro e cobre como elementos majoritários e de enxofre e potássio como minoritários. A presença de cobre pode ser decorrente da separação não muito eficiente dos

cristais (utiliza-se o ultrassom) e assim micro-cristais de calcopirita podem ter sido analisados concomitantemente. A presença de fósforo pode indicar também precipitados de ferro e fosfato.

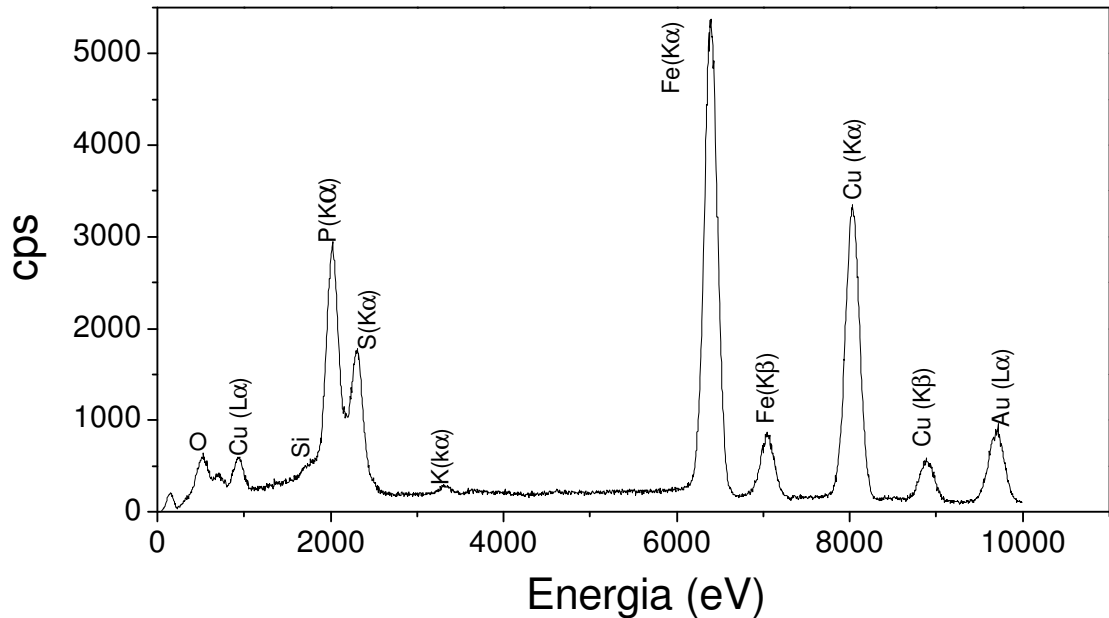


Figura 18 – EDX dos precipitados aciculares do resíduo da biolixiviação de 64 dias na presença de *A. ferrooxidans*-LR adaptada e sem cisteína.

5.4.4.3 Difração de raios-X

A difração de raios-X tem sido largamente utilizada para a caracterização dos produtos minerais da fase sólida de estudos, ou mesmo de processos, de biolixiviação e de processos geoquímicos, entre outras aplicações (AHONEN; TUOVINEN, 1993; GARCIA *et al.*, 1995a, 1995b, 2007; BIGHAM *et al.*, 1996; BEVILAQUA *et al.*, 2002; McDONALD & MUIR, 2007). Esse tipo de informação, associada aos resultados dos parâmetros físico-químicos das soluções lixiviantes, pode colaborar na interpretação dos fenômenos e mecanismos envolvidos nos processos mencionados.

Da mesma forma que para as análises anteriores, foram utilizados os resíduos dos controles abióticos e do frasco inoculado com *A. ferrooxidans*-LR, na ausência de cisteína e de *A.*

thiooxidans-FG01, dos ensaios de biolixiviação da calcopirita. Os resultados da amostra original de calcopirita e do resíduo da biolixiviação obtidos estão mostrados na figura 19.

A amostra original contém como pico majoritário, obviamente de calcopirita e como picos minoritário, hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$], quartzo (SiO_2) e gipsita ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). No resíduo do frasco inoculado, bem como em todos os outros resíduos, inclusive dos controles (dados não mostrados), somente uma nova fase cristalina foi detectada nos difratogramas, a bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), além da intensificação da hidroxiapatita e gipsita. Não foi observada a formação de jarositas ou enxofre em qualquer dos resíduos de lixiviação. Bevilaqua *et al.* (2002) estudando a biolixiviação do mineral calcopirita detectaram, após 58 dias de ensaio, o aparecimento de jarosita e enxofre como principais produtos formados durante a dissolução oxidativa desse mineral. Os minerais hidroxiapatita e bruxita não foram detectados nesse trabalho.

Considerando que se trata de mineral natural, e não sintético, a presença de outros minerais como contaminantes poderão determinar o padrão dos resíduos. Nesse estudo de Bevilaqua *et al.* (2002) não foi reportada a presença de cálcio na amostra original, enquanto que na amostra utilizada neste trabalho, a presença de cálcio foi significativa (7%) o que pode explicar a presença de bruxita no resíduo e a elevação dos picos de hidroxiapatita. O fósforo presente nesses minerais pode ser oriundo do meio de cultura (T&K) ou da própria amostra mineral.

Como pode ser visto ainda na mesma figura (19-2) não foi possível detectar a presença de picos de jarosita e de enxofre no presente trabalho, a exemplo dos resultados obtidos por Bevilaqua *et al.* (2002). Entretanto, nesse trabalho os autores adicionaram o íon ferroso como fonte adicional de energia, o qual, após alguns dias, foi oxidado ao íon férrico. Nessa condição mais drástica, em relação a este trabalho, ocorreu a formação em níveis detectáveis à DRX de enxofre e jarosita. De qualquer forma, o exame por microscopia de transmissão eletrônica indicou, provavelmente, a presença de jarosita nos resíduos dos tratamentos inoculados.

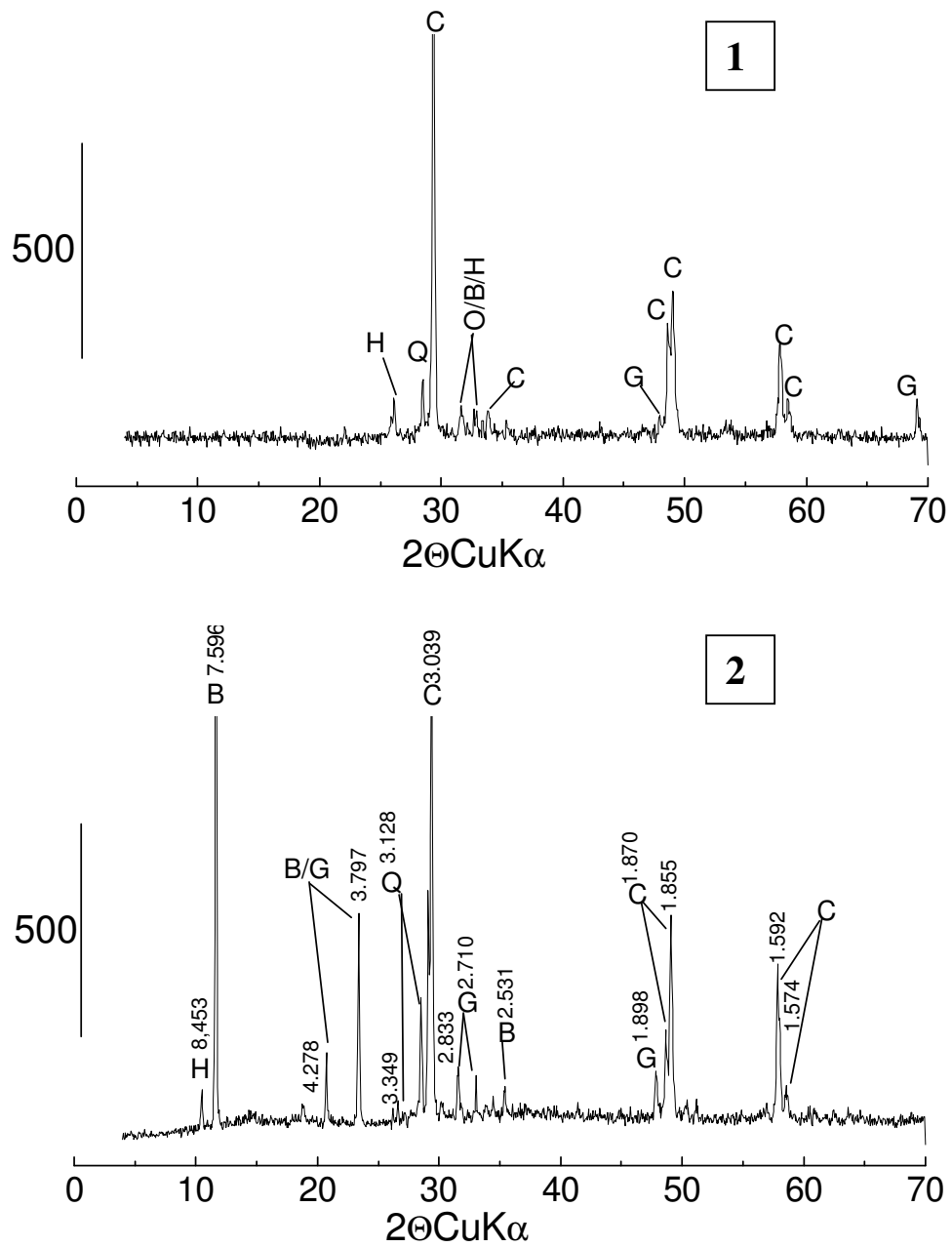


Figura 19 – Difractogramas dos resíduos de calcopirita no controle abiótico (1) e na presença de *A. ferrooxidans*-LR adaptado (2). (B) Brushita; (H) Hidroxiapatita; (Q) Quartzo; (C) Calcopirita; (G) Gipsita.

6. CONCLUSÃO

Como principais conclusões desse estudo pode-se citar:

- Tanto nos ensaios respirométricos utilizando o íon ferroso ou a calcopirita como substrato, como nos estudos de crescimento do *A. ferrooxidans*-LR em meio de cultura, ambos na presença de cisteína, as concentrações de 10^{-3} e 10^{-5} mol L⁻¹ mostraram uma tendência de induzir velocidades iniciais de oxidação dos substratos mais elevadas, enquanto que a concentração de 10^{-1} mol L⁻¹ mostrou uma inibição na atividade oxidativa da bactéria.
- Em relação aos experimentos de biolixiviação, os parâmetros pH, Eh e Fe³⁺ na presença de cisteína e do *A. thiooxidans*-FG01, não mostraram diferenças significativas em relação aos tratamentos sem a adição de ambos.
- Os valores de pH mostraram em todos os tratamentos uma tendência a se elevar inicialmente, devido ao consumo pela ganga. Após uma correção com ácido sulfúrico, houve a estabilização do pH por volta de 1,6.
- Como diferença interessante observada, pode-se afirmar que os cultivos puros *A. ferrooxidans*-LR pré-adaptados foram mais eficientes na elevação inicial do potencial de óxido-redução para valores superiores a 500 mV (eletrodo combinado de Pt x Ag⁰ AgCl KCl 3M), enquanto que nos outros tratamentos essa elevação somente foi detectada após cerca de 20 dias. Os controles abióticos e a cultura pura de *A. thiooxidans*-FG01 não ultrapassaram 400 mV (eletrodo combinado de Pt x Ag⁰ AgCl KCl 3M), independente da adição ou não de cisteína.
- Em termos gerais pôde-se detectar uma diferença de extração de cobre nos cultivos adaptados de *A. ferrooxidans*-LR, os quais alcançaram aproximadamente 30%, enquanto que aqueles com culturas não adaptadas ou com a presença de *A. thiooxidans*-FG01, mostraram extrações entre 20 e 25%. A presença de cisteína não promoveu taxas ou extrações finais mais elevadas em qualquer cultivo. Nos controles abióticos a extração final de cobre situou-se ao redor de 15%, mostrando que na presença do cultivo adaptado a extração foi 100 % maior.

- Em relação aos resíduos dos experimentos, não se observou a formação de jarosita, nem enxofre por DRX em nenhum dos tratamentos; porém, a análise por microscopia eletrônica de transmissão indicou a presença de jarosita; provavelmente a sua concentração ao término dos ensaios foi inferior ao limite de detecção pela DRX.
- Hidroxiapatita e bruxita foram detectados em todos os resíduos e podem ser atribuídos à presença de cálcio em quantidade apreciável na amostra original.

REFERÊNCIAS

- AHONEN, L.; TUOVINEN, O. H. Redox potential-controlled bacterial leaching of chalcopyrite ores. **Biohydrometallurgical Technologies**, v. 1, p. 571-578, 1993.
- ANDRADE, M. L. A.; CUNHA, L. M. S. de; GANDRA, G. T. O cobre brasileiro em ascensão no cenário mundial. **BNDES Setorial**, n. 13, p. 65-94, 2001.
- BALLESTER, A.; CORDOBA, E. Hidrometalurgia de la calcopirita: innovations in the hydrometallurgical processing of sulphides. In: HYDROCOPPER, 4th., 2005, Santiago. **Proceedings...** Santiago, 2005.
- BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS₂) e da Bornita (Cu₅FeS₄) por *Thiobacillus ferrooxidans***. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
- BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 587–592, 2002.
- BEVILAQUA, D.; PEREZ, I. D.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; GARCIA JUNIOR, O.; BENEDETTI, A. V. Characterization of Bornite (Cu₅FeS₄) electrodes in the presence of the bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 637-644, 2003.
- BEVILAQUA, D.; DIÉZ-PEREZ, I.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JUNIOR, O. Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 79-84, 2004.
- BIGHAM, J. M.; SCHWERTMANN, U.; PFAB, G. Influence of pH on mineral speciation in a bioreactor simulating acid mine drainage. **Applied Geochemistry**, v. 11, p. 845–849, 1996.
- BOON, M.; BRASSER, H. J.; HANSFORD, G. S.; HEIJNEN, J. J. Comparison of the oxidation kinetics of different pyrites in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 5, p. 57–72, 1999.
- BOSECKER, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 591–604, 1997.

BOUCHAL, P.; ZDRÁHAL, Z.; HELÁNOVÁ, S.; JANICZEK, O.; HALLBERG, K.; MANDL, M. Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4278-4285, 2006.

BRASIL MINERAL. **COBRE**: indústria obtém faturamento histórico. Disponível em: <<http://www.signuseditora.com.br/bm/default.asp?COD=3545&busca=&numero=351>> Acesso em: 07 mai. 2008.

CARUBELLI, R. C. **Compostos de coordenação de Eu³⁺ e Tb³⁺ com aminoácidos e aspartame, síntese caracterização e espectroscopia**. 1995. 115 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1995.

CHAN, L. C.; GU, X. Y.; WONG, J. W. C. Comparison of bioleaching of heavy metals from sewage sludge using iron- and sulfur-oxidizing bacteria. **Advances Environmental Resource**. v. 7, p. 603–607, 2003.

CHEN, B-Y.; LIU, H-L.; CHEN, Y-W.; CHENG, Y-C. Dose–response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 735–745, 2004

CRUNDWELL, F. K. How do bacteria interact with minerals? **Hidrometallurgy**, v. 71, p. 75-81, 2003.

DANA, J. D.; DANA, E. S. **Elements, sulfides , sulfosalts**: sistem of mineralogy. 7th ed. Yale: Yale University Press, 1966. v. 1, cap. 2, p. 19-25.

EHRlich, H. L. **Geomicrobiology**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

ELBEHTI, A.; BRASSEUR, G.; LEMESLE-MEUNIER, D. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc1 and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, p. 3602–3606, 2000.

ELZEKY, M.; ATTIA, Y. A. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides. **Chemical Engineering Journal**, v. 56, p. B115–B124, 1995.

FLETCHER, M. Bacterial attachment on aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: FLETCHER, M. (Ed.). **Molecular and ecological diversity of bacterial adhesion**. New York: Wiley-Liss, 1996.

FRATTINI, C. J.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. **Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans***. Anton: Van Lee, 2000. p. 57–64.

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

GARCIA JUNIOR, O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEM, O. H. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 508-514, 1995a.

GARCIA JUNIOR, O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEM, O. H. Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 578-584, 1995b.

GARCIA JUNIOR, O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, cap. 22, p. 485-512.

GARCIA JR., O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEM, O. H.. Oxidation of isochemical FeS₂ (marcasite-pyrite) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v.20, p.: 98-101, 2007.

GÓMEZ, M. J.; CANTERO, D. **Biooxidación del ion ferroso. Fundamentos y Perspectiva de las Tecnologías biomineras**: Biooxidação do ion ferroso. Valparaíso: Ediciones Universitárias de Valparaíso, 2005. p. 25-43. (Serie Ingeniería).

GRISHIN, S. I.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Characterization of jarosite formed upon bacterial oxidation of ferrous sulfate in a packed-bed reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3101-3106, 1988.

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

HARNEIT, K.; GÖKSEL, A.; KOCK, D.; KLOCK, J-H.; GEHRKE, T.; SAND, W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 83, p. 245–254, 2006.

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

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

KARAMANEV, D. G.; NIKOLOV, L. N.; MAMATARKOVA, V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 341-346, 2002.

KARAN, G.; NATARAJAN, K. A.; MODAK, J. M. Estimation of mineral-adhered biomass of *Thiobacillus ferrooxidans* by protein assay some problems and remedies. **Hydrometallurgy**, v. 42, p. 169-175, 1996.

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

KINGMA, J. R.; SILVER, J. G. M. Growth of iron-oxidizing *Thiobacilli* in the presence of chalcopyrite and galena. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 20, p. 635-641, 1980.

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

KLAUBER, C. Fracture reconstruction of a chalcopyrite CuFeS_2 surface. **Surface and Interface Analyses**, v. 35, p. 415-428, 2003.

KUMAR, R. N.; NAGENDRAN, R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Chemosphere**, v. 66, p. 1775-1781, 2007.

LEHNINGER, A. L. **Principios de bioquímica**. 4. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2006.

LUZ, A. B. da.; LINS, F. F. **Rochas e minerais industriais: usos e especificações**. Rio de Janeiro: CETEM/ MCT, 2005.

McDONALD, R. G.; MUIR, D. M. Pressure oxidation leaching of chalcopyrite. Part I. Comparison of high and low temperature reaction kinetics and products. **Hydrometallurgy**, v. 86, p. 191-205, 2007.

MOEHL, T.; HALIM, A. M.; TRIBUTSCH, H. Photoelectrochemical studies on the n-MoS₂ – Cysteine interaction. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 36, p. 1341-1346, 2006.

- NATARAJAN, K. A. Electrochemical aspects of bioleaching of base-metal sulfides. In: ERLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 79-106.
- NEMATI, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans* a review on the kinetics aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 171-190, 1998.
- PEREZ, B. C. **As rochas e os minerais industriais como elementos de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: CETEM, 2001. 37 p. (Série Rochas e Minerais Industriais, 3). Disponível em: < http://www.ctem.gov.br/publicação/CETEM_SMRI_03.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2008.
- PETERSEN, J.; DIXON, D. G. Thermophilic heap leaching of a chalcopyrite concentrate. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 777-785, 2002.
- PLUMB, J. J.; McSWEENEY, N. J.; FRANZMANN, P. D. Growth and activity of pure and mixed bioleaching strains on low grade chalcopyrite ore. **Minerals Engineering**, v. 21, p. 93-99, 2008.
- PORRO, S.; RAMIREZ, S.; RECHE, C.; CURUCHET, G.; ALONSORO MANOWSKI, S. Bacterial attachment: its role in bioleaching processes. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 573-578, 1997.
- PRADHAN, N.; NATHSARMA, K. C.; SRINIVASA, R. K.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K. Heap bioleaching of chalcopyrite: a review. **Minerals Engineering**, v. 21, n. 5, p. 355-365, 2008.
- PRO COBRE CONNECTS LIFE. **O cobre na economia**. Disponível em: <http://www.procobre.org/pr/sobre_o_cobre/o_cobre_na_economia.html>. Acesso em: 29. mar. 2007.
- PRONK, J. T.; JOHNSON, D. B. Oxidation and reduction of iron by acid-philic bacteria. **Geomicrobiol Journal**, v.10, n. 46, p. 153-171, 1992.
- QIU, M.; XIONG, S.; ZHANG, W.; WANG, G. Comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 987-990. 2005.

QUATRINI, R.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal Industries Microbiol Biotechnology**, v. 32, p. 606–614, 2005.

RAWLINGS, D. E.; TRIBUTSCH, H.; HANSFORD, G. S. Reasons why *Leptospirillum*-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. **Microbiology**, v. 145, p. 5–13, 1999.

REED, S. J. B. **Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology**. New York: Cambridge University Press, 1996. p. 201.

REIS, E. Exploração mineral: tendências tecnológicas. **Brasil Mineral**, n. 252, p. 42- 48, 2006.

REIS, G. L. R. História invejável: CVRD 65 anos. **Brasil Mineral**, n. 261, p. 18-60, 2007.

RODRIGUES, A. F. da S.; FERRAZ, C. P. Mineração e desenvolvimento regional. **Brasil Mineral**, n. 263, p. 26-33, 2007.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T. K.; SAND, W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 239–248, 2003.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 815–824, 2000.

ROSSI, G. **Biohidrometallurgy**. New York: McGraw-Hill, 1990.

SAND, W.; GEHRKE, T.; HALMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism – a critical evaluation of bacterial leaching. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 961-966. 1995.

SAND, W.; GEHRKE, T.; JOZSA, 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. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p. 319–21, 1999.

SERGEI, I. G.; TUOVINEN, O. H. Scanning electron microscopic examination of *Thiobacillus ferrooxidans* on different support matrix materials in packed bed and fluidized bed bioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 5-6, 1989.

SHARMA, P. K.; RAO, H. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 29, p. 21-38, 2003.

SHRIHARI, R. K.; GANDHI, K. S. Modelling of Fe^{2+} oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 524–528, 1990.

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

STOTT, M. B.; WATLING, H. R.; FRANSMANN, P. D.; SUTTON, D. The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching. **Minerals Engineering**, v.13, p. 1117-1127, 2000.

SUZUKI, I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 119-132, 2001.

TEMPLE, K. L.; COLMER, A. R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 605-611, 1951.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* . I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison $^{14}CO_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J.F. A manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism. In:_____. **Manometric and biochemical techniques**. 5th ed. Mineapolis: Burgess., 1972. p. 290-305.

VILLAREZU, J. Cobre. **Análise Editorial**. Disponível em:
<<http://www.analisecom.com.br/comex06/produtos/rankprodutos/cobre/index>>. Acesso em 03 ago. 2007.

VOGEL, A. Determinação de cobre em um minério. In:_____. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981a. p. 282.

VOGEL, A. Padronização de soluções de tiossulfato. In: _____. **Análise inorgânica quantitativa**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981b. p. 279.

VOGEL, A. Titulaciones de oxidación con dicromato de potasio. In: _____. **Química analítica cuantitativa**. 4.ed. Buenos Aires: Kapelusz, 1960. p. 412-419.

WANG, J.; QIU, G-Z.; QIN, W-Q.; ZHANG, Y-S. Microbial leaching of marmatite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**. v. 16, p. 937-942, 2006.

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

ANEXO

Anexo 1- Tolerância do *A. ferrooxidans* a diferentes metais pesados – Cabrera, Gómez e Cantero (2005)

Bactéria	Metal pesado	MTC (g/L)	referência
<i>A. ferrooxidans</i>	Cr(III)	0.52	SISTI, ALEGRETTI , DONATI, 1998
		0.78	WONG, SILVER, KUNSHNER, 1982
	Cu(II)	3.9	BAILLET ET AL., 1998
		0.6-10	LEDUC, FERRONI, TREVORS, 1997
		19	BOYER, MAGNIN, OZIL, 1998
		16	GARCIA, SILVA, 1991
		10	DAS, MODAK, NATARAJAN, 1997
		5	BRAHMAPRAKASH , ET AL., 1988
	Cd(II)	5.6	BAILLET, MAGNIN, CHERUY, 1997
	Zn(II)	1.12	IMAI, ET AL., 1975
		40	KONDRATYEVA, ET AL., 1995
	Ni(II)	40	DAS, MODAK, NATARAJAN, 1997
		0.6 – 9.4	LEDUC, FERRONI, TREVORS, 1997
		6.3	DOPSON ET AL., 2003
10		HUBER, STETTER, 1990.	