



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

AMANDA MARTOS DE AQUINO

**OTIMIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO
SULFÚRICO EM REATOR UTILIZANDO *Acidithiobacillus thiooxidans***

Araraquara

2022

AMANDA MARTOS DE AQUINO

**OTIMIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO
SULFÚRICO EM REATOR UTILIZANDO *Acidithiobacillus thiooxidans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Coorientador: Me. Samir Prioto Tayar

Araraquara

2022

A657o Aquino, Amanda Martos de.
Otimização da capacidade de produção de ácido sulfúrico em reator
utilizando *Acidithiobacillus thiooxidans* / Amanda Martos de Aquino. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Denise Bevilaqua.
Coorientador: Samir Prioto Tayar.

1. Ácido sulfúrico. 2. *Acidithiobacillus thiooxidans*. 3. Biorreatores.
4. Enxofre elementar. 5. Oxidação. I. Bevilaqua, Denise, orient. II. Tayar,
Samir Prioto, coorient. III. Título.

AMANDA MARTOS DE AQUINO

**OTIMIZAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO
SULFÚRICO EM REATOR UTILIZANDO *Acidithiobacillus thiooxidans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Coorientador: Me. Samir Prioto Tayar

Araraquara, 20 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Denise Bevilaqua

Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Denise Bevilaqua por toda atenção, direcionamento e por me apresentar o “universo” da Biohidrometalurgia com tanto amor e entusiasmo. Admiro muito sua dedicação e todo o carinho que você tem pelo que faz, com certeza, usarei essa inspiração e aprendizagem para trilhar a minha carreira profissional.

A minha família, que em meio a momentos tão difíceis me apoiaram, estiveram presentes e, principalmente, acreditaram no meu esforço. Espero um dia retribuir toda a dedicação que vocês me deram durante essa trajetória que já tem 7 anos desde que saí de casa.

Agradeço aos meus companheiros do grupo de pesquisa BAMMA que sempre estiveram dispostos a me ajudar e ensinar, pelas discussões de trabalho e por tornar o ambiente de laboratório muito mais leve durante esse período e, em especial, ao meu coorientador Samir por me ajudar a conduzir este trabalho.

Aos meus amigos Fernando e Julio que me proporcionaram muita descontração durante essa jornada e pelo esforço em sempre me motivar. Por fim, agradeço ao Instituto de Química por proporcionar a infraestrutura e os recursos necessários para desenvolver este trabalho.

RESUMO

Os principais processos convencionais aplicados na indústria mineradora têm enfrentado diversas pressões ambientais e econômicas devido à crescente demanda global por metais. Em vista disso, a produção microbiana de ácido sulfúrico – principal insumo químico consumido pelos processos – tornou-se uma tecnologia atraente para auxiliar a mineração. Neste trabalho foram elaborados estudos em biorreatores de bancada visando determinar e otimizar a produção de ácido sulfúrico pelo processo de oxidação de enxofre elementar através da ação da bactéria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Para isso, a *Acidithiobacillus thiooxidans* cultivada em agitador rotativo a 150 rpm 30 °C contendo enxofre elementar em diferentes meios de cultura foi utilizada como ponto de partida. Após esse procedimento, a produção de ácido foi escalonada para biorreatores do tipo tanque agitado de 3 L operando em modo batelada e, posteriormente, em modo contínuo. No processo batelada, o pH, a concentração de ácido total e o número de células em solução foram monitorados. Os resultados obtidos indicaram o bom desempenho da bactéria na transposição de escala e determinaram uma capacidade de produção máxima igual a 0,85 mol L⁻¹ em 33 dias de experimento. Além disso, a partir da contagem do número de células, obteve-se uma taxa específica de crescimento (μ) igual a 0,30 dia⁻¹.

Em contrapartida, na operação em modo contínuo foi possível verificar que o sistema montado apresentou problemas relacionados com a configuração do biorreator e o tipo de substrato impedindo de determinar e otimizar a produção de ácido. Dessa forma, identificou-se a necessidade de entender inicialmente o comportamento do biorreator com volume e mangueiras maiores e dos diferentes tipos de substrato, como enxofre do tipo grânulo, pérolas ou pastilhado, para posteriormente realizar a otimização do bioprocessos.

Palavras-chave: ácido sulfúrico, *Acidithiobacillus thiooxidans*, biorreatores, enxofre elementar, oxidação.

ABSTRACT

The main conventional processes applied in the mining industry have dealt with several environmental and economic pressures due to the rising global demand for metals. As a result, the microbial production of sulfuric acid – the main chemical input consumed by the processes – has become an attractive technology to aid mining. In this work, studies were carried out in bench scale bioreactors to determine and optimize the production of sulfuric acid by the process of oxidation of elemental sulfur through the action of the acidophilic bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Therefore, *Acidithiobacillus thiooxidans* grown in rotatory shaker at 150 rpm and 30 °C containing elemental sulfur in different culture media was used as a starting point. After this procedure, the acid production was scaled to 3 L stirred-tank bioreactors operating in batch mode and subsequently in continuous mode. In the batch process, pH, total acid concentration and number of cells in solution were monitored. The results obtained indicated the good performance of the bacteria in the scale transposition and determined a maximum production capacity equal to 0.85 mol L⁻¹ in 33 days of experiment. Furthermore, from counting the number of cells, a specific growth rate (μ) equal to 0.30 day⁻¹ was obtained.

On the other hand, in continuous mode operation it was possible to verify that the assembled system presented problems related to the configuration of the bioreactor and the type of substrate, preventing it from determining and optimizing the production of acid. Thus, it was identified the need to initially understand the behavior of the bioreactor with larger volume and hoses and different types of substrates such as granules pearls or pellets, to later carry out the optimization of the bioprocess.

Keywords: sulfuric acid, *Acidithiobacillus thiooxidans*, bioreactors, elemental sulfur, oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de reatores de tanque agitado em modo batelada (A) e em modo contínuo (B), onde x: biomassa, s: substrato, p: produto, F: fluxos de entrada e saída e V: volume do reator.	19
Figura 2. Imagem do biorreator para a bioprodução do ácido em modo batelada (A) e desenho do sistema de bioprodução do ácido em modo batelada (B).	25
Figura 3. Imagem de uma Câmara de Neubauer.	26
Figura 4. Grade de contagem da Câmara de Neubauer.	27
Figura 5. Curva de crescimento das células em processo batelada.	29
Figura 6. Imagem do biorreator para a bioprodução do ácido em modo contínuo (A) e desenho do sistema de bioprodução do ácido em modo contínuo (B).	30
Figura 7. Valores de pH e concentração de H ₂ SO ₄ cumulativa em função do tempo de cultivo da <i>At. thiooxidans</i> FG-01 em agitador rotativo nas condições contendo apenas meio 9K (símbolos fechados) e meio 9K suplementado com solução traço (símbolos abertos).	33
Figura 8. Valores de pH (■) e concentração de H ₂ SO ₄ cumulativa (●) em função do tempo de cultivo da <i>At. thiooxidans</i> FG-01 em biorreator do tipo tanque agitado operando em modo batelada.	35
Figura 9. Curva de crescimento da bactéria <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> FG-01 em função do tempo de cultivo (escala logarítmica).	36
Figura 10. Valores de pH (■) e concentração de H ₂ SO ₄ cumulativa (●) em função do tempo de cultivo da <i>At. thiooxidans</i> FG-01 em modo contínuo. Os pontos marcados com (*) indicam o momento em que o fluxo foi desligado e a descarga do reator foi realizada para ajustar o volume do reator.	38
Figura 11. Imagem da mangueira utilizada no efluente do reator.	39
Figura 12. Imagem da nova mangueira utilizada na troca.	40
Figura 13. Imagem do sistema contínuo no início da operação (A) e imagem após realizar a troca da mangueira e igualar as vazões (B).	40
Figura 14. Vazamento da mangueira do efluente do biorreator durante o 32º dia de ensaio. .	41
Figura 15. Esquematização do sistema de biolixiviação de catalisador gasto em coluna.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 MINERAÇÃO	13
2.2 BIOHIDROMETALURGIA	14
2.3 MICRORGANISMOS ACIDÓFILOS	15
2.3.1 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	16
2.4 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO	18
2.4.1 Biorreatores de tanque agitados.....	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 GERAL	21
3.2 ESPECÍFICO.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 MICRORGANISMOS	22
4.1.1 Condições de crescimento	22
4.1.2 Repique da <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> em meio com enxofre elementar	23
4.2 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO	23
4.2.1 Ensaios em agitador rotativo	23
4.2.2 Análise das amostras	24
4.2.2.1 <i>Leitura do pH</i>	24
4.2.2.2 <i>Ensaios de titulação ácido-base</i>	24
4.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO EM BIORREATOR.....	24
4.3.1 Ensaio em modo batelada	24
4.3.2 Cálculo da produtividade fermentativa.....	25
4.3.3 Determinação da concentração celular em solução.....	26
4.3.3.1 <i>Método de contagem de células.....</i>	28
4.3.3.2 <i>Curva de crescimento celular.....</i>	28
4.4 OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO EM BIORREATOR .	29
4.4.1 Ensaio em modo contínuo	29

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO	33
5.1.1 Ensaio em frascos	33
5.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO EM BIORREATOR.....	34
5.2.1 Produção em modo batelada	34
5.3 OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO	37
5.3.1 Produção em modo contínuo	37
5.3.2 Melhorias propostas para o sistema contínuo.....	41
6 CONCLUSÃO.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por metais utilizados como matéria prima em diversos setores econômicos tem desafiado cada vez mais a indústria mineradora. Isso porque o aumento no consumo desses recursos tem contribuído para o esgotamento das reservas de minérios acessíveis e tornado a indústria mineradora cada vez mais restrita a explorar minérios com baixo teor de metais de interesse econômico e complexos (GARCIA JR.,; BEVILAQUA, 2008; LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021).

Sabe-se ainda que a mineração dos metais a partir das rotas convencionais – como a pirometalurgia e hidrometalurgia – é um processo que consome grande quantidade de energia e produtos químicos e gera impactos ambientais significativos. Portanto, em decorrência desses fatores, tornou-se necessário buscar abordagens capazes de processar minérios com teores reduzidos de uma forma mais econômica e ao mesmo tempo minimizar os danos ambientais (AKCIL et al., 2015; JOHNSON, 2013).

Uma alternativa a essa mineração convencional é o uso da biohidrometalurgia. A rota tem como característica solubilizar e recuperar metais através da ação de microrganismos por processos semelhantes aos dos ciclos biogeoquímicos. Dessa maneira, além de ser uma opção menos agressiva ao meio ambiente, o bioprocessamento exige uma baixa demanda de energia e insumos químicos quando comparado aos processos convencionais. Sendo, portanto, uma tecnologia promissora para o processamento de metais, principalmente, de minérios de baixo teor de metais de interesse econômico e resíduos industriais (AKCIL et al., 2015; GARCIA JR.,; BEVILAQUA, 2008).

Embora uma diversidade de microrganismos desempenha funções fisiológicas importantes na recuperação dos metais, as bactérias acidófilas e, em especial, as do gênero *Acidithiobacillus* são as mais utilizadas nas operações biohidrometalúrgicas (JOHNSON, 2006; PATHAK; MORRISON; HEALY, 2017). Essas destacam-se pela capacidade de tolerar elevadas concentrações de íons metálicos e obter a energia para seu metabolismo a partir da oxidação aeróbica de compostos de enxofre inorgânico e/ou ferro ferroso (Fe^{+2}) (GARCIA JR.,; BEVILAQUA, 2008; PATHAK; MORRISON; HEALY, 2017).

Dentre as *Acidithiobacillus* (*At.*), a *At. thiooxidans* exerce um papel relevante na solubilização de metais e na geração de ambientes ácidos. Isso porque a bactéria utiliza a energia da oxidação de compostos reduzidos de enxofre inorgânico como o polissulfeto (S_n^{-2}), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$), tetrationato ($\text{S}_4\text{O}_6^{-2}$), sulfito (SO_3^{-2}) e o enxofre elementar (S^0) para apoiar

seu crescimento autotrófico e gerar o ácido sulfúrico como metabólito da reação (AKCIL et al., 2015; YANG et al., 2019)

Esse ácido é caracterizado pelo seu poder oxidante e pela facilidade de solubilizar em água formando íons hidrogênio e sulfato. Portanto, além de provocar a redução do pH do ambiente, o composto contribui com enfraquecimento das ligações de íons metálicos tornando os metais solúveis (MISHRA; RHEE, 2014). Em vista disso, há cada vez mais o interesse em utilizar a *At. thiooxidans* para oxidar os compostos de enxofre inorgânico e produzir um fluxo “manufaturado” de ácido sulfúrico que auxilie os processos biohidrometalúrgicos (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Essa é uma alternativa eficaz para a indústria mineradora uma vez que o ácido sulfúrico é amplamente utilizado nos processos e seu preço pode variar consideravelmente dependendo da demanda e da localização das operações (BRIERLEY, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014). Além de representar uma técnica potencialmente mais segura e prática, eliminando os riscos significativos de acidentes durante o transporte do ácido concentrado para as plantas comerciais, geralmente, localizadas em áreas remotas e de difícil acesso (PAKOSTOVA; JOHNSON, 2019)

Embora diferentes tecnologias da engenharia são utilizadas na biohidrometalurgia, o uso de biorreatores de tanque agitado operados em modo contínuo oferecem uma alta produtividade volumétrica mantendo baixos volumes considerando a grande quantidade de materiais que são processados. Além de favorecerem ambientes favoráveis aos sistemas biológicos através do controle de parâmetros essenciais do bioprocessamento proporcionando, dessa forma, a otimização da formação do metabólito e de custos e tempos de produção (ACEVEDO, 2000; MAHMOUD et al., 2017).

Dessa maneira, o presente trabalho buscou realizar a produção do ácido sulfúrico a partir do cultivo da *At. thiooxidans* em um biorreator de tanque agitado em modo contínuo (CSTR do inglês Continuously Stirred Tank Reactor) e otimizar os parâmetros que influenciam o bioprocessamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MINERAÇÃO

A mineração de metais desempenha uma função primordial para a economia global uma vez que seus produtos são aplicados em diversos setores como na infraestrutura, tecnologia, energia, entre outros. Entretanto, devido ao aumento no consumo desses recursos, o fornecimento de muitos metais e minerais tem enfrentado dificuldades para atender a demanda. Isso porque os recursos minerais são finitos e as reservas de minérios acessíveis estão se esgotando gradativamente (LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021; SÁNCHEZ-ANDREA et al., 2016).

Em virtude disso, a indústria mineradora está cada vez mais restrita a explorar corpos de minérios com teores reduzidos de metais – considerados rejeitos minerais – e que apresentam uma mineralogia complexa, como os minérios polimetálicos. Portanto, o declínio nos tipos de minérios explorados e os efeitos ambientais e econômicos ocasionados pelos processos convencionais empregados na indústria têm desafiado constantemente as empresas e a crescente demanda dos metais (GARCIA JR.; BEVILAQUA, 2008; JOHNSON, 2013).

As principais rotas de processamento adotadas na mineração são a pirometalurgia e a hidrometalurgia (HSU et al., 2019). A pirometalurgia consiste em extrair metais-alvos de minérios e concentrados através das alterações físico-químicas intensificadas por tratamentos térmicos (AKCIL et al., 2015; LIU et al., 2019). Desse modo, a aplicação de temperaturas superiores ao ponto de fusão dos metais permite que esses formem ligas enquanto as impurezas formam gases ou passam para a fase de escória (LIU et al., 2019).

Embora a pirometalurgia seja a técnica mais comumente utilizada e favorável para a operações de grandes escalas, essa possui alguns desafios e limitações. A exemplo, o risco de emissão de gases tóxicos e poluentes gerados durante o processo, como o SO_2 , e a necessidade de sistemas para a recuperação de metais presentes nos gases residuais. Esta tecnologia exige um alto consumo energético e não pode ser aplicada a polissulfetos metálicos, o que torna o processamento de minérios complexos e de baixo teor economicamente inviável (AKCIL et al., 2015; HSU et al., 2019; LIU et al., 2019).

A hidrometalurgia, em contrapartida, é responsável por utilizar reagentes como ácidos (ácido sulfúrico e nítrico) ou soluções alcalinas (amônia) para lixiviar e recuperar os metais-alvos (JHA et al., 2016; LIU et al., 2019). Essa técnica é potencialmente mais atraente que o processo pirometalúrgico pois pode ser mais facilmente controlada, demanda baixa energia

(quando comparada a pirometalurgia) e não emite gases poluentes. Bem como é capaz de processar minérios de teor reduzido tornando-a mais favorável que a fundição a altas temperaturas (AKCIL et al., 2015; HSU et al., 2019).

Porém, apesar das vantagens apresentadas, a hidrometalurgia também possui algumas limitações, como: o alto consumo de produtos químicos e a geração de elevados fluxos de resíduos que requerem tratamentos adicionais. Sem contar também com o fato de que o processo enfrenta lentas taxas de reações em virtude das operações serem realizadas em temperaturas relativamente mais baixas (AKCIL et al., 2015; TUNSU et al., 2015).

Portanto, em decorrência dos fatores que acarretam os processos convencionais e as crescentes restrições ambientais sob os danos causados por esses, abordagens mais ambientalmente responsáveis e econômicas podem ser uma opção. Contudo, sabe-se que a mineração sempre será uma atividade destrutiva que irá causar prejuízo ao meio ambiente. Nesse caso, é necessário desenvolver e otimizar processos alternativos capazes de minimizar os impactos dessas atividades de forma viável (DOLD, 2008; JOHNSON, 2013).

2.2 BIOHIDROMETALURGIA

Na biohidrometalurgia, tecnologia alternativa a hidrometalurgia, lixiviantes produzidos biologicamente são utilizados para solubilizar e recuperar os metais de minérios, concentrados ou até mesmo resíduos. Devido a ação dos microrganismos nesse processo, a tecnologia é uma opção mais ambientalmente amigável e promissora para extração dos metais, especialmente, de minérios de baixo teor e que apresentam uma mineralogia complexa como os polissulfetos metálicos (KAKSONEN et al., 2020; LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021).

Isso porque ao comparar a técnica com as rotas convencionais, essa proporciona menores requisitos de energia, menor custo operacional, economia de insumos químicos e não emite gases tóxicos. Sendo assim, uma alternativa favorável para o processamento de jazidas de pequeno porte que não suportam o alto custo capital ou que encontram-se localizadas longe de centros com infraestrutura apropriada (BRIERLEY, 2010; GARCIA JR.; BEVILAQUA, 2008).

Atualmente, a biohidrometalurgia tem sido efetivamente empregada em escala comercial para recuperar os metais de minérios com teores reduzidos em países como Chile, Espanha, Estados Unidos, Austrália e entre outros (GARCIA JR.; BEVILAQUA, 2008; LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021). Em vista disso, estima-se que cerca de 15% do

cobre, 5% do ouro e porcentagens menores de cobalto, níquel, urânio e zinco são recuperados através da tecnologia, contribuindo significativamente com a produção mundial (LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021; MAHMOUD et al., 2017).

Para isso, dois principais processos denominados como biooxidação e biolixiviação são empregados nas operações biohidrometalúrgicas. A biooxidação costuma ser usada no pré-tratamento de minerais que contêm metais valiosos, onde a matriz mineral que bloqueia o metal é oxidada expondo esse a uma subsequente recuperação química. Enquanto a biolixiviação normalmente é empregada na extração de metais da matriz mineralógica que são convertidos em metais solúveis e posteriormente, recuperados da solução (DOPSON; HOLMES, 2014; GUMULYA et al., 2018).

Do ponto de vista da engenharia, técnicas como sistemas irrigados (pilhas e despejos) e tanques agitados são utilizadas nos processos biohidrometalúrgicos para a extração e recuperação dos metais (MAHMOUD et al., 2017). Na primeira, o material de interesse (minérios ou concentrados) é empilhado e exposto a uma irrigação ácida para estimular a atividade de microrganismos que ocorrem naturalmente ou são inoculados. Ao passo que na segunda, o material (minério moído ou concentrado) é tratado como uma pasta agitada e aerada promovendo a ação microbiana (JOHNSON, 2010; KAKSONEN et al., 2018; MAHMOUD et al., 2017).

2.3 MICRORGANISMOS ACIDÓFILOS

Embora uma diversidade de microrganismos desempenham importantes funções fisiológicas na biohidrometalurgia, os principais protagonistas envolvidos na tecnologia são os acidófilos (JOHNSON, 2006). Esses crescem em ambientes extremos com valores de pH inferiores a 3 e são predominantemente organismos procariontes pertencentes ao reino Bacteria (*Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Leptospirillum*) e Archea (*Sulfolobus*, *Ferroplasma*) (DOPSON; HOLMES, 2014; JIA et al., 2019).

Uma vez que existe uma grande variedade de acidófilos, uma maneira de caracterizar e dividir esses microrganismos é com base na sua resposta a diferentes temperaturas. Nesse caso, são classificados 3 tipos de grupos acidófilos: os mesofílicos (temperatura ótima entre 20 e 40 °C), os termofílicos moderados (temperatura ótima entre 40 e 60 °C) e os termofílicos extremos (temperatura ótima superior a 60 °C) (JOHNSON, 1998; JOHNSON; HALLBERG, 2008).

Esses microorganismos podem ainda se diferenciarem com base nas características nutricionais em relação as fontes energéticas, como: acidófilos quimiolitotróficos, organismos que utilizam fonte de energia inorgânica e acidófilos fototróficos, organismos que usam a energia luminosa. Como também em relação a fonte de carbono, sendo esses: acidófilos heterotróficos, organismos capazes de assimilar o carbono celular de fontes orgânicas e acidófilos autotróficos, organismos que obtêm o carbono celular a partir de uma fonte de carbono inorgânico, como exemplo, o CO₂ (JOHNSON; HALLBERG, 2008).

Dentre esses microorganismos, as bactérias quimiolitotróficas pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus* são as mais ativas nos processos biohidrometalúrgicos. Isso pois, além de desempenharem um papel central na dissolução de sulfetos metálicos, também podem ser aplicadas em soluções de problemas ambientais causados por metais pesados como placas de circuito impresso, baterias gastas, lodo de esgoto e na dessulfurização de carvão (JIA et al., 2019; WANG et al., 2019).

Assim, as bactérias do gênero *Acidithiobacillus* possuem a notável capacidade de obter energia para o crescimento através da oxidação de compostos de enxofre inorgânico e ferro ferroso (Fe⁺²) e utilizar o CO₂ atmosférico para a síntese de biomassa (PATHAK; MORRISON; HEALY, 2017; WANG et al., 2019). Devido a essas particularidades, as espécies da bactéria são divididas em dois grupos: as oxidantes de enxofre, como é o caso da *Acidithiobacillus thiooxidans* e a *Acidithiobacillus caldus* e as oxidantes de enxofre e ferro, como a *Acidithiobacillus ferrooxidans* (WANG et al., 2019).

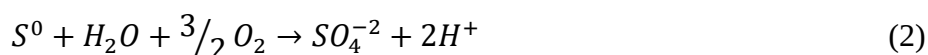
Graças aos seus processos metabólicos, esses microorganismos são capazes de gerar ácido sulfúrico (H₂SO₄) e íons férricos (Fe⁺³) que elevam a acidez e o poder oxidante do meio solubilizando os sulfetos (BOSECKER, 1997; PATHAK; MORRISON; HEALY, 2017). Apesar de ambas características desempenharem importantes funções na solubilização dos metais, as oxidantes de enxofre tem o maior impacto na geração de um ambiente extremamente ácido e na permanência dos metais em solução (JOHNSON, 1998; JOHNSON; HALLBERG, 2008). Como o presente trabalho estuda a ação da *At. thiooxidans*, detalhes sobre essa bactéria serão discutidos a seguir.

2.3.1 *Acidithiobacillus thiooxidans*

A *At. thiooxidans* – primeiro acidófilo a ser descrito (MCLEAN, 1918) – é uma bactéria mesófila capaz de crescer em uma faixa de temperatura ótima entre 28 e 30 °C e tolerar ambientes com pH entre 0,5 e 6. Por ser um microorganismo oxidante de enxofre é

majoritariamente encontrado em cavernas sulfídricas, drenagem ácida de minas, pilhas de lixiviação minerais e em outros ambientes ácidos ricos em enxofre (JOHNSON; HALLBERG, 2008; YANG et al., 2019).

Essa bactéria utiliza a energia derivada da oxidação do enxofre elementar e dos compostos reduzidos de enxofre inorgânico para apoiar o seu crescimento autotrófico, sendo o S^{-2} , S^0 e o $S_2O_3^{-2}$ os mais utilizados como fonte energética. A reação acontece na presença do oxigênio atmosférico que é usado pela *At. thiooxidans* como acceptor dos elétrons da oxidação e pode ser descrito de acordo com a cinética das equações a seguir (GARCIA JR, O.; BEVILAQUA, 2008; YANG et al., 2019).



A partir da oxidação completa do enxofre, concentrações de íons H^+ e sulfato (SO_4^{-2}) são geradas formando o metabólito primário, o ácido sulfúrico, que reduz significativamente o pH do meio, podendo alcançar valores abaixo de 1,0 (BOSECKER, 1997; CALLE-CASTAÑEDA, 2016). Como resultado, o ácido age enfraquecendo a ligação de íons metálicos de modo que esses podem passar para a solução em forma de sulfatos (BOSECKER, 1997; MISHRA; RHEE, 2014).

Nesse caso, diferentes formas podem ser conduzidas para alcançar a solubilização dos metais, sendo elas: *contact bioleaching* (biolixiviação de contato), que inclui métodos de *one-step* (uma etapa) e *two-step* (duas etapas), e *non-contact bioleaching*, sem contato. No mecanismo *contact-bioleaching*, o material a ser lixiviado é adicionado simultaneamente a bactéria, que se adere à superfície mineral formando biofilmes e o oxida. Assim como, no processo em duas etapas, o material é adicionado após o pré-cultivo das células com compostos de enxofre garantindo o crescimento ideal dessas e a produção de ácido (FAZZINI; LEVICAN; PARADA, 2011; RASOULNIA; BARTHEN; LAKANIEMI, 2021).

Em contrapartida no *non-contact bioleaching*, a bactéria é cultivada na ausência do material e, após a produção máxima de ácido, o meio é filtrado ou esterilizado e adicionado ao material a ser lixiviado (RASOULNIA; BARTHEN; LAKANIEMI, 2021). Embora ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, sabe-se que o crescimento e a atividade

metabólica da bactéria podem ser retardados quando cultivados com os metais, devido à toxicidade desses. Logo, a separação espacial da produção do ácido e da lixiviação, como em um biorreator, pode ser útil para diminuir o tempo do bioprocessamento e auxiliar operações como tanques, colunas ou pilhas (MAHMOUD et al., 2017; RASOULNIA; BARTHEN; LAKANIEMI, 2021).

2.4 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO

O ácido sulfúrico é um dos principais produtos químicos mais fabricado em volume industrial do mundo. O composto é crucial em diversos processos como na produção de fertilizantes fosfatados, na sulfonação para geração de produtos químicos orgânicos e, sobretudo, na extração de metais pela hidrometalurgia (YANG et al., 2020). A indústria de mineração chilena, por exemplo, é a principal usuária desse produto e no ano de 2020 teve um consumo superior a 8 milhões de toneladas (DE OLIVEIRA et al., 2014; VÉLIZ; GONZÁLEZ, 2020).

Diante disso, a produção microbiana desse ácido passa a ser uma alternativa relevante para a indústria mineradora visto que os preços dessa commodity podem variar consideravelmente dependendo da demanda e da localização dos processos (BRIERLEY, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014). Sem contar ainda com o fato de que a produção convencional do ácido envolve a combustão do enxofre sob altas temperaturas e, portanto, requer procedimentos complexos e sistemas para tratamento de névoas ácidas (YANG et al., 2020).

Logo, uma das vantagens dessa biotecnologia é gerar o ácido no local dos processos a partir de uma fonte relativamente barata, como o enxofre elementar, reduzindo os gastos com a compra e produção do reagente. Assim como representa uma técnica potencialmente mais segura e prática, eliminando os riscos significativos de acidentes durante o transporte do ácido concentrado para as plantas comerciais, geralmente, localizadas em áreas remotas e de difícil acesso (PAKOSTOVA; JOHNSON, 2019).

No entanto, por ser uma alternativa biológica, os fluxos de ácido sulfúrico produzidos são diluídos e levam um longo período para serem gerados (DE OLIVEIRA et al., 2014). Em virtude disso, trabalhos investigando a cinética do crescimento microbiano, a oxidação de enxofre (GOURDON; FUNTOWICZ, 1998; KONISHI; ASAI; YOSHIDA, 1995; TICHÝ et al., 1998) e a otimização dos parâmetros envolvidos no processo (LIU; LAN; CHENG, 2004; PLUMB; MUDDLE; FRANZMANN, 2008), surgiram com intuito de aprimorar a tecnologia.

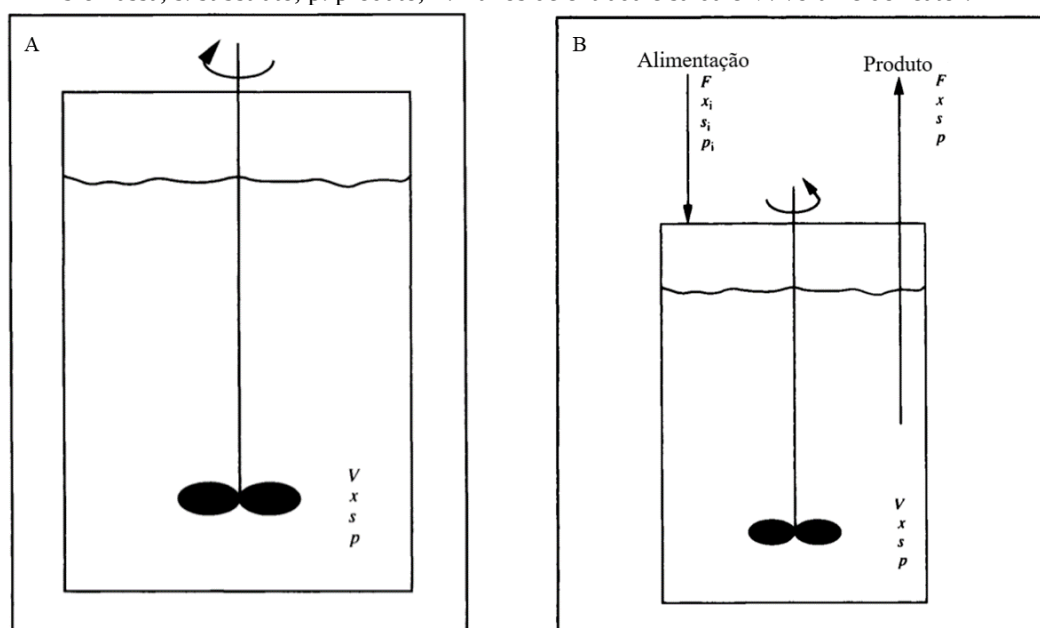
Além desses estudos, pesquisas com o interesse em explorar a biooxidação do enxofre em biorreatores gerando um fluxo “manufaturado” de ácido sulfúrico também estão sendo aos poucos estudadas (DE OLIVEIRA et al., 2014).

2.4.1 Biorreatores de tanque agitados

Nas últimas décadas, processos biohidrometalúrgicos de recuperação dos metais de minerais sulfetados envolvendo a tecnologia de biorreatores de tanques agitados (STR), desenvolveram-se rapidamente tornando um procedimento bem estabelecido na escala industrial. Esses são equipados com sistemas de impelidores que fornecem uma transferência eficiente de O_2 e CO_2 e mantêm os minerais moídos e concentrados em suspensão permitindo, dessa forma, melhor desempenho da atividade microbiana e recuperação dos metais (MAHMOUD et al., 2017).

Dentre esses reatores, destacam-se aqueles que operam em modo batelada, no qual o substrato é adicionado no início do processo e o produto é retirado apenas no fim; e em modo contínuo, o qual permite fluxos de entrada e saída de substrato, produto e biomassa (Figura 1) (DORAN, 1995). Do ponto de vista da engenharia, o bioprocesso é normalmente operado em um circuito de tanques dispostos em série e/ou em paralelo, onde um fluxo contínuo de nutrientes e substrato é adicionado ao primeiro tanque e transbordado para os tanques seguintes (KAKSONEN et al., 2018; MAHMOUD et al., 2017).

Figura 1. Representação de reatores de tanque agitado em modo batelada (A) e em modo contínuo (B), onde x: biomassa, s: substrato, p: produto, F: fluxos de entrada e saída e V: volume do reator.



Fonte: adaptado de Doran (1995).

Como grandes quantidades de materiais são processadas na biohidrometalurgia, os biorreatores costumam ser operados de forma contínua em busca de promoverem uma alta produtividade volumétrica mantendo o volume do tanque baixo. Esses sistemas ainda tem como vantagem o controle de diversos parâmetros essenciais como temperatura, pH, aeração, agitação e o tempo de residência das partículas no biorreator, o que torna a tecnologia mais eficiente (ACEVEDO, 2000; MAHMOUD et al., 2017).

No caso da bioprodução do ácido, o controle de certas condições nos biorreatores de tanque agitado favorecem uma produção massiva do metabólito e melhor crescimento do microrganismo (ALZATE, 2018). Condições como a área de superfície do enxofre, a acidez, homogeneidade e entre outros fatores podem ser identificados e otimizados com objetivo de minimizar o tempo de produção e aumentar a produtividade (CERRUTI; CURUTCHET; DONATI, 1998; DEVECI; AKCIL; ALP, 2003).

Pakostova e Johnson (2019), a exemplo, estudaram o potencial da produção microbiana de ácido sulfúrico em biorreatores do tipo CSTR (Volume = 2,3 L), operando sob um pH fixo e duas temperaturas diferentes. Através dos estudos, os autores identificaram que as taxas mais rápidas de produção do ácido nas condições testadas foram obtidas em biorreatores a 30 °C e pH 1. Como também verificaram que a acidez do meio poderia ser aumentada em mais de 90% adicionando um afluente suplementado com 200 mM de sulfato de magnésio (pH 3).

Yang e colaboradores (2020), por sua vez, otimizaram a produção de ácido através da remoção contínua de enxofre elementar de um lodo sulfuroso proveniente da dessulfurização de gás natural. Para isso, foi utilizado um biorreator de membrana (MBR) contínuo, tecnologia capaz de reter a biomassa na parede das membranas, em escala industrial (Volume = 10 m³). Dessa forma, os autores demonstraram que sob condições otimizadas (Temperatura: 33,6 °C, Taxa de aeração: 3,1 m³ min⁻¹, Agitação: 83 rpm) uma alta atividade bacteriana e eficiência de produção de ácido foram alcançadas no biorreator após 20 dias de ensaio.

Apesar dos estudos descritos acima, as pesquisas dedicadas a analisar e otimizar a produção biológica do ácido sulfúrico em biorreatores são bastante escassas na literatura, principalmente, em modo contínuo. Por essa razão, este trabalho tem como foco entender esse bioprocessos e os principais desafios de produzir o ácido biológico em biorreatores de tanque agitado operando de forma contínua.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Otimizar a capacidade de produção do ácido sulfúrico pelo microrganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* em reator de tanque agitado.

3.2 ESPECÍFICO

- Estudar a produção de ácido sulfúrico pela *Acidithiobacillus thiooxidans* em diferentes condições de meio de cultura em agitador rotativo e determinar a influência da suplementação do meio de cultura com elementos traço;
- Estudar a produção do ácido sulfúrico em reator de tanque agitado operando em modo batelada e contínuo;
- Avaliar a influência do pH inicial, agitação e tempo de residência hidráulica do meio visando melhor eficiência no processo de biooxidação do enxofre elementar no biorreator operando em modo contínuo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Para os ensaios de produção do ácido sulfúrico foi utilizada a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* linhagem FG-01, isolada de um efluente ácido de mina de urânio em Figueira-PR (GARCIA JÚNIOR, 1991) e pertencente ao banco de linhagens do laboratório de Biohidrometalurgia, no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP.

4.1.1 Condições de crescimento

O crescimento e os ensaios deste trabalho foram realizados usando as seguintes soluções: meio de cultura 9K (Tabela 1), descrito por Silverman e Lundgren (1958), e solução de elementos traços de Allen do meio DSMZ 88 *Sulfolobus* (Tabela 2). Todos os experimentos foram suplementados com 1% (m/v) de enxofre elementar, fonte energética da bactéria utilizada no presente trabalho.

Tabela 1. Composição do meio de cultivo

Componente	Meio 9K
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,1 g
Água destilada	1000 mL
pH	2,8

Fonte: Autor.

Tabela 2. Composição da solução de elementos traços de Allen (10x concentrado).

Componente	Solução traço (10x)
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	180 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	450 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	22 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	5 mg
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	3 mg
VOSO ₄ · 2 H ₂ O	3 mg
CoSO ₄	1 mg
Água destilada	100 mL
pH	2

Fonte: Autor

As soluções e o enxofre foram preparados separadamente, sendo o meio 9K esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos e o enxofre elementar submetido a 110 °C por 1 hora. A fim de evitar a oxidação dos elementos traços, a solução não foi submetida a autoclave. Durante o preparo de cada ensaio, o enxofre e a solução traço foram adicionados e misturados com meio de cultivo 9K.

4.1.2 Repique da *Acidithiobacillus thiooxidans* em meio com enxofre elementar

Foi realizado previamente o repique da linhagem bacteriana em meio 9K suplementado com enxofre elementar para ser utilizada como inóculo nos ensaios em agitador rotativo. Para isso, a bactéria foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL do meio de cultura, 1 g de enxofre e 10% (v/v) de solução estoque de *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01. Os frascos foram mantidos a uma agitação à 150 rpm e temperatura igual a 30 °C em uma mesa incubadora termoeletrônica (New Brunswick Scientific, C25KC) durante 15 dias.

A evaporação do meio líquido dos ensaios foi estimada pela perda de massa e compensada através da adição de água deionizada estéril a cada 2 e 3 dias. O crescimento da bactéria foi monitorado através da leitura do pH a partir do pHmetro de bancada PG 1800 (Gehaka®) previamente calibrado à temperatura ambiente.

4.2 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO

4.2.1 Ensaio em agitador rotativo

Para a produção de ácido sulfúrico foram avaliados dois meios de cultivos: ensaios contendo apenas o meio 9K e ensaios contendo o meio 9K suplementado com 0,1% (v/v) da solução traço. Os experimentos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo um volume de 100 mL dos meios de cultura suplementados com 1 g de enxofre elementar e 10% (v/v) de inóculo. Os frascos foram submetidos a uma agitação à 150 rpm e uma temperatura de 30 °C em uma mesa incubadora termostática (New Brunswick Scientific, C25KC) por 21 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A evaporação do meio líquido dos ensaios foi estimada pela perda de massa e compensada através da adição de água deionizada estéril a cada 2 e 3 dias. Durante esse controle, 3 mL de alíquotas foram retiradas para determinar a concentração de ácido total e os valores de pH do meio a fim de analisar a influência da solução traço no crescimento da *At. thiooxidans* e a produção do ácido.

4.2.2 Análise das amostras

Leitura do pH

A leitura do pH das alíquotas coletadas dos frascos foi efetuada a partir do pHmetro de bancada PG 1800 (Gehaka®) previamente calibrado à temperatura ambiente.

4.2.2.1

Ensaio de titulação ácido-base

A concentração de ácido total em solução foi determinada por meio da titulação volumétrica de neutralização. Para isso, amostras de 1 mL foram tituladas em um frasco Erlenmeyer (125 mL) com o auxílio de uma bureta de 10 mL contendo 0,1 mol L⁻¹ de solução de hidróxido de sódio (NaOH). Esse foi previamente padronizado com uma solução padrão primária de 0,01 mol L⁻¹ de biftalato de potássio (C₈H₅KO₄) e indicada através da adição de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄).

O volume do titulante na bureta foi anotado e a concentração de ácido e possíveis íons H⁺ em solução obtidos a partir da Equação 4.

$$C_{amostra} = \frac{C_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{V_{amostra}} \quad (4)$$

Onde, $C_{amostra}$: concentração de ácido total na amostra (mol L⁻¹);

$V_{amostra}$: volume da amostra (mL);

C_{NaOH} : concentração de NaOH (mol L⁻¹);

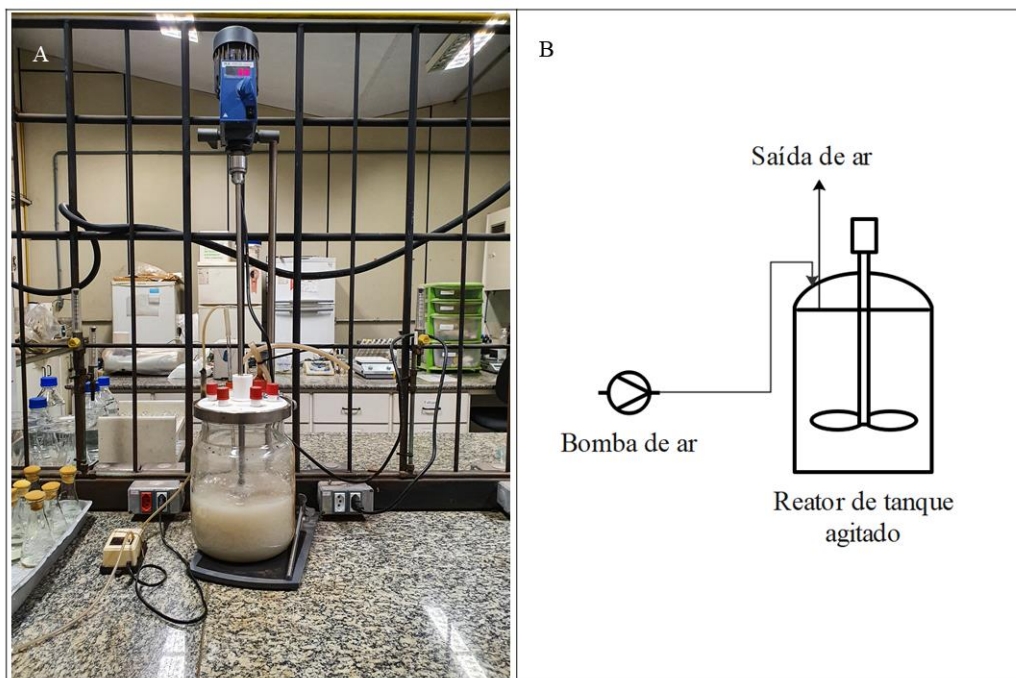
V_{NaOH} : volume de NaOH (mL).

4.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO EM BIORREATOR

4.3.1 Ensaio em modo batelada

Para determinar a produção do ácido no biorreator e avaliar o comportamento da bactéria *At. thiooxidans* nesse ambiente, os experimentos foram inicialmente operados em modo batelada. O biorreator utilizado nesta operação (Figura 2) consiste em um tanque agitado de vidro com capacidade para 5 L e equipado com duas chicanas, um compressor de ar (Hao Mai d-3000) e um agitador de hélice (IKA RW 20 Digital).

Figura 2. Imagem do biorreator para a bioprodução do ácido em modo batelada (A) e desenho do sistema de bioprodução do ácido em modo batelada (B).



Fonte: Autor.

Para a realização do ensaio, um volume útil de 3 L de meio de cultura 9K esterilizado (pH inicial 1,8) suplementado com 0,1% (v/v) de solução traço, 30 g de enxofre elementar e 10% (v/v) do inóculo foi completado no tanque. Esse foi operado em modo batelada sob agitação mecânica entre 60 e 70 rpm com o auxílio de um impelidor do tipo hélice naval (fluxo descendente) e mantido à temperatura ambiente. Como a aeração do meio foi improvisada com uma bomba de aquário (Hao Mai d-3000), a vazão da injeção de ar não foi controlada.

Em razão do biorreator apresentar saída de ar, a evaporação do meio líquido foi estimada pelo nível do meio marcado e recompensado com água deionizada a cada 2 e 3 dias. Nesse mesmo período, alíquotas de 5 mL foram retiradas com o objetivo de avaliar a concentração de ácidos totais, valores de pH e a concentração celular do meio. As análises de concentração de ácido e pH das amostras obtidas do biorreator foram efetuadas pela mesma metodologia descrita no item 4.2.2.

4.3.2 Cálculo da produtividade fermentativa

As produtividades dos cultivos são geralmente utilizadas como parâmetro para avaliar a capacidade de produção e otimizar um determinado bioprocessos (DORAN, 1995). Sendo assim, a produtividade volumétrica em ácido sulfúrico do experimento em batelada foi determinada através da Equação 5.

$$Q_p = \frac{(P_t - P_o)}{t} \quad (5)$$

Sendo, Q_p : produtividade volumétrica em ácido sulfúrico ($\text{mol L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$);

P_t : concentração de ácido sulfúrico final (mol L^{-1});

P_o : concentração de ácido sulfúrico inicial (mol L^{-1});

t : tempo de cultivo (dia).

4.3.3 Determinação da concentração celular em solução

A concentração de células na fase líquida do biorreator foi determinada através da quantificação do número total de células bacterianas em uma câmara de Neubauer. A câmara consiste em uma lâmina de vidro grossa com dimensão de 30 mm x 70 mm e 4 mm de espessura e separada em duas grades de contagem que podem ser carregadas independentemente (BASTIDAS, 2013), como ilustrado na Figura 3.

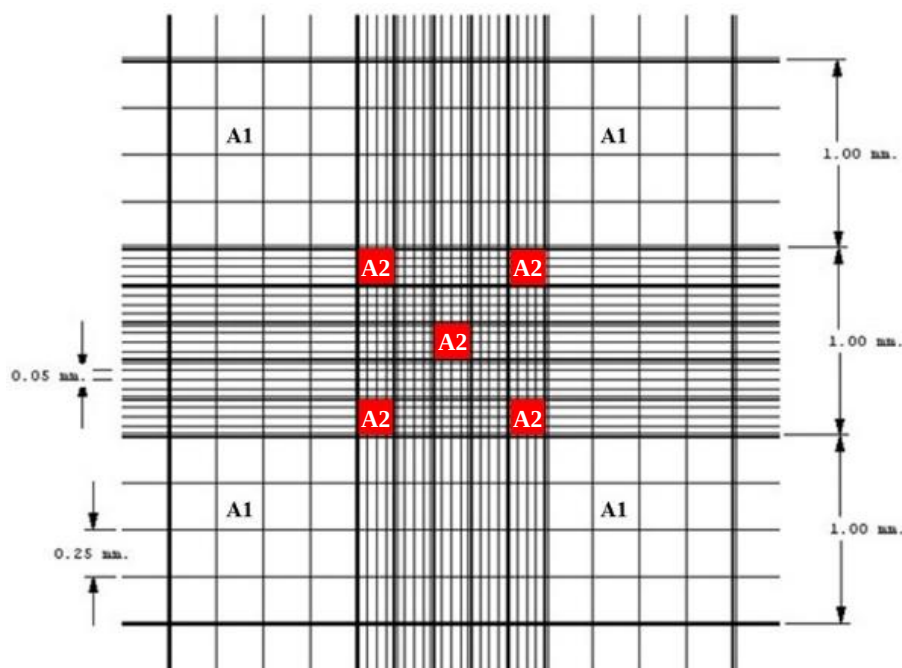
Figura 3. Imagem de uma Câmara de Neubauer.



Fonte: Bastidas (2013).

Cada uma dessas grades tem 3 mm x 3 mm de tamanho e é subdividida em nove quadrantes, onde as células eucariontes são contadas nas áreas indicadas pela área 1 (A1) e as procariontes e outras estruturas menores são contadas no quadrante central, representado pela área 2 (A2) (Figura 4). Este quadrante possui 25 quadrados, onde cada um deles é dividido em 16 quadrados menores de área $0,0025 \text{ mm}^2$ e profundidade de 0,100 mm (BASTIDAS, 2013).

Figura 4. Grade de contagem da Câmara de Neubauer.



Fonte: adaptado de EMS team (2019).

No caso deste trabalho, os 5 quadrados marcados em vermelho no quadrante central (Figura 4) foram utilizados para a contagem de células e determinação da concentração celular (número de células mL^{-1}) das amostras através da Equação 7.

$$\text{Concentração celular} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Números de quadrados}} \cdot 250.000 \cdot \text{diluição} \quad (6)$$

Normalmente, a faixa de concentração para contagem de células na câmara de Neubauer é entre 250.00 células mL^{-1} a 2,5 milhões de células mL^{-1} . Em concentrações abaixo de 250.000 a quantidades de células contadas não é o suficiente para obter uma estimativa justa da concentração original. Já em concentrações acima de 2,5 milhões, a probabilidade de erros e tempo e esforço necessários aumentam, sendo assim, necessário diluir a amostra para obter uma concentração final mais próxima do ideal (BASTIDAS, 2013).

Método de contagem de células

Para a determinar o número de células, um volume de 10 µL das amostras foi pipetado entre a câmara de Neubauer e uma lamínula de vidro, sendo necessário após 16 dias de ensaios, diluir as amostras em 1:100 devido a elevada quantidade de células presentes no meio. Após o líquido penetrar por capilaridade na câmara, a contagem foi feita em um microscópio óptico (*Olympus*) que possui 4 objetivas de aumento (x4, x10, x40 e x100). Para contar as células foi utilizada a objetiva x100 aplicando o óleo de imersão e adotado o método de contagem em zigue zague para facilitar o processo.

Curva de crescimento celular

A partir da concentração celular, foi possível construir uma curva de crescimento da *At. thiooxidans* em relação ao tempo de cultivo e determinar suas fases. No caso de processos em modo batelada, há inicialmente uma fase denominada de “lag”, na qual a taxa de crescimento é próxima de zero e essa é seguida por uma fase exponencial, onde as células crescem na mesma taxa de crescimento específico (descrita pela Equação 8) (DORAN, 1995).

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (7)$$

Onde, x : concentração de células em solução (células mL⁻¹);

t : tempo de cultivo (dia);

μ : constante específica de crescimento celular (dia⁻¹).

Na fase exponencial, o μ é constante com o tempo e máximo ($\mu_{\text{máx}}$) e, dessa forma, permite uma integração simples resultando na Equação 9.

$$\mu = \frac{\ln(X_t) - \ln(X_o)}{t - t_o} \quad (8)$$

Sendo, X_t : concentração final de células (células mL⁻¹);

X_o : concentração inicial de células (células mL⁻¹);

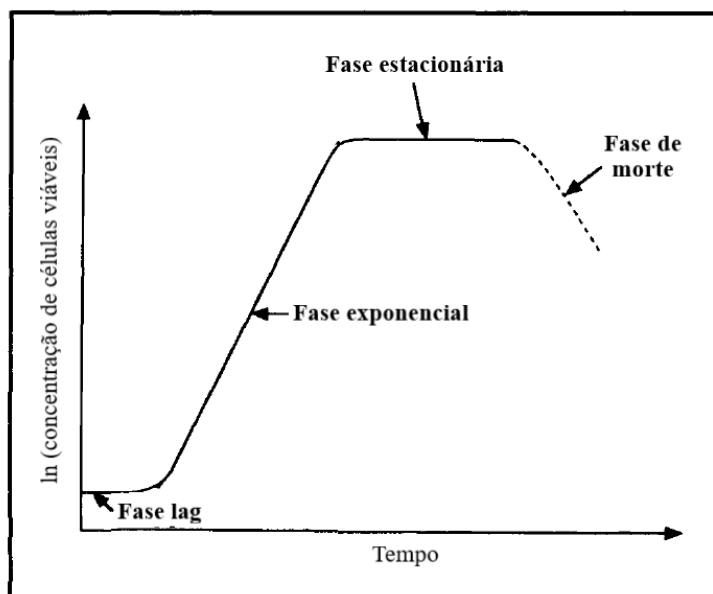
t : tempo final da fase exponencial (dia);

t_o : tempo inicial da fase exponencial (dia).

Em razão das células não crescerem de forma indefinida em ambiente fechado (descontínuo), o crescimento dessas diminui entrando na fase estacionária e, posteriormente,

sofrem um declínio populacional (fase de morte) (DORAN, 1995). Sendo assim, as fases de crescimento das células no experimento em batelada devem apresentar um comportamento semelhante ao observado na Figura 5.

Figura 5. Curva de crescimento das células em processo batelada.



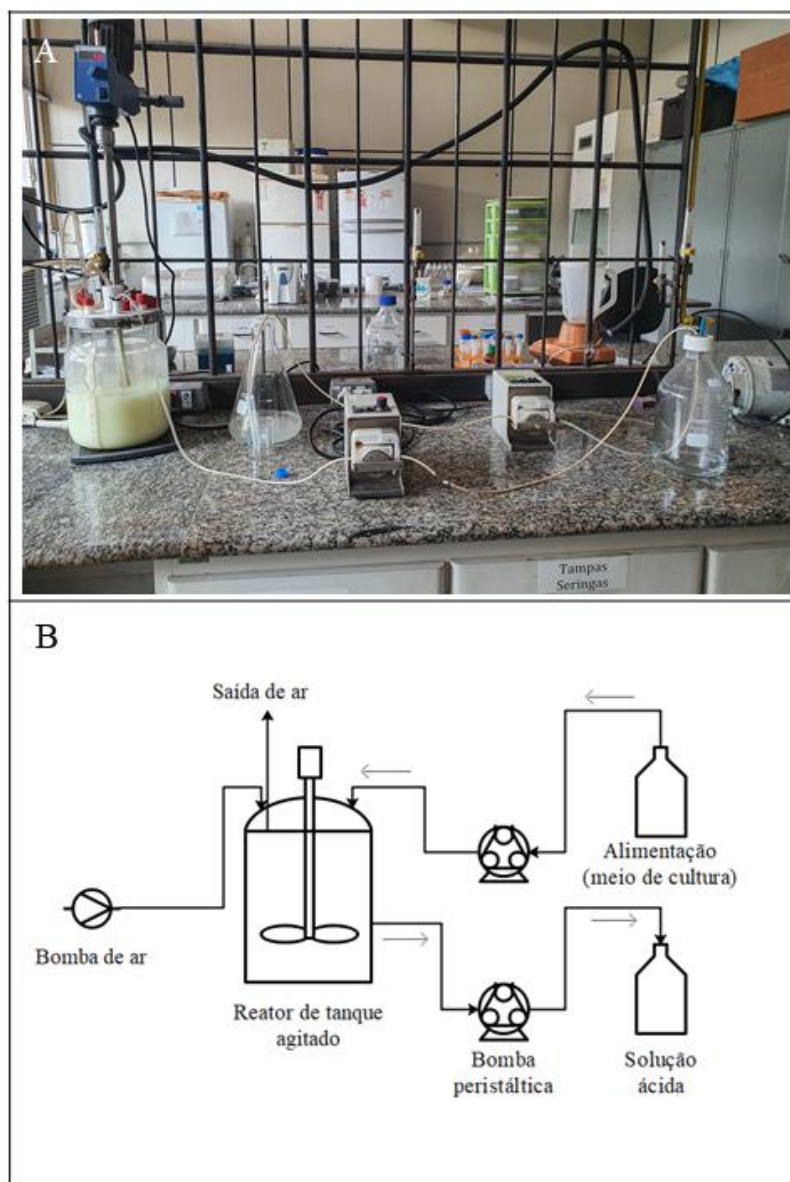
Fonte: adaptado de Doran (1995).

4.4 OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO EM BIORREATOR

4.4.1 Ensaio em modo contínuo

Com objetivo de gerar um fluxo otimizado de ácido sulfúrico, um sistema contínuo foi montado para estudar parâmetros como agitação, pH inicial e tempo de residência hidráulica visando aprimorar o bioprocessos. Para isso, foi utilizado o mesmo sistema em batelada descrito no item 4.3.1, porém, equipado com duas bombas peristálticas modelo Ismatec® REGLO Analog MS-4/8 e mangueiras Masterflex® Norprene Food L/S Tubing (diâmetros internos: 0,8, 4,8 e 7,9 mm) para alimentar o reator e realizar a coleta do meio acidificado, conforme está representado na Figura 6.

Figura 6. Imagem do biorreator para a bioprodução do ácido em modo contínuo (A) e desenho do sistema de bioprodução do ácido em modo contínuo (B).



Fonte: Autor

O ensaio foi realizado com um volume de 3 L de meio 9K esterilizado (pH inicial 1,8) suplementado com 0,1% (v/v) de solução traço e 30 g de enxofre elementar. A quantidade do inóculo foi dobrada (passando a ser 20% em volume) para garantir o crescimento seguro da bactéria evitando a lavagem das células para fora do tanque. Para esse procedimento, o cultivo foi mantido inicialmente em modo batelada até que se alcançasse o ponto mais próximo da concentração máxima de ácido sulfúrico atingida no ensaio descrito no item 4.3.1. O experimento foi realizado sob agitação mecânica entre 60 e 70 rpm com o auxílio de um impelidor do tipo hélice naval (fluxo descendente) e mantido à temperatura ambiente.

Após esse período, deu-se início a operação em modo contínuo fornecendo como afluente o meio de cultura fresco (Meio 9K suplementado com elementos traços) e coletando o caldo de cultivo do biorreator que consiste em uma mistura de meio de cultura pobre em nutrientes, *At. thiooxidans*, enxofre não consumido e ácido sulfúrico produzido. Ambos os fluxos do biorreator (alimentação e saída) foram operados a vazão volumétrica igual a 0,16 L dia⁻¹ (determinada a partir da Equação 11), a fim de atingir um regime estacionário para o sistema.

Para isso, as vazões das bombas foram determinadas através de testes realizados com água, onde o tempo que o efluente enchia uma proveta de 5 mL foi cronometrado e a vazão determinada com a Equação 10.

$$F = \frac{V_p}{t_c} \quad (9)$$

Onde, F : vazão de entrada e saída do meio de cultura no biorreator (L dia⁻¹);

V_p : volume preenchido na proveta (L);

t_c : tempo cronometrado para preencher a proveta (dia).

As vazões determinadas foram controladas e a partir delas foi possível definir o tempo de residência do biorreator através da Equação 11.

$$\theta = \frac{V}{F} \quad (10)$$

Sendo, θ : tempo de residência (dia);

V : volume do biorreator (L);

F : vazão de entrada do meio de cultura no biorreator (L dia⁻¹);

Como as partículas do fluido (substratos, microrganismos) seguem diferentes rotas para passar pelo biorreator, essas requerem períodos diferentes para passar pelo tanque agitado. Dessa forma, o tempo de residência hidráulica é determinado com o objetivo de indicar o valor médio em que essas partículas saem do biorreator (PENG, 1994).

A cada 2 dias, amostras de 5 mL foram retiradas para determinar a concentração de ácidos totais e valores de pH (metodologia descrita no item 4.2.2.) do meio. Entretanto, devido a problemas operacionais apresentados pelas mangueiras do sistema durante o cultivo em modo contínuo, não foi possível analisar o desempenho de produção de ácido pela bactéria

e realizar a otimização do pH inicial, do tempo de residência e da agitação. Porém, observou-se que a configuração do reator apresentava alguns problemas e, portanto, serão apresentados nos resultados algumas formas de otimizar o processo em relação a essa questão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

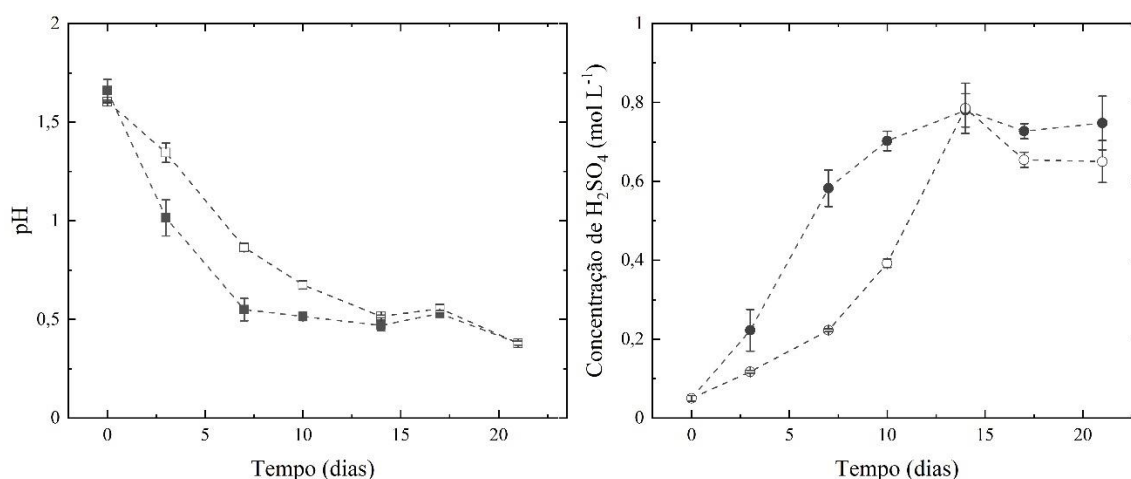
5.1 BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO

5.1.1 Ensaio em frascos

A variação do pH da cultura e a concentração de ácido total dos frascos durante o crescimento bacteriano sob a influência dos meios de cultivo é mostrada na Figura 7. Sabe-se que a bioprodução do ácido sulfúrico é um processo associado ao crescimento da *Acidithiobacillus thiooxidans* e, portanto, esse produto é o seu metabólito primário. Sendo assim, uma forma de avaliar o desenvolvimento das células nos ensaios é justamente através do monitoramento da produção de ácido no meio (CALLE-CASTAÑEDA; MÁRQUEZ-GODOY; HERNÁNDEZ-ORTIZ, 2018).

Desse modo, a partir das análises dos resultados, foi possível observar que ambos os ensaios apresentaram a tendência de decréscimo do pH e aumento da concentração de ácido no meio. No entanto, notou-se que a *At. thiooxidans* cultivada no meio 9K apresentou um crescimento inicial mais acelerado que aquela cultivada no meio suplementado com solução traço. Após 7 dias de ensaio foi observado que o pH dos frascos contendo apenas a solução 9K começa a estabilizar e já apresenta uma concentração igual a $0,70 \pm 0,03 \text{ mol L}^{-1}$. Enquanto os frascos contendo a solução traço exibiram um pH maior ($0,68 \pm 0,02$) e uma concentração de ácido relativamente menor ($0,39 \pm 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) quando comparado a condição anterior.

Figura 7. Valores de pH e concentração de H_2SO_4 cumulativa em função do tempo de cultivo da *At. thiooxidans* FG-01 em agitador rotativo nas condições contendo apenas meio 9K (símbolos fechados) e meio 9K suplementado com solução traço (símbolos abertos).



Fonte: Autor.

A solução de elementos traços é geralmente utilizada para obter um melhor crescimento microbiano em condições de laboratório. Muitos dos metais de transição como o zinco (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni) e Cobalto (Co) estão presentes nesta solução e são fundamentais para o metabolismo dos microrganismos contribuindo com a estrutura e formação das enzimas. Entretanto, sabe-se que esses elementos em elevadas concentrações podem ser tóxicos para as células que não apresentam o mecanismo de tolerância a esses metais e afetar o crescimento das mesmas (LEVETT; GLEESON; KALLMEYER, 2021).

No caso dos ensaios realizados, essa toxicidade dos metais não tem um efeito significativo devido a característica da *At. thiooxidans* em tolerar altas concentrações de metais e pelo fato da concentração adicionada ser baixa (100 µL). Dessa forma, acredita-se que a ausência de um repique da bactéria com a solução traço antes de realizar o ensaio em agitador rotativo tenha contribuído com as diferenças observadas entre as duas condições. Isso porque o repique poderia fornecer um tempo mais adequado para a produção do maquinário enzimático da bactéria.

Esse argumento é corroborado quando se verifica que mesmo apresentando comportamentos distintos, ambas condições tiveram a mesma capacidade de produção de ácido e alcançaram concentrações máximas próximas (Meio 9K: $0,78 \pm 0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e Meio 9K + solução traço: $0,79 \pm 0,06 \text{ mol L}^{-1}$) no 14º dia de experimento.

Apesar dos resultados alcançados, os ensaios em biorreatores foram realizados com o meio 9K suplementado com solução traço pois este experimento foi realizado posteriormente ao ensaio em biorreator em modo batelada devido a problemas relacionados com o inóculo. A escolha para utilizar o meio com solução traço foi baseada em resultados observados pelo grupo de pesquisa anteriormente.

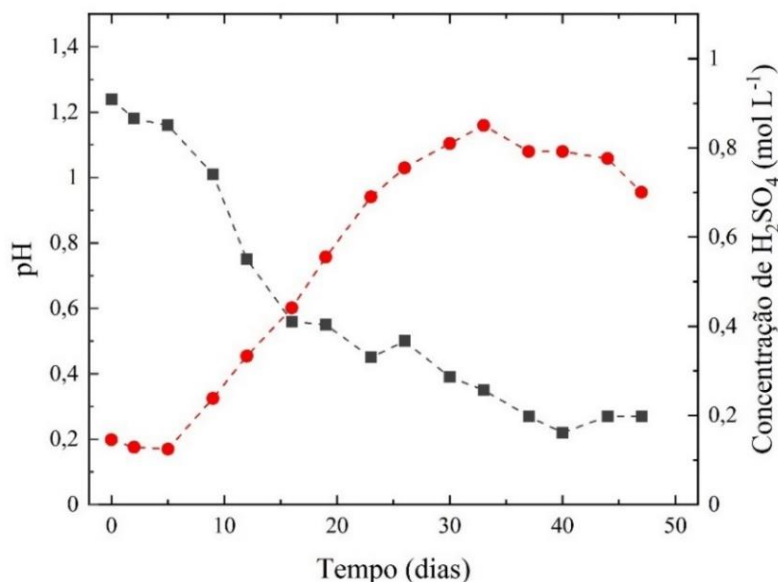
5.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO EM BIORREATOR

5.2.1 Produção em modo batelada

A Figura 8 mostra o resultado da produção de ácido obtida no biorreator operando em modo batelada quanto ao pH e a concentração de ácido total e a Figura 9 mostra o perfil da curva de crescimento da *Acidithiobacillus thiooxidans* ao longo de 47 dias de ensaio. Em relação ao pH, foi possível observar que esse diminuiu progressivamente de um valor inicial de 1,2 após 5 dias de cultivo até valores próximos de 0,3 e 0,2, resultando no aumento de

acidez do meio. A partir do 37º dia de experimento, o pH do reator começa a estabilizar indicando uma redução da produção de ácido.

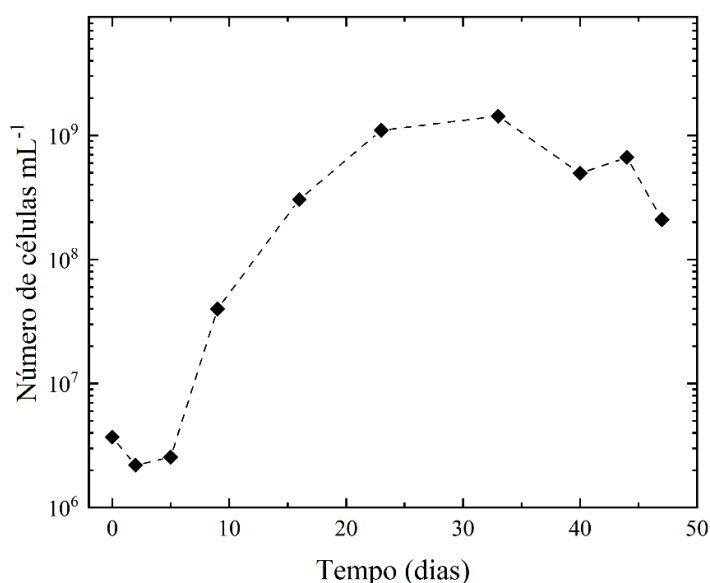
Figura 8. Valores de pH (■) e concentração de H₂SO₄ cumulativa (●) em função do tempo de cultivo da *At. thiooxidans* FG-01 em biorreator do tipo tanque agitado operando em modo batelada.



Fonte: Autor.

O ensaio foi iniciado com uma concentração equivalente a $3,7 \cdot 10^6$ células em solução e, no decorrer dos 5 primeiros dias, observou-se a fase de adaptação (fase lag) do microrganismo às condições do meio, visto que não foi constatado nenhum acréscimo significativo no número de células em suspensão. Esse longo intervalo de latência pode ter ocorrido em razão da *At. thiooxidans* crescer inicialmente aderida na superfície do enxofre (NAKAMURA; MIKI; AMANO, 1990) provocando, portanto, em baixas taxas de crescimento das células livres em solução.

Figura 9. Curva de crescimento da bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* FG-01 em função do tempo de cultivo (escala logarítmica).



Fonte: Autor.

Vale ressaltar que apenas as células em suspensão foram quantificadas através da metodologia da câmara de Neubauer e, portanto, o número de células aderidas ao enxofre foram desprezadas para descrever a cinética de crescimento da *At. thiooxidans*. Porém, acredita-se que à medida que as superfícies do enxofre se tornam saturadas, a concentração de células presentes na solução aumentou dando início a fase de crescimento exponencial a partir do 5º dia de experimento.

Quanto a formação de ácido sulfúrico foi observada uma acentuada taxa de produção no intervalo entre o 5º e 23º dia de ensaio (Figura 8), período em que se observa a fase de crescimento da *At. thiooxidans*. Nesse intervalo, a bactéria cresce a uma taxa específica igual a $0,30 \text{ dia}^{-1}$ ($R^2 = 0,91$) alcançando uma concentração celular de $1,1 \cdot 10^9 \text{ células mL}^{-1}$ e a produtividade volumétrica máxima em ácido sulfúrico ($0,02 \text{ mol L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$). Após esse período, a concentração celular e o ácido sulfúrico continuam sendo acumulados no biorreator, porém, sob uma menor taxa até atingirem uma concentração máxima de $0,85 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido e $1,4 \cdot 10^9 \text{ células mL}^{-1}$ em 33 dias de ensaio.

Posteriormente, é possível verificar que a concentração celular no biorreator sofreu um decréscimo apontando o início da fase de declínio de crescimento da *At. thiooxidans* e decréscimo na formação do metabólito. Isso ocorreu, provavelmente, pela redução da fonte de energia (enxofre) e nutrientes (meio de cultura) disponíveis para o crescimento da bactéria e

pelo acúmulo de ácido sulfúrico abaixando o pH do meio a valores inferiores ao limite que a *At. thiooxidans* suporta (pH = 0,3).

Ao comparar os resultados com a literatura, foi possível observar o potencial de produção de ácido que a *At. thiooxidans* apresentou neste estudo. Pakostova e Johnson (2019) ao realizarem um ensaio de produção de ácido sulfúrico em um biorreator de 2 L operando em modo contínuo suplementado com meio de cultura contendo sais basais e elementos traços (pH 2), consórcio microbiano e enxofre elementar (800 g) obtiveram uma concentração de ácido igual a 92 mM, concentração inferior ao valor obtido neste trabalho no modo batelada. Ao otimizarem o sistema com a adição de um efluente mais ácido, os autores alcançaram uma concentração de ácido sulfúrico gerado igual a 375mM, ainda inferior ao valor atingido no presente trabalho.

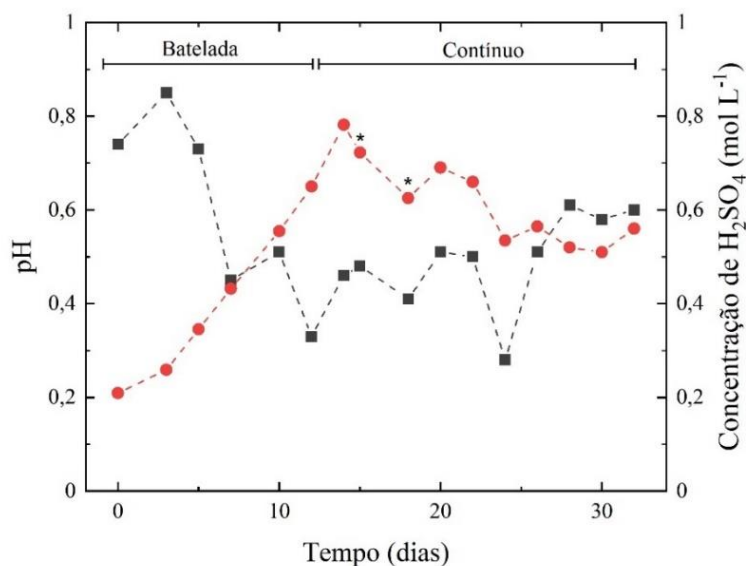
Com isso, é possível então verificar a razão pela qual se faz necessário estudar e otimizar o bioprocesso apresentado.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO

5.3.1 Produção em modo contínuo

A Figura 10 mostra o resultado da produção de ácido obtido para o sistema contínuo com relação aos valores de pH e concentração de ácido total no período de crescimento da biomassa e estabilização do reator. Foi possível identificar inicialmente, durante a operação em modo batelada, que a bactéria apresentou um crescimento imediato após ser inserida no biorreator gerando uma produção exponencial de ácido sulfúrico nos 12 primeiros dias de ensaio. Esse comportamento ocorreu, pois, o biorreator foi suplementado com uma quantidade maior de inóculo (20 % v/v) e esse provavelmente apresentava uma elevada concentração celular em solução, uma vez que o meio do ensaio anterior (descrito no item 4.3.1) foi utilizado como inóculo para este experimento.

Figura 10. Valores de pH (■) e concentração de H_2SO_4 cumulativa (●) em função do tempo de cultivo da *At. thiooxidans* FG-01 em modo contínuo. Os pontos marcados com (*) indicam o momento em que o fluxo foi desligado e a descarga do reator foi realizada para ajustar o volume do reator.



Fonte: Autor.

Após o período de crescimento da bactéria em uma cultura descontínua, o fluxo do afluente e efluente do biorreator foram ligados iniciando o processo contínuo. Esperava-se que após um determinado tempo operando, o biorreator atingisse um estado estacionário. Entretanto, notou-se que no 15º dia de ensaio, 3º dia após o início do processo contínuo, o nível de volume do meio tinha aumentado e o caldo de cultivo não estava sendo retirado do tanque, indicando que a mangueira da saída estava entupida. Acredita-se que esse entupimento tenha sido provocado pela combinação do acúmulo de enxofre elementar não consumido com o diâmetro pequeno da mangueira (Figura 11).

Figura 11. Imagem da mangueira utilizada no efluente do reator.



Fonte: Autor.

A razão para utilizar uma mangueira tão pequena deve-se ao fato da *Acidithiobacillus* apresentar uma taxa de crescimento e um rendimento de massa celular relativamente baixos (NAKAMURA; MIKI; AMANO, 1990) limitando, portanto, o uso de altas taxas de diluição. Por esse motivo, foi adotado um tempo de residência equivalente a 18,9 dias (Equação 10) e, consequentemente, uma vazão volumétrica igual a 0,16 L dia⁻¹ (Equação 9) para os fluxos do biorreator.

O tempo de residência é um parâmetro importante para esse experimento pois oferece maior estabilidade ao crescimento da bactéria. Isso porque um tempo de residência relativamente curto pode levar a lavagem das células para fora do biorreator afetando o desenvolvimento da população microbiana no meio (ASWEGEN; NIEKERK; OLIVIER, 2007). Como ainda não há registros bibliográficos com a proposta de cultivar a *At. thiooxidans* em biorreatores contínuos, optou-se por trabalhar com um tempo maior para depois otimizar esse parâmetro.

Outra questão observada, foi a diferença que as vazões de alimentação ($F_{\text{alimentação}} = 0,19 \text{ L dia}^{-1}$) e saída do meio ($F_{\text{saída}} = 0,16 \text{ L dia}^{-1}$) apresentavam durante esse período. Esse desequilíbrio ocorreu porque o afluente e efluente do reator estavam sendo operados inicialmente com a mesma bomba e não foi dada a devida atenção as diferentes viscosidades entre o meio de cultura e o caldo de cultivo.

Em vista disso, é possível observar no gráfico (Figura 10) que ambos os problemas afetaram negativamente a geração de ácido no biorreator, sendo necessário interromper o fluxo de alimentação e realizar a descarga do reator até voltar ao volume desejado (3 L). Consequentemente, verifica-se que a interrupção do fornecimento de nutrientes e substrato influenciou no crescimento da *At. thiooxidans* e o um possível aumento da taxa de diluição, ocasionado pelo aumento da vazão do afluente, pode ter lavado parte das células para fora do reator.

A fim de evitar esses problemas novamente, a mangueira do fluxo de saída foi substituída por uma com o diâmetro maior (Figura 12) e adicionado mais uma bomba peristáltica para igualar as duas vazões volumétricas (Figura 13).

Figura 12. Imagem da nova mangueira utilizada na troca.



Fonte: Autor

Figura 13. Imagem do sistema contínuo no início da operação (A) e imagem após realizar a troca da mangueira e igualar as vazões (B).



Fonte: Autor.

Após esse período, a operação do biorreator e a produção de ácido foram monitorados com mais frequência e no 28º dia de ensaio foi realizada a reposição de enxofre elementar, pois observou-se um declínio na produção de ácido devido à redução de substrato no meio. Porém, mesmo após a troca da mangueira, o efluente do reator voltou a ser afetado pela obstrução ocasionando no vazamento do caldo de cultivo do biorreator. Como provavelmente o incidente ocorreu durante à noite, todo o experimento foi perdido.

Figura 14. Vazamento da mangueira do efluente do biorreator durante o 32º dia de ensaio.



Fonte: Autor

5.3.2 Melhorias propostas para o sistema contínuo

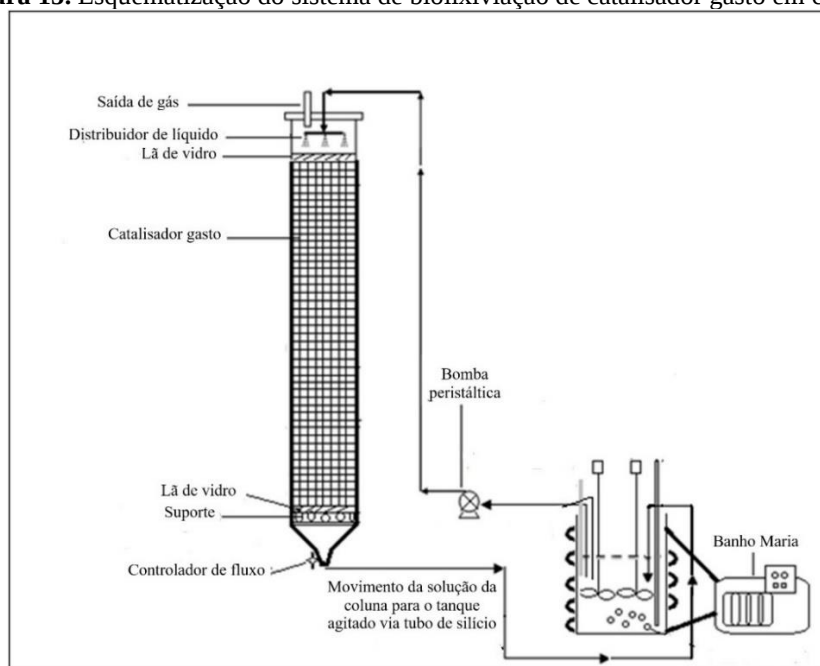
Com isso, verifica-se que o diâmetro das mangueiras utilizadas não foram ideais para o ensaio visto que há uma retirada contínua do enxofre em pó ocasionando no entupimento delas. Sendo assim, seria necessário estudar o processo em biorreatores com volumes maiores e avaliar como mangueiras de diâmetros superiores se comportam. Vale ressaltar também que para evitar a perda de todo o caldo de cultivo do biorreator durante a operação, seria necessário estabelecer um desnível entre o tanque e os reservatórios do meio de cultura e do ácido.

Outro fator importante que pode ser analisado também é o tipo de substrato fornecido. A exemplo, Pakostova e Johnson (2019) ao realizarem um estudo semelhante de produção de

ácido em biorreatores com volume de 2 L, utilizaram grânulos de enxofre elementar (2-3 mm de diâmetro) com a finalidade de garantir que esses fossem retidos no reator. Embora seja uma alternativa eficaz, os autores verificaram que esse substrato causou um impacto negativo na oxidação microbiana do enxofre e na retenção de biomassa. Isso porque a oxidação tem uma relação direta com a área de superfície do enxofre e, portanto, grânulos menores e enxofre coloidal promovem maior área para reatividade e fixação celular.

Dessa forma, verifica-se que o uso do enxofre elementar em pó não é o substrato ideal para a configuração contínua, sendo assim necessário estudar a permanência de outros tipos de enxofre (grânulo, pérolas, pastilhado) dentro do biorreator e a influência desses sob a atividade bacteriana. Pathak, Srichandan e Kim (2019), por sua vez, empregaram uma outra alternativa para o problema com o enxofre em pó durante o estudo de biolixiviação de um catalisador gasto em um reator de coluna alimentado com ácido biológico produzido em biorreatores do tipo CSTR (esquematisado na Figura 15). Os autores utilizaram uma esponja para tampar a saída do tubo do biorreator e evitar que as partículas de enxofre elementar fossem bombeadas para o reator de coluna junto com o ácido.

Figura 15. Esquematisação do sistema de biolixiviação de catalisador gasto em coluna.



Fonte: adaptado de Pathak, Srichandan e Kim (2019)

Além desses fatores, pode-se observar pelos estudos mencionados anteriormente que a melhor forma de retirar o caldo de cultivo é através do transbordamento do meio pela parte superior do biorreator uma vez que o enxofre se sedimenta facilmente podendo acumular na saída do efluente. Em vista disso, pode-se constatar que o enxofre é um fator crítico para a

operação em biorreatores de tanque agitado em modo contínuo. Por essa razão, mais estudos relacionados a montagem do sistema e o tipo de substrato fornecido são necessários para alcançar uma produção de ácido eficiente.

6 CONCLUSÃO

Através do estudo realizado da produção de ácido sulfúrico em frascos foi possível constatar que o meio de cultura 9K é eficiente para suprir o crescimento bacteriano sem a necessidade de utilizar um meio com elementos traço, o qual pode influenciar na viabilidade econômica do biorocesso em larga escala. Isso porque, como foi visto, após 7 dias de ensaio a concentração de ácido ($0,70 \pm 0,03 \text{ mol L}^{-1}$) no meio 9K já estava próxima da concentração máxima atingida ($0,78 \pm 0,04 \text{ mol L}^{-1}$), enquanto o meio suplementado com elementos traços ainda apresentava uma concentração relativamente menor ($0,39 \pm 0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

A montagem e a operação do biorreator em modo batelada proporcionaram resultados que permitiram determinar uma produção máxima de $0,85 \text{ mol de H}_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$ em 33 dias de ensaio e indicaram o bom desempenho da *At. thiooxidans* em escala de bancada. Entretanto, devido as características da operação batelada não é possível manter a produção do ácido e as células viáveis. Desse modo, uma forma de manter o nível do meio e gerar um fluxo de ácido constante é operar o biorreator em modo contínuo.

No entanto, foi possível identificar através deste trabalho que essa configuração apresenta alguns problemas que devem receber maior atenção, como o diâmetro da mangueira, o tipo de enxofre utilizado e o posicionamento da instalação da mangueira do efluente. Dessa forma, não foi possível alcançar concentrações de ácido semelhantes as obtidas no modo batelada e atingir um fluxo de estado estacionário. Com isso, a principal conclusão deste estudo é a sobre o protocolo a ser estabelecido para estudos posteriores, recomendando-se: a) realizar mais estudos sobre o comportamento de biorreatores com volumes e mangueiras maiores; b) estudar a permanência de enxofres do tipo grânulos, pérolas ou pastilhado dentro do biorreator e como esses influenciam na atividade da *At. thiooxidans*; c) após constatar as melhorias na engenharia do biorreator e no substrato fornecido, otimizar os parâmetros do bioprocso a fim de se alcançar uma maior produtividade de ácido em sistemas contínuos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, F. The use of reactors in biomining processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 184–194, 2000.
- AKCIL, A. et al. A review of metal recovery from spent petroleum catalysts and ash. **Waste Management**, v. 45, p. 420–433, 2015.

ALZATE, M. N. E. **Tratamiento de minerales de fósforo a partir de ácido biogénico producido por *A. thiooxidans***. Maestría en Ingeniería: Materiales y Procesos. Universidad Nacional de Colombia, 2018.

ASWEGEN, P. C. VAN; NIEKERK, J. VAN; OLIVIER, W. **Biomining**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

BASTIDAS, O. Cell Counting with Neubauer Chamber: Basic Hemocytometer Usage. **Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting**. 2013.

BOSECKER, K. Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 591–604, 1997.

BRIERLEY, C. L. Biohydrometallurgical prospects. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 3–4, p. 324–328, out. 2010.

CALLE-CASTAÑEDA, S. M. **Evaluación de la acidulación de roca fosfórica empleando la bacteria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans***. Maestría en Ingeniería de Materiales. Universidad Nacional de Colombia, 2016.

CALLE-CASTAÑEDA, S. M.; MÁRQUEZ-GODOY, M. A.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, J. P. Solubilization of phosphorus from phosphate rocks with *Acidithiobacillus thiooxidans* following a growing-then-recovery process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1–10, 2018.

CERRUTI, C.; CURUTCHET, G.; DONATI, E. Bio-dissolution of spent nickel-cadmium batteries using *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Biotechnology**, v. 62, n. 3, p. 209–219, 1998.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Acid leaching of a copper ore by sulphur-oxidizing microorganisms. **Hydrometallurgy**, v. 147–148, p. 223–227, 2014.

DEVECI, H.; AKCIL, A.; ALP, I. Parameters for Control and Optimization of Bioleaching of Sulfide Minerals. **Materials Science and Technology 2003 Meeting**, p. 77–90, 2003.

DOLD, B. Sustainability in metal mining: From exploration, over processing to mine waste management. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 4 SPEC. ISS., p. 275–285, 2008.

DOPSON, M.; HOLMES, D. S. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8133–8144, 2014.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 1. ed. Jaguariúna: Elsevier, 1995.

EMS TEAM. **Etched - Transparent Field Double Neubauer Counting Chambers**. Disponível em: <<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63511.aspx>>. Acesso em: 3 dez. 2021.

FAZZINI, R. A. B.; LEVICAN, G.; PARADA, P. Acidithiobacillus thiooxidans secretome containing a newly described lipoprotein Licanantase enhances chalcopyrite bioleaching rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 771–780, 2011.

GARCIA JR, O.; BEVILAQUA, D. Microrganismos, minerais e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). . **Microbiologia ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 49–81.

GARCIA JÚNIOR, O. Isolation and purification of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 1991.

GOURDON, R.; FUNTOWICZ, N. Kinetic model of elemental sulfur oxidation by Thiobacillus thiooxidans in batch slurry reactors. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 4, p. 241–249, 1998.

GUMULYA, Y. et al. **In a quest for engineering acidophiles for biomining applications: Challenges and opportunities**. **Genes**, (Basel), v. 9, n. 2, 116, 2018. <https://doi.org/10.3390/genes9020116>.

HSU, E. et al. Advancements in the treatment and processing of electronic waste with sustainability: a review of metal extraction and recovery technologies. **Green Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 919–936, 2019.

JHA, M. K. et al. Review on hydrometallurgical recovery of rare earth metals. **Hydrometallurgy**, v. 165, p. 2–26, 2016.

JIA, Y. et al. Sulfide mineral dissolution microbes: Community structure and function in industrial bioleaching heaps. **Green Energy and Environment**, v. 4, n. 1, p. 29–37, 2019.

JOHNSON, D. B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, n. 4, p. 307–317, 1998.

JOHNSON, D. B. Biohydrometallurgy and the environment: Intimate and important interplay. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1–4, p. 153–166, 2006.

JOHNSON, D. B. The Biogeochemistry of Biomining. In: BARTON, L. L.; MANDL, M.; LOY, A. (Eds.). . **Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2010. p. 401–426.

JOHNSON, D. B. Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 7768–7776, 2013.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in Acidophilic Micro-Organisms. In: ROBERT K. POOLE (Ed.). **Advances in Microbial Physiology**. Sheffield: Academic Press, 2008. v. 54, p. 201–255.

KAKSONEN, A. H. et al. Recent progress in biohydrometallurgy and microbial characterisation. **Hydrometallurgy**, v. 180, p. 7–25, 2018.

KAKSONEN, A. H. et al. Prospective directions for biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 195, n. May, p. 105376, 2020.

KONISHI, Y.; ASAI, S.; YOSHIDA, N. Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3617–3622, 1995.

LEVETT, A.; GLEESON, S. A.; KALLMEYER, J. From exploration to remediation: A microbial perspective for innovation in mining. **Earth-Science Reviews**, v. 216, n. February, p. 103563, 2021.

LIU, C. et al. Recycling of spent lithium-ion batteries in view of lithium recovery: A critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, n. 1, p. 801–813, 2019.

LIU, H. L.; LAN, Y. W.; CHENG, Y. C. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1953–1961, 29 out. 2004.

MAHMOUD, A. et al. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 119, p. 118–146, 2017.

MCLEAN, H. C. The oxidation of sulfur by microorganisms in its relation to the availability of phosphates. **Soil Science**, v. 5, n. 4, p. 251–290, 1918.

MISHRA, D.; RHEE, Y. H. Microbial leaching of metals from solid industrial wastes. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 1–7, 2014.

NAKAMURA, K.; MIKI, H.; AMANO, Y. Cell growth and accumulation of *thiobacillus thiooxidans* S3 in a pH-controlled thiosulfate medium. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 369–376, 1990.

PAKOSTOVA, E.; JOHNSON, D. B. Microbial generation of sulfuric acid from granular elemental sulfur in laboratory-scale bioreactors. **Hydrometallurgy**, v. 190, p. 105152, 2019.

PATHAK, A.; MORRISON, L.; HEALY, M. G. Catalytic potential of selected metal ions for bioleaching, and potential techno-economic and environmental issues: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 211–221, 2017.

PATHAK, A.; SRICHANDAN, H.; KIM, D. J. Column bioleaching of metals from refinery spent catalyst by *Acidithiobacillus thiooxidans*: Effect of operational modifications on metal extraction, metal precipitation, and bacterial attachment. **Journal of Environmental Management**, v. 242, n. August 2018, p. 372–383, 2019.

PENG, J. Hydraulic Residence Time of CSTRs under Unsteady-State Condition. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 6, p. 1446–1458, nov. 1994.

PLUMB, J. J.; MUDDLE, R.; FRANZMANN, P. D. Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms. **Minerals Engineering**, v. 21, n. 1, p. 76–82, 2008.

RASOULNIA, P.; BARTHEN, R.; LAKANIEMI, A. M. A critical review of bioleaching of rare earth elements: The mechanisms and effect of process parameters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 378–427, 2021.

SÁNCHEZ-ANDREA, I. et al. A case in support of implementing innovative bio-processes in the metal mining industry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 11, p. fnw106, jun. 2016.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. STUDIES ON THE CHEMOAUTOTROPHIC IRON BACTERIUM FERROBACILLUS FERROOXIDANS. **Journal of Bacteriology**, p. 642–647, 1958.

TICHÝ, R. et al. Oxidation of biologically-produced sulphur in a continuous mixed-suspension reactor. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 701–710, mar. 1998.

TUNSU, C. et al. Reclaiming rare earth elements from end-of-life products: A review of the perspectives for urban mining using hydrometallurgical unit operations. **Hydrometallurgy**, v. 156, p. 239–258, 2015.

VÉLIZ, C. S.; GONZÁLEZ, C. C. **Mercado Chileno del ácido sulfúrico al año 2029**. Comisión Chilena del Cobre, Nov. 2020.

WANG, R. et al. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus spp.* **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 3290, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03290>2019.

YANG, L. et al. *Acidithiobacillus thiooxidans* and its potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 7819–7833, 2019.

YANG, Y. et al. Efficient and industrial production of H₂SO₄ from sulfur sludge by acidophilic cells in a membrane bioreactor via optimizing process. **Journal of Cleaner Production**, v. 250, p. 119444, 2020.