



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUIZ EDUARDO LACERDA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DE DRENAGEM ÁCIDA
MINEIRA NA REGIÃO DE JACOBINA (BAHIA) E O SEU USO
NA BIOLIXIVIAÇÃO DE COBRE**

Salvador
2014

LUIZ EDUARDO LACERDA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DE DRENAGEM ÁCIDA
MINEIRA NA REGIÃO DE JACOBINA (BAHIA) E O SEU USO
NA BIOLIXIVIAÇÃO DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Leticia Alonso Bernardez
Co-orientador: Luiz Rogério Pinho de Andrade Lima

Salvador
2014

O48 Oliveira, Luiz Eduardo Lacerda de
Identificação e isolamento de bactérias envolvidas na formação
de drenagem ácida mineira na região de Jacobina (Bahia) e o
seu uso na biolixiviação de cobre / Luiz Eduardo Lacerda de
Oliveira. – Salvador, 2014.

70 f.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Letícia Alonso Bernardez;
Prof. Dr. Luiz Rogério Pinho de Andrade Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 2. Ferro-oxidante. 3.
Biolixiviação. 4. Cobre. 5. Calcopirita. I. Bernardez, Letícia
Alonso. II. Lima, Luiz Rogério Pinho Andrade. III. Universidade
Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 553.3

LUIZ EDUARDO LACERDA DE OLIVEIRA

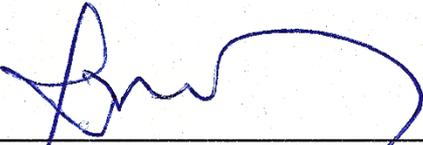
**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DE DRENAGEM ÁCIDA
MINEIRA NA REGIÃO DE JACOBINA (BAHIA) E O SEU USO
NA BIOLIXIVIAÇÃO DE COBRE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Aprovada em 29 de novembro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Letícia Alonso Bernardez – Orientadora 
Doutora em Civil Engineering pela McGill University,
MCGILL, Canadá.
Universidade Federal da Bahia.

Paulo Fernando de Almeida 
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Luís Alberto Dantas Barbosa 
Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,
UFRJ, Brasil.
Instituto Federal da Bahia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos Deuses, por estar vivo e ser dotado de inteligência.

À Dr^a. Letícia Alonso Bernardez (orientadora) e ao Prof. Luiz Rogério Pinho de Andrade Lima (coorientador) por terem me dado um voto de confiança e terem aceitado me orientar, e por terem me fornecido toda infraestrutura necessária para realização das minhas atividades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, sem a qual a realização deste sonho seria impossível.

Ao Dr. Luis Gonzaga Santos Sobral e à Débora Monteiro do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) pelas sugestões dadas para enriquecimento do trabalho.

À UFBA, ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos meus mestres pela competência e disposição em compartilhar experiências.

À Mineração Caraíba S.A. e à Yamana Gold por cederem as amostras de minério e rejeito utilizadas neste estudo.

Ao Prof. José Antônio Menezes Filho, coordenador do Laboratório de Toxicologia da UFBA, por permitir o uso do Espectrofotômetro de Absorção Atômica e ao técnico desse laboratório, Sr. Sergio S. Prado Oliveira, pela ajuda na utilização desse equipamento.

Ao Prof. Dr. Milton Ricardo Roque (UFBA) que me apresentou o Programa de Biotecnologia da UFBA, possibilitando minha entrada neste curso.

A meus pais por me ensinaram a perseguir meu ideal com dedicação e coragem.

A meus amigos e amigas, verdadeiras bênçãos dos deuses na minha vida, por me acalmarem nos momentos de aflição, por estarem sempre presentes na minha vida e por me lembrarem, a todo momento, que existem pessoas que me amam de verdade.

Aos colegas do mestrado, do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microorganismos (LABEM) e do Laboratório de Tratamento de Minérios (LATM) pelo apoio, incentivo, ajuda e, principalmente, pela troca de experiências enriquecedoras tanto para a vida como para este trabalho.

OLIVEIRA, Luiz Eduardo Lacerda de. Identificação e isolamento de bactérias envolvidas na formação de drenagem ácida mineira na região de Jacobina (Bahia) e o seu uso na biolixiviação de cobre. 70 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma das bactérias catalizadoras da reação de oxidação que leva à formação drenagem ácida mineira (DAM). Devido à capacidade oxidativa e lixiviante deste micro-organismo, a indústria passou a usá-lo na extração de minerais, por biolixiviação, com vantagens em relação aos métodos convencionais em alguns casos. A Bahia tem uma expressiva produção mineral, no entanto poucos são os relatos sobre a investigação sistemática de aspectos microbiológicos envolvidos na DAM neste estado. Com foco nisto, o objetivo desta pesquisa foi identificar bactérias envolvidas na formação de DAM na região de Jacobina – BA, e isolar a bactéria *A. ferrooxidans*, proveniente de locais que sofrem com este problema, para utilização em ensaio de biolixiviação a fim de avaliar a capacidade oxidativa deste isolado na recuperação de cobre. Para isto, uma amostra de sedimento foi coletada em uma barragem de rejeitos e caracterizada a nível molecular por *Microarray*, sendo encontrados 5 taxa, todos do domínio Bacteria, entre eles a espécie *A. ferrooxidans*, a qual foi isolada após enriquecimento em meio T&K e posterior purificação em meio sólido seletivo T&K-agarose. O crescimento bacteriano no enriquecimento foi acompanhado pela titulação de Fe^{2+} residual do meio com dicromato de potássio, por inspeção visual (mudança cor de verde claro para marrom avermelhado) e aumento do potencial redox. Durante o enriquecimento, a cultura chegou à fase estacionária em 2 dias após o inóculo. Em meio sólido, as colônias isoladas foram obtidas do 10º ao 15º dia de incubação. Análise molecular por qPCR confirmou que *A. ferrooxidans* foi a espécie isolada. O isolado foi empregado no ensaio de biolixiviação com minérios sulfetados de cobre, no qual predomina calcopirita. O ensaio foi realizado com 20% de sólidos, com pH inicial de 2, agitação constante (130 RPM), temperatura de 30°C e duração de 60 dias, em três condições: o frasco sem inóculo e esterilizado pela adição de formaldeído; o frasco inoculado com *A. ferrooxidans*; e o frasco sem inóculo e não esterilizado. O processo de biolixiviação ficou evidenciado quando utilizada esta cepa bacteriana, uma vez que os frascos que a continham apresentaram melhor recuperação de cobre, 58 e 60%, em relação aos frascos sem inóculo, cuja recuperação foi de 31 e 35% para os esterilizados com formaldeído, e de 37 e 44% para o não esterilizado. O minério estudado, apesar da refratariedade da calcopirita, mostrou boa potencialidade na utilização de bactérias para recuperação de cobre por biolixiviação. A manutenção e ajuste do pH durante a lixiviação bacteriana foi essencial para a eficiente recuperação deste metal.

PALAVRAS CHAVE: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ferro-oxidante, biolixiviação, cobre, calcopirita.

OLIVEIRA, Luiz Eduardo Lacerda de. Identification and isolation of bacteria involved in formation of acid mine drainage in the region of Jacobina (Bahia, Brazil) and its use in the bioleaching of copper. 70 pp. ill. 2014. Master Dissertation - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans is a bacterial catalysts of oxidation reactions that form acid mine drainage (AMD). Due to leaching and oxidative capacity of this microorganism, the industry began to use it in the extraction of minerals by bioleaching, with great advantages, in some cases, over conventional methods. Bahia has a significant mineral production, however there are few reports of the systematic investigation of microbiological aspects involved in DAM in this state. In order this, the objective of this research was to identify bacteria involved in the formation of AMD in the region of Jacobina (Bahia), and isolate the bacterium *A. ferrooxidans*, from locations that suffer from this problem, for use in the assay of bioleaching to assess oxidative capacity of this isolate the recovery of copper. For this, a sediment sample was collected in a barrage of rejects and characterized at the molecular level by Microarray, being found 5 taxa, all of the domain Bacteria, including the species *A. ferrooxidans*, which was isolated after enrichment by T&K medium and subsequent purification on solid selective T&K-agarose medium. Bacterial growth was monitored by the enrichment of titration of the residual Fe^{2+} in the medium with potassium dichromate, by visual inspection (color change light green to reddish-brown) and increased redox potential. During the enrichment, the culture arrived stationary phase within 2 days after the inoculum. In solid medium isolated colonies were obtained on the 10th to 15th day of incubation. Molecular analysis by qPCR confirmed that *A. ferrooxidans* was the isolated species. The isolate was used in the test to bioleaching of copper sulphide ores, which predominates chalcopyrite. The assay was performed with 20% solids, with constant agitation (130 RPM), 30°C, initial pH 2.0 and a duration of 60 days, on three conditions: the flask without inoculum and sterilized with the addition of formaldehyde, the flask inoculated with *A. ferrooxidans* and the flask without inoculum and not sterilized. The bioleaching process was demonstrated when used in this bacterial strain, because the flask containing it showed better recovery of copper, 58 and 60%, in relation to the flasks without inoculum, which recovery was 31 and 35% for sterilized with formaldehyde, and 37 and 44% for the not sterilized. The ore investigated, in despite of the refratirity chalcopyrite, showed good potential for bacterial use in copper recovery by bioleaching. The adjustment and maintenance of pH during bacterial leaching was essential for the efficient recovery of the metal.

KEYWORDS: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, iron-oxidizing, bioleaching, cooper, chalcopyrite.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
2.1	DRENAGEM ÁCIDA MINEIRA	9
2.2	<i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	11
2.3	BIOLIXIVIAÇÃO	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	AS BACTÉRIAS NA DRENAGEM ÁCIDA MINEIRA	21
3.2	ISOLAMENTO DE <i>A. FERROOXIDANS</i>	25
3.3	BIOLIXIVIAÇÃO	29
3.3.1	Mecanismos de ação das bactérias na biolixiviação	29
3.3.2	Biolixiviação de Cobre	32
3.3.3	Biolixiviação na Bahia	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	AMOSTRAGEM	37
4.1.1	Local da amostragem	37
4.1.2	Metodologia da amostragem	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA	39
4.3	ISOLAMENTO DE <i>A. FERROOXIDANS</i>	40
4.3.1	Meio de cultura	40
4.3.2	Procedimento para o isolamento	41
4.3.3	Identificação morfológica	42
4.3.4	Identificação molecular	43
4.4	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	43
4.5	ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO	43
4.5.1	Minério	43
4.5.2	Ensaio em frascos agitados	44
4.5.3	Padronização do inóculo	45
4.6	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	46
4.6.1	Determinação de Fe²⁺ por titulação com dicromato de potássio	46
4.6.2	Determinação do pH e Eh	47
4.6.3	Fluorescência de raio X	47
4.6.4	Absorção atômica	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	AMOSTRA	49
5.2	ISOLAMENTO DE <i>A. FERROOXIDANS</i>	50
5.2.1	Enriquecimento	50
5.2.2	Purificação	51
5.2.3	Identificação morfológica	52
5.2.4	Identificação molecular	53
5.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	54
5.4	ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO	56
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A Drenagem Ácida Mineira (DAM) é um processo natural de dissolução oxidativa de minerais sulfetados, que ocorre após exposição desses à água e oxigênio. Durante a formação da DAM uma solução ácida é gerada, e esta, por sua vez, age como lixiviante de outros minerais, produzindo uma solução rica em elementos potencialmente tóxicos, como arsênio, cádmio, zinco, urânio (Borma & Soares, 2002). Esta solução ácida, gerada durante a formação da drenagem, por sua vez, pode alcançar corpos hídricos próximos, contaminando-os com estes elementos e tornando-os, conseqüentemente, impróprios para uso por um longo tempo (Farfán *et al.*, 2003).

Bactérias que oxidam sulfetos agem como catalisadoras da reação que ocorre na formação de DAM, acelerando o processo em milhões de vezes (Borma & Soares, 2002). Devido à capacidade oxidativa e lixiviante destas bactérias, a indústria metalúrgica passou a usá-las na extração de metais, no processo de biolixiviação (Baker & Banfield, 2003). Este processo é muitas vezes vantajoso, porque, entre outros motivos, é mais barato e menos poluente que os métodos convencionais (Garcia Jr., 1989).

No Brasil, poucos estudos de DAM foram realizados (Campaner & Luiz-Silva, 2009) e apesar de a Bahia ter uma expressiva produção mineral (Rezende, 2011), poucos são os relatos sobre a investigação sistemática de aspectos microbiológicos envolvidos na DAM neste estado. Faz-se necessário estudar tal questão, uma vez que este conhecimento é de fundamental importância para evitar maiores impactos ambientais provocados por este problema.

Diante desta carência do conhecimento sobre a diversidade microbiológica na geração de DAM na Bahia, o objetivo dessa dissertação é identificar as bactérias envolvidas na formação de drenagem ácida de minas na região de Jacobina – BA, isolar a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, proveniente dos locais que sofrem com este problema na região, caracterizando-a, e utilizar a *A. ferrooxidans* isolada para a realização de um ensaio de biolixiviação em frascos agitados, a fim de avaliar a capacidade oxidativa deste isolado na recuperação de cobre.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DRENAGEM ÁCIDA MINEIRA

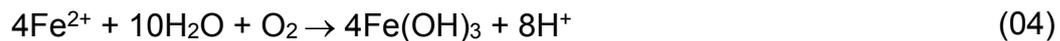
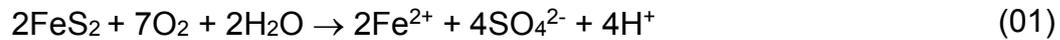
A Drenagem Ácida Mineira (DAM), embora atualmente bastante discutida, não é um problema novo, sendo reconhecida como problema ambiental grave desde a década de 1950 (Abrahão, 2002). A DAM pode ser definida como um processo natural de dissolução oxidativa de minerais sulfetados (presentes em resíduos de mineração) quando expostos à água e oxigênio, gerando uma solução de ácido sulfúrico (Baker & Banfield, 2003). Esta solução ácida, por sua vez, age como lixiviante de outros minerais, produzindo uma solução rica em elementos potencialmente tóxicos, como arsênio, cádmio, zinco, urânio, entre outros (Borma & Soares, 2002). A quantidade desses elementos muitas vezes excede os limites aceitos pela legislação ambiental, e, caso esses elementos atinjam corpos hídricos, torna-os impróprios para uso por longo tempo, mesmo depois de findadas as atividades de mineração (Farfán *et al.*, 2004).

A combinação do baixo pH com os elementos tóxicos tem efeitos toxicológicos nos ecossistemas aquáticos, causando mortalidade, disfunções no crescimento e nas taxas de reprodução, deformações e lesões, além de se acumular ao longo da cadeia alimentar, contaminando o ser humano que venha a consumir alimentos provenientes desse ecossistema (Lewis & Clark, 1996; Amaral & Krebs, 2010).

Por acarretar consequências irreversíveis, uma vez iniciada a DAM, esta passa a ser considerada um dos problemas ambientais mais preocupantes para as agências fiscalizadoras do meio ambiente e para as mineradoras. Em vista disso, e aliado ao fato de que muitas empresas têm despendido elevados recursos financeiros para o cumprimento das obrigações legais, muitos pesquisadores têm se empenhado na busca do conhecimento dos potenciais de geração ácida e de soluções que visem a minimizar os impactos causados por ela, além de ser essencial para o planejamento de novas minas e mesmo para a operação e fechamento de minas em atividade (Younger, 1997).

O fenômeno da geração de drenagem ácida, pela oxidação de um dos sulfetos minerais mais comuns, a pirita, pode ser descrito pelas reações básicas abaixo

(Borma & Soares, 2002), embora estas reações possam ocorrer, de forma similar, com outros sulfetos encontrados em rejeitos de mineração (Maia, 2004).



Inicialmente, os minerais - após a exposição à água, ao oxigênio e à umidade do ar - irão oxidar espontaneamente, por oxidação direta com o oxigênio molecular (equação 1) ou por oxidação indireta com o íon férrico (equação 2), gerando os produtos da dissociação do ácido sulfúrico e, conseqüentemente, elevando a acidez do meio. A velocidade da reação 1 é dependente da superfície de contato do mineral exposta ao oxigênio. Já a reação 2 pode ser bastante rápida, desde que exista Fe^{3+} em concentração suficiente para que ela ocorra. À medida que o íon férrico é consumido na reação 2, a velocidade decresce e passa a ser dependente da velocidade de produção desse íon (equação 3) (Borma & Soares, 2002; Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003).

A oxidação do íon Fe^{2+} a íon Fe^{3+} é apresentada na reação 3 e acontece em valores mais baixos de pH. Enquanto o pH permanecer próximo ou acima de 4,5, o íon ferroso será oxidado, porém se precipitará na forma de hidróxido de ferro III, conforme a reação 4 (Borma & Soares, 2002; Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003).

Quando o pH cair a valores menores que 3,5, o íon férrico estará disponível para a oxidação indireta (reação 2) do mineral, gerando mais íons sulfato e hidrogênio, contribuindo ainda mais para a redução do pH. Essas condições de baixo pH estimulam a reprodução de bactérias acidófilas que catalisam a transformação do Fe^{2+} a Fe^{3+} (reação 3). Com isso, fica estabelecido um ciclo bastante rápido entre as reações 3 e 2 que se processará até a degradação total do minério (Borma & Soares, 2002; Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003).

Muitos fatores contribuem e influenciam na formação de DAM, tais como a: concentração de oxigênio na superfície da partícula, granulometria das partículas,

superfície específica do mineral sujeita à oxidação, temperatura, pH do meio, concentração do íon férrico e a presença de bactérias (Borma & Soares, 2002, Maia *et al.*, 2008).

As bactérias, estando em condições propícias, irão agir como catalisadoras da reação de formação de DAM, acelerando de forma significativa (em mais de 5 vezes em relação aos sistemas puramente abióticos) a taxa de oxidação de minerais contendo enxofre inorgânico, principalmente enxofre elementar e sulfetos (pirita, calcopirita, bornita, esfalerita, galena, entre outros) (Hutchinson & Ellison, 1992). Devido a essa capacidade oxidativa, a maioria das espécies isoladas e identificadas a partir de amostras de DAM são usadas no processo de biolixiviação (Baker & Banfield, 2003).

A ação das bactérias na oxidação dos minerais não é oriunda da ação de uma única espécie de bactéria, mas de várias e, possivelmente, agindo em associação. As associações ocorrem entre procariotos (arqueobactérias e eubactérias) autotróficas ou heterotróficas e entre alguns eucariontes (algas, leveduras, protozoários, entre outros) (Johnson, 2008). Os gêneros mais comuns de procariotos encontrados em locais de DAM são: *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfolobus*, *Acidianus* e *Acidiphilium* (Hallberg & Johnson, 2001; Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003). *Acidithiobacillus ferrooxidans* é a espécie bacteriana mais estudada (Alves, 2010).

2.2 ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi descoberta no final da década de 1940, por Colmer & Hinkle (1947), e desde então vem sendo amplamente estudada. Anteriormente denominada *ThioJacocillus ferrooxidans* esta *Proteobacteria* mudou de gênero em 2000 para *Acidithiobacillus*, devido a estudos fisiológicos e comparações, realizados por Kelly & Wood (2000), entre as sequências do gene da região 16S rRNA desse micro-organismo.

A. ferrooxidans é uma bactéria gram negativa não patogênica, em forma de bastões (bacilo), podendo possuir fimbrias e flagelo polar, o que lhe confere capacidade de locomoção (Dispirito *et al.*, 1982). Esta bactéria não forma esporos e se reproduz por divisão binária simples (Jensen & Webb, 1994). Seu tamanho varia

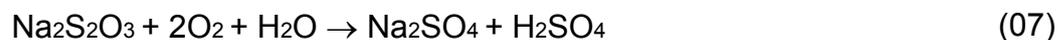
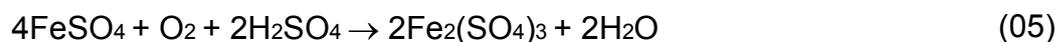
de 0,5 a 0,6 μm de largura por 1,0 a 2,0 μm de comprimento, ocorrendo sozinhas, aos pares (diplobacilo) e raramente em pequenas cadeias (estreptobacilo) (Jensen & Webb, 1994).

Este micro-organismo é geralmente assumido como aeróbico, sendo o oxigênio usado no metabolismo como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória (Garcia Jr. & Urenha, 2001). Porém, Pronk e colaboradores (1992) descreveram crescimento em condições anaeróbicas, sendo o ferro férrico substituído pelo oxigênio, como aceptor de elétrons na oxidação de enxofre elementar.

Essa bactéria é acidófila, sendo que o pH ótimo de crescimento é 2,0, mas pode crescer numa faixa de pH de 1,5 a 4,5, não sobrevivendo a pH inferiores a 1,0 e superiores a 6,5 (Smith *et al.*, 1988). É mesófila, sobrevivendo a uma temperatura de 5°C a 40°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 30°C (Landesman *et al.*, 1966).

Essa bactéria é autotrófica, mas especificamente quimiolitotrófica, uma vez que a energia para o crescimento dessa espécie é obtida da oxidação de íons Fe^{2+} , enxofre elementar e compostos reduzidos de enxofre (S^{-2} , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, $\text{S}_4\text{O}_8^{-2}$), incluindo sulfetos minerais, como a pirita (FeS_2) (Johnson & Hallberg, 2003). Rawlings (1981) descreve a necessidade de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio para o crescimento dessa bactéria. Essa energia, por sua vez, é usada para a fixação de CO_2 atmosférico, principal fonte de carbono, para a síntese de material celular (Rawlings, 2005).

Após anos de pesquisa, há uma unanimidade quanto à estequiometria da reação da oxidação do Fe^{2+} e de formas reduzidas de enxofre (S^{-2} , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, $\text{S}_4\text{O}_8^{-2}$). Estes últimos são oxidados a SO_3^{-2} , o qual é posteriormente oxidado a SO_4^{-2} (Kelly & Tuovinen, 1975; Lundgren & Silver, 1980; Oprime, 2001; Neto, 2007), formando ácido sulfúrico (importante agente na dissolução dos minerais no processo de biolixiviação). As equações da oxidação podem ser vistas a seguir:





Outra característica marcante na espécie é a tolerância a altas concentrações de íons metálicos, inclusive de metais pesados. Entre os metais, temos: alumínio (0,18 M), cobre (0,16 M), cromo (0,1 M) e urânio (0,01 M). No entanto, existem metais que são tóxicos, como a prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M) e molibdênio (10^{-3} M). Há também elementos que inibem o crescimento, como os ânions de selênio, telúrio e arsênio em concentração de 10^{-3} M (Hutchins *et al.*, 1986; Cabrera *et al.*, 2005).

De acordo com Jones & Kelly (1983) e confirmado por Kawabe e colaboradores (2003), uma alta concentração de Fe^{3+} também é tóxico para a *A. ferrooxidans*, inibindo seu crescimento, sobretudo na ausência de Fe^{2+} . Martin (1978), em seu trabalho, conclui que compostos orgânicos também causam essa inibição.

Os meios de cultura mais utilizados para cultivo de *A. ferrooxidans*, até hoje, são os meios seletivos 9K, publicado por Silverman & Lundgren (1959), e o T&K, publicado por Tuovinen & Kelly (1973). No entanto, existem outros meios publicados, sendo que a diferença está na modificação ou exclusão de algum sal presente nestes dois meios e no pH inicial (Garcia Jr., 1989; Garcia Jr. & Urenha, 2001).

Os meios 9K e o T&K se diferenciam em relação à composição e pH. O meio T&K apresenta uma vantagem em relação ao 9K, pois quase não há formação de precipitado de ferro no meio, uma vez que o pH deste é inferior a 2,0, o que facilita algumas análises, segundo Garcia Jr. (1989). Segue abaixo a composição e o modo de preparo destes dois meios.

Meio 9K (Silverman & Lundgren, 1959)

3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,5 g K_2HPO_4
 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0,1 g KCl
 0,014 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 700 mL de água destilada

Solução A
 pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4
 Autoclavada à 121°C durante 20 minutos

44,8 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 300 mL de água destilada

Solução B
 pH ajustado para 2,8 com H_2SO_4
 Filtrada com membrana de acetato de celulose $0,22 \mu\text{m}$

As soluções A e B devem ser misturadas na proporção de 7:3, respectivamente, no momento do uso.

Meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1973)0,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 g K_2HPO_4 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

800 mL de água destilada

Solução ApH ajustado para 1,8 com H_2SO_4
Autoclavada à 121°C durante 20 minutos33,4 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

200 mL de água destilada

Solução BpH ajustado para 1,8 com H_2SO_4
Filtrada com membrana de acetato de celulose 0,22 μm

As soluções A e B devem ser misturadas na proporção de 4:1, respectivamente, no momento do uso.

Os indícios do crescimento bacteriano nestes meios são: a mudança da cor de verde claro (Fe^{2+}) para vermelho tijolo (Fe^{3+}), a turbidez do meio, a redução do pH e o aumento do Eh (Garcia Jr., 1989; CETESB, 1991).

O cultivo desta bactéria em meio sólido apresenta algumas dificuldades, uma vez que o uso de ágar de açúcares solúveis é praticamente descartado, devido a este agente solidificante causar inibição de crescimento desta espécie bacteriana. Outros pesquisadores vêm testando outros agentes solidificantes, porém o que tem mostrado melhores resultados é a agarose, que é uma forma purificada de ágar (Garcia Jr., 1989; Garcia Jr. & Urenha, 2001).

As colônias obtidas usando este meio sólido com agarose são facilmente visualizadas pela cor marrom avermelhada característica da precipitação de Fe^{2+} . Estas colônias, porém, são muito pequenas e agrupadas, o que dificulta o isolamento e a contagem das unidades coloniais, além de crescerem muito lentamente. Com vista nisso, Garcia Jr. e colaboradores (1992) realizaram um teste, combinando o meio T&K com agarose numa concentração final de 0,5% e inoculando suspensões celulares com tensoativo, obtendo os melhores resultados com o uso de Tween 80 a 0,5%.

2.3 BIOLIXIVIAÇÃO

A biolixiviação - ou lixiviação bacteriana - é um processo biotecnológico hidrometalúrgico, no qual é utilizada atividade microbiana para a solubilização de determinados componentes em um mineral sulfetado (Oliveira *et al.*, 2010), apresentando-se como uma boa alternativa na recuperação de minérios de baixo teor, como cobre, urânio e ouro (Bosecker, 1997).

Apesar de ser um processo relativamente mais lento, essa tecnologia apresenta, segundo Watling (2006), muitas vantagens, tais como:

- Excelente na recuperação de minérios de baixo teor, com concentração inferior a 0,5% (m/m) (Bosecker, 1997);
- Economia de insumos usados no processo (ácidos e agentes oxidantes), uma vez que a própria bactéria produz estes insumos;
- Baixo requerimento de energia, quando comparado a um processo pirometalúrgico, e mesmo a um processo hidrometalúrgico dependente de reatores;
- Baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, devido à simplicidade de instalações;
- Reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação;
- Além de ser menos poluente que a pirometalurgia (que causa poluição atmosférica pela emissão de SO₂) e que a lixiviação com cianeto, por exemplo.

A taxa de oxidação durante a biolixiviação é influenciada por uma série de fatores, sendo que a máxima produção de metal extraído pode ser conseguida quando as condições de crescimento ótimo da bactéria usadas são atendidas. Segundo Bosecker (1997) e Oliveira *et al.* (2010), os principais fatores são:

- Nutrientes – requerimento apenas de compostos inorgânicos, que, em geral, são obtidos do ambiente e do material a ser lixiviado. Para ótimo crescimento, compostos de ferro, enxofre, amônio, fosfato e sais de magnésio podem ser suplementados;
- O₂ e CO₂ – O oxigênio é um pré-requisito para um bom crescimento e alta atividade microbiana. O dióxido de carbono é o único recurso de carbono requerido, porém não existe necessidade de adicioná-lo nos experimentos;
- pH – valores de pH em torno de 1,0 a 2,5 são os mais apropriados para a oxidação de íon ferroso, calcopirita e pirita. Se necessário, deve-se fazer o ajuste de pH para o ótimo crescimento microbiano;

- Potencial redox (Eh) – de acordo com Lundgren & Silver (1980), durante a lixiviação bacteriana, o Eh não deve ultrapassar o valor teórico de 747 mV, que é o limite do equilíbrio $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{3+}$ em solução aquosa a 25°C;
- Temperatura – depende da espécie bacteriana usada. O aumento da temperatura, desde que dentro dos limites aceitáveis pelos micro-organismos, pode intensificar a extração do metal;
- Concentração celular – quantidades adequadas de células devem participar do processo, sendo levada em consideração a área superficial dos minerais, a fim de que os sítios de captação do mineral estejam condizentes com o número de células;
- Substrato mineral – a composição do mineral a ser lixiviado também é de importância fundamental. A redução do tamanho da partícula confere maior área disponível para o ataque microbiano e químico, aumentando a taxa de lixiviação;
- Elementos Potencialmente Tóxicos – o processo de lixiviação é acompanhado do aumento da concentração de elementos com potencial de toxicidade para as bactérias; *Acidithiobacillus* spp., em geral, são altamente tolerantes a estes elementos, porém outras espécies não o são. É possível, no entanto, adaptar linhagens para altas concentrações destes elementos;
- Tensoativos – segundo Neto (2007), agentes tensoativos otimizam a lixiviação, pois diminuem a tensão superficial do mineral, favorecendo a adesão bacteriana nessa superfície.

A condição básica para se realizar uma avaliação do potencial de lixiviação, é possuir uma cultura isolada do próprio minério ou de efluentes da sua mina. Depois deve-se conhecer as características mineralógicas e químicas do minério. Uma vez conhecidas essas características, deve-se fazer testes em escala de bancada, que é um modo mais simples e econômico de se avaliar a aplicação da biolixiviação num determinado minério (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

Em escala de bancada, dois testes indicam o potencial da amostra e se a escala poderá ser ampliada, a lixiviação agitada em frascos e a lixiviação estática por percolação em colunas (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

A lixiviação em frascos agitados permite a avaliação rápida da capacidade oxidativa da bactéria sobre o minério em estudo, já que o ensaio é realizado nas condições ótimas de crescimento microbiano. Durante o ensaio, o pH, Eh, a quantidade de Fe^{+2} , Fe^{+3} e metais dissolvidos devem ser monitorados, a fim de que se obtenham informações sobre o consumo de ácido pela amostra, o rendimento de extração do metal, o potencial de geração de ácido e o nível de oxidação do sistema (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

A lixiviação estática por percolação em colunas será feita somente se os resultados da biolixiviação agitada forem promissores. A lixiviação estática permitirá avaliar a potencialidade da lixiviação bacteriana em uma condição mais próxima da situação real do processo em escala industrial (em pilhas) (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

Testes de biolixiviação, em geral, têm sido realizados com culturas puras ou mistas (consórcios) (Rawlings & Johnson, 2007), em condição de mesofilia (até 40°C) e termofilia (40°C a 50°C). O processo conduzido com consórcios microbianos é mais vantajoso (pois cada espécie presente pode exercer sua atividade metabólica quando as condições para o crescimento estiverem propícias), além de ser mais representativo em condições de campo, onde é impossível manter a pureza do cultivo no sistema (Oliveira *et al.*, 2010).

Após realizados os testes em bancadas, pode ser ampliada a escala, realizando-se o teste de lixiviação estática em colunas de percolação em pilhas. Após o sucesso deste teste, pode-se iniciar os testes em escala industrial (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

As principais técnicas utilizadas em escala industrial de biolixiviação são: lixiviação em pilhas (*heap leaching*), lixiviação em montes (*dump leaching*) e lixiviação em tanques agitados. A escolha do tipo de processo deve considerar, em particular, as características do minério, a sua susceptibilidade à biolixiviação, a quantidade a ser processada, a sua granulometria e os custos operacionais (Watling, 2006; Pradhan *et al.*, 2008b).

A lixiviação em pilhas consiste na deposição de grandes quantidades de minério sobre uma base impermeabilizada, com formação de uma pilha, formato de um tronco

de pirâmide, cuja superfície é irrigada com uma solução ácida, aproveitando-se a ação natural das bactérias já presentes no minério, porém às vezes há a adição de microorganismos lixiviantes. A solução percola através do leito mineral, e, ao chegar à base, é coletada em um tanque, de onde segue para a recuperação do metal de interesse. Em geral, a solução é recirculada pela pilha, quantas vezes forem necessárias, a fim de permitir a máxima extração do metal (Figura 1) (Neto, 2007).

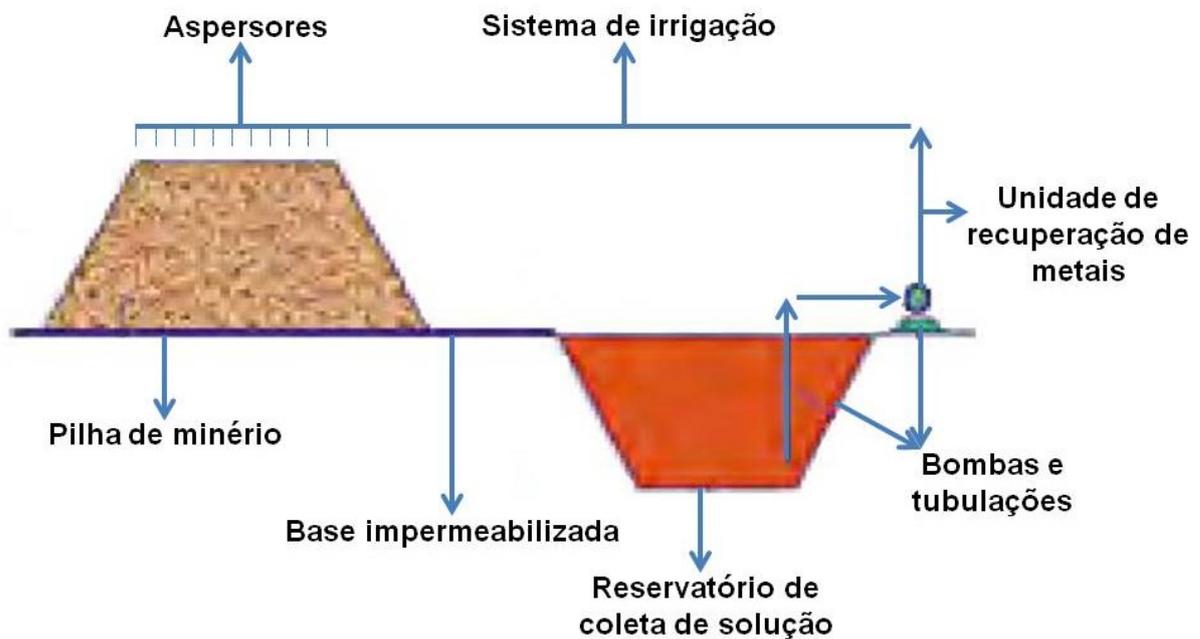


Figura 1 - Esquema geral da biolixiviação estática em pilhas (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

A utilização de minérios em uma lixiviação em pilha, no entanto, é limitada em alguns casos, como por exemplo, na manutenção da temperatura adequada no interior da pilha, sem que ocorra um superaquecimento. Além disso, toda lixiviação em pilha de minérios necessita, geralmente, de longos períodos de processo, até que sejam decididos e/ou resolvidos problemas dos parâmetros operacionais como, permeabilidade e forma de distribuição da solução lixivante, bem como a influencia do tamanho das partículas (Pradhan *et al.*, 2008b). A lixiviação em montes ocorre em material depositado como rejeito. A maioria dos montes é formada próxima às minas, geralmente aproveitando a conformação natural do terreno (Oliveira *et al.*, 2010). De acordo com Souza (1980), no entanto, o processo de biolixiviação em pilhas e em montes é lento, necessitando de períodos longos (meses ou mesmo anos) para uma recuperação substancial do metal.

Na biolixiviação em tanques agitados, a interação da solução ácida com o mineral é muito superior quando comparada aos sistemas estáticos (pilhas e montes) visto que ocorre maior contato entre os agentes oxidantes e a superfície do mineral. Nesse sistema é utilizado um grande reator que pode ser agitado mecanicamente ou por meio de injeção de ar, que, além da agitação, pode suprir a demanda de oxigênio e dióxido de carbono dos micro-organismos. Em vista da condução do processo, distintamente dos dois anteriormente referenciados, é possível controlar as variáveis de processo. Contudo, essa tecnologia é bastante limitada devido ao elevado custo de instalação. Por essa razão, ela é empregada somente na dissolução de minérios que contenham metais de elevado valor agregado, como ouro (Oliveira *et al.*, 2010).

Uma recente abordagem na biolixiviação de minérios é o processo GEOCOAT®, que combina baixo capital e custos operacionais, com altas recuperações, inclusive em minérios refratários, como a calcopirita, e concentrados polimetálicos (GEOCOAT, 2013). Desenvolvido pela empresa Norte Americana GEOBIOTICS, este processo consiste em uma pilha erguida com o aglomerado mineral constituído do concentrado de flotação aderido a uma rocha suporte no momento do empilhamento. A camada de concentrado é estabelecida por pulverização de uma polpa contendo o concentrado de flotação e os consórcios dos micro-organismos. Após o erguimento da pilha, a mesma é irrigada em sua parte superior com um spray de solução ácida (H_2SO_4) contendo nutrientes fundamentais (N, P, K) e biomassa (micro-organismos tanto mesófilos quanto termófilos). Durante o processo é possível que haja aumento da temperatura, por isso o sistema é aerado de baixo para cima com uma rede de tubos a fim de que não ocasione a morte de micro-organismos (Lima, 2011). Esta já foi utilizada na África do Sul e Austrália sucesso (GEOCOAT, 2013).

Além da GEOCOAT®, a GEOBIOTICS lançou também a GEOLEACH™ que é uma técnica de biolixiviação em pilha de minério, usada para recuperar cobre, principalmente calcopirita de baixo teor, e outros metais a partir de minérios de sulfetos primários e secundários. Operação da pilha GEOLEACH™ é muito similar aos sistemas de lixiviação convencionais, mas com a adição de um sistema para manter a atividade biológica e aumentar a conservação de calor. GEOLEACH™ otimiza a cinética de lixiviação do sulfeto de através da maximização e manutenção de altas temperaturas dentro da pilha. Esse processo utiliza micro-organismos oxidantes de ferro e enxofre para facilitar a oxidação e lixiviação de sulfetos, tais como bactérias

mesófilas (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*), moderadamente termófilas e termófilas extremas (*Sulfolobus* spp. e *Acidianus* spp.) (GEOLEACH, 2013).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS BACTÉRIAS NA DRENAGEM ÁCIDA MINEIRA

A DAM ocorre naturalmente após exposição de sulfetos à água e oxigênio. As bactérias oxidantes, no entanto, agem como catalisadoras da reação de formação de DAM. Em condições propícias, estes micro-organismos aceleram de forma significativa (em mais de 5 vezes em relação aos sistemas puramente abióticos) a taxa de oxidação de minerais, contendo enxofre inorgânico, principalmente enxofre elementar e sulfetos (Hutchinson & Ellison, 1992; Borma & Soares, 2002).

A primeira bactéria identificada como responsável pela formação de DAM foi *A. ferrooxidans* por Colmer & Hinkle (1947). Esta foi, por sua vez, isolada por Colmer *et al.* (1949) a partir de água ácida de uma mina de carvão dos EUA e desde então tem sido a bactéria mais bem estudada.

A ação das bactérias na oxidação dos minerais, e conseqüentemente na formação de DAM, no entanto, não é oriunda apenas da ação de *A. ferrooxidans*, mas de várias espécies ferro e/ou enxofre oxidantes, agindo em associação (Hallberg & Johnson, 2001; Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003).

Nos últimos anos, muitas outras bactérias foram identificadas como responsáveis pela formação de DAM. Na Tabela 1, é possível observar uma lista que reúne as bactérias encontradas em locais de DAM das minas de Storwartz e King's (Noruega), Ynysarwed e Parys (País de Gales), Wheal Jane (Inglaterra), Rio Tinto (Espanha) e Iron Mountain (Califórnia) (Johnson & Hallberg, 2003).

Atualmente, pesquisadores têm empenhado esforços para caracterizar as comunidades microbianas acidófilas e identificar os principais micro-organismos ferro e enxofre oxidantes destes locais. Esta identificação se constitui numa estratégia para prevenir e mitigar o impacto da DAM pelo conhecimento do papel destes na geração desta drenagem. Técnicas moleculares independentes de cultivo microbiano têm se mostrado útil para revelar a biodiversidade da microbiota destes ambientes e, principalmente, permitindo a identificação de organismos não cultivados até então, e que portanto eram desconhecidos (Amann *et al.*, 1995).

Tabela 1 - Micro-organismos encontrados em ambientes ácidos de minas, com sua afiliação filogenética e classificação quanto à temperatura de crescimento (adaptada de Johnson & Hallberg, 2003).

Micro-organismo	Classificação quanto à temperatura de crescimento	Afiliação filogenética
1. Oxidantes de ferro		
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Mesófila	<i>Nitrospira</i>
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Mesófila	<i>Nitrospira</i>
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Moderadamente termofila	<i>Nitrospira</i>
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Mesófila	<i>Actinobacteria</i>
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Mesófila	<i>Thermoplasmales</i>
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Mesófila	<i>Thermoplasmales</i>
2. Oxidantes de enxofre		
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Mesófila	β/γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Moderadamente termofila	β/γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Thiomonas cuprina</i>	Mesófila	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>	Moderadamente termofila	<i>Aquificales</i>
<i>Metallosphaera</i> spp.	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>
<i>Sulfolobus</i> spp.	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>
3. Oxidantes de ferro e enxofre		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Mesófila	β/γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Acidianus</i> spp.	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>
4. Redutores de ferro		
<i>Acidiphilium</i> spp.	Mesófila	α - <i>Proteobacteria</i>
5. Oxidantes e redutores de ferro		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mesófila	<i>Actinobacteria</i>
6. Oxidantes e redutores de ferro e oxidantes de enxofre		
<i>Sulfobacillus</i> spp.	Mesófila e moderadamente termofila	<i>Firmicutes</i>
7. Acidófilo heterotrófico		
<i>Acidocella</i> spp.	Mesófila	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	Mesófila	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Mesófila	<i>Acidobacterium</i>
<i>Acidomonas methanolica</i>	Mesófila	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	Mesófila	<i>Firmicutes</i>
<i>Picrophilus</i> spp.	Moderadamente termofila	<i>Thermoplasmales</i>
<i>Thermoplasma</i> spp.	Moderadamente termofila	<i>Thermoplasmales</i>
8. Anaeróbica obrigatória		
<i>Stygiolobus azoricus</i>	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>
<i>Acidilobus aceticus</i>	Termofila extrema	<i>Sulfolobales</i>

Auld e colaboradores (2013) caracterizaram a comunidade microbiana de DAM (Mina Copper Cliff, Ontário) usando técnicas molecular (sequenciamento direto de genes da região 16S rRNA) e técnicas de cultivo clássico, comparando as duas. Os autores perceberam que os dados são complementares, indicando similaridade na estrutura da comunidade, com espécies dominantes semelhantes. No entanto, cada método identificou alguma espécie que foi perdida na outra técnica. Eles cultivaram a maioria das espécies identificadas pelo sequenciamento direto, porém as estimativas de abundância das espécies somente foram obtidas pelo sequenciamento. Os

métodos de cultivo recuperaram quatro espécies que tinham sido esquecidas no sequenciamento por serem prováveis membros da biosfera rara. O sequenciamento indicou um único gênero, completamente perdido na técnica de cultura, a *Legionella*, membro dominante da comunidade microbiana. Os métodos, portanto, identificaram os membros dominantes da comunidade microbiana em DAM, porém juntas estas técnicas podem dar um quadro mais completo da verdadeira diversidade microbiológica do ambiente.

Usando a técnica de Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH), Schrenk e colaboradores (1998) realizaram um estudo sobre a distribuição de *A. ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* em uma mina abandonada, rica em pirita, na Iron Mountain (Califórnia, EUA). Os resultados indicaram que *A. ferrooxidans* torna-se mais abundante nos pHs e temperaturas moderadas e em locais que são periféricos aos locais onde a dissolução oxidativa primária está ocorrendo; desta forma o impacto desta espécie em reações de oxidação de pirita na mina é restrito, contrariando a ideia de que é esta espécie que controla a taxa de geração de ácido. *Leptospirillum ferrooxidans*, no entanto, foram encontrados nos locais mais ácidos, demonstrando um maior papel na gênese de ácido na mina. Apesar disso, nenhuma destas duas espécies dominaram a população microbiana total.

Tan e colaboradores (2009) demonstraram que a comunidade microbiana num local de DAM - numa mineração a céu aberto (Yun-FU), na China - não é estático. Através de análises a nível molecular (técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição – TRFLP) - usando amostras (todas com pH inferior a 3) coletadas em quatro locais ao longo da corrente de ácido e coletadas nas quatro estações climáticas do ano na lagoa de armazenamento - mostraram que as populações de bactérias variaram espacialmente (da área de formação da drenagem até a lagoa de armazenamento) e sazonalmente. Eles perceberam que arqueobactérias constituíam a maior parte da população na primavera, enquanto que estes representaram uma pequena fração da comunidade no restante do ano. *A. ferrooxidans* aumentou ao longo do córrego, mantendo-se presente ao longo do ano, enquanto que *Leptospirillum ferrooxidans* foram insignificantes e não foram detectadas nas amostras analisadas.

As bactérias causadoras de DAM também podem estar presentes em pH extremamente ácidos. A arqueobactéria *Ferroplasma acidarmanus* foi isolada pela

primeira vez em área de DAM na Iron Mountain (Califórnia, EUA), por Edwards e colaboradores (2000), em pH de aproximadamente 0,5. Este organismo é ferro-oxidante e capaz de crescimento em pH 0. Esta espécie representou o procarionte dominante na Iron Mountain em limos e sedimentos anexados à superfície da pirita no corpo do minério. Além deste, outros Thermoplasmatales estreitamente relacionadas foram encontrados, sugerindo que estas arqueobacterias são importantes contribuintes para drenagem ácida da mina e podem afetar substancialmente os ciclos de ferro e enxofre, contrariando a idéia de que as arqueobacterias tinham apenas papel secundário na formação da drenagem ácida.

Outro micro-organismo obtido em biofilme de ambiente altamente ácido de DAM (Iron Mountain, Califórnia) foi o *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (Tyson *et al.*, 2005). Análises da biblioteca genômica da região espaçadora de transcritos internos de 16S rRNA identificaram este como uma nova espécie de micro-organismo membro de *Leptospirillum* tipo III (que não possuía nenhum organismo isolado). Este ferro-oxidante, que até então era desconhecido, foi detectado, por técnicas moleculares, como membro dominante capaz de fixar nitrogênio na comunidade, sendo assim considerados uma espécie chave nesse ambiente.

De acordo com estes estudos, cada local de DAM tem suas próprias características geoquímicas e, portanto, uma comunidade microbiana diferente. Estas comunidades variam também durante o ano. As técnicas de biologia molecular têm complementado os trabalhos de cultivo tradicional no entendimento da distribuição das espécies nessas comunidades. Portanto, atitudes e medidas mitigadoras em regiões de DAM devem ser específicas, levando-se em conta a diversidade de micro-organismos locais.

Algumas bactérias isoladas de DAM têm sido estudadas como alternativa para remediar áreas impactadas por este problema ambiental. Estas são as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Church e colaboradores (2007) mostraram através de análise de perfil de ácidos graxos (PFLA) e eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), dos sedimentos da mina Penn (Califórnia), que representantes de *Desulfosporosinus* e *Desulfitobacterium* estavam presentes em região de DAM e foram capazes de reduzir o sulfato, em baixo pH ($\cong 4$), ou seja, revertendo as reações causadoras de DAM, promovendo atenuação das concentrações de metais pela precipitação de sulfetos de ferro ou enxofre elementar, além de elevar o pH da água.

A BRS do gênero *Desulfovibrio* foi isolada de DAM, por Rampinelli (2007), exibindo a mesma característica de atenuação de metal pela precipitação de sulfeto em baixo pH exibida pelas *Desulfosporosinus* e *Desulfitobacterium*. A identificação dessa característica traz a possibilidade de remediação com BRS sem a necessidade da etapa de neutralização, necessária caso estas bactérias não fossem capazes de crescer em meio ácido.

3.2 ISOLAMENTO DE *A. FERROOXIDANS*

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi descoberta no final da década de 1940, por Colmer & Hinkle (1947), quando estes evidenciaram claramente a participação destes micro-organismos na oxidação de íons ferrosos presentes nos efluentes ácidos de minas abandonadas. Esses autores constataram, em seus experimentos, que se deixassem água ácida de mina incubando, esta ficava marrom, e que, se antes de incubar fossem adicionados agentes bactericidas ou filtrassem a formação de íon férrico não ocorria.

Alguns anos depois, Colmer *et al.* (1949) conseguem isolar e purificar essa bactéria a partir de água ácida de uma mina de carvão dos EUA. Eles utilizaram esta mesma água, porém esterilizada por filtração, como meio de cultura para realizar o isolamento, que consistiu no enriquecimento e na posterior purificação em meio sólido (adicionado ágar 3% à água ácida de mina filtrada), sendo a incubação realizada em temperatura ambiente (30°C). Posteriormente, Temple & Colmer (1951) conseguem evidenciar o crescimento autotrófico desta bactéria, observando que a mesma cresce obtendo energia da oxidação de enxofre e ferro (thiosulfato), sugerindo, então, o nome *Thiobacillus ferrooxidans* para este micro-organismo.

Durante as décadas de 1950 e 1960, alguns pesquisadores - como, por exemplo, Bryner & Jameson (1958) e Razzel & Trussell (1962) - publicaram trabalhos de isolamento dessa espécie a partir de águas ácidas de minas contendo sulfeto, evidenciando a ação “lixiviante” desta bactéria.

Silverman & Lundgren (1959) desenvolveram o meio 9K para o cultivo de ferro-oxidantes, como a *A. ferrooxidans*. O novo meio surgiu da modificação quantitativa do meio descrito por Leathen *et al.* (1956). Com este meio, obteve-se mais células por

mL (10^8 ao invés de 10^6), porém ocorrendo a formação de precipitados, o que dificulta a estimativa de crescimento bacteriano pela medição da turbidez da cultura.

Tuovinen & Kelly (1973) apresentam um ponto chave no que diz respeito ao isolamento de *A. ferrooxidans*. Um novo meio de cultura líquido (posteriormente intitulado T&K, em homenagem aos autores) foi criado para isolamento dessa espécie que não forma precipitados devido ao baixo pH inicial. Os pesquisadores também demonstraram que somente tipos purificados de ágar permitem o crescimento dessa espécie, mas especificamente a agarose e “japonese agar”, apesar de muitos estudos (e.g. Colmer *et al.*, 1949) indicarem o uso de ágar de açúcares solúveis.

Mishra e colaboradores (1983) testaram o crescimento de diferentes linhagens desta espécie, isoladas de água ácida de mina, corpos minerais e amostras de carvão, em meio sólido ferroso contendo ágar, agarose e carragenato como agentes solidificantes com concentração de 1% (alta concentração) e de 0,8% e 0,6% (baixa concentração). Estes conseguiram colônias isoladas facilmente contáveis com os três agentes solidificantes em baixa concentração, e também fizeram uma descrição detalhada da morfologia das colônias obtidas a fim de servir como forma de identificação da espécie.

Das e colaboradores (1989) relataram a dificuldade no cultivo de *A. ferrooxidans* em meio sólido, o que impedia o real isolamento dessa espécie. Eles estudaram o meio sólido à base de agarose (0,6g/L) para distinguir as cepas pela morfologia da colônia e concluíram que diferentes marcas de agarose resultam em diferentes morfologias, principalmente em termos de tonalidade da cor e tamanho.

Garcia Jr. e colaboradores (1992), ao observarem que as colônias obtidas em meio sólido com agarose são muito pequenas e agrupadas, o que dificulta o isolamento e a contagem das unidades coloniais, além de apresentarem crescimento muito lento, realizaram um teste combinando o meio T&K com agarose numa concentração final de 0,5% e inoculando suspensões celulares com tensoativo, obtendo colônias maiores e mais espaçadas com o uso de Tween 80 a 0,5%.

Os avanços nas técnicas de biologia molecular no final da década de 1980 e sua popularização em meados da década de 1990, principalmente no que diz respeito à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usada para amplificação do material genético e aos métodos de sequenciamento deste material, permitiram a

identificação de bactérias utilizando o material genético destas. Estas técnicas tornaram possível a confirmação do isolamento de diversas espécies de microorganismos, entre eles o *A. ferrooxidans*, assim como permitiu a identificação de diferentes linhagens desta bactéria.

Johnson e colaboradores (2001), por exemplo, obtiveram *A. ferrooxidans* a partir de DAM em mina de cobre abandonada na Noruega, utilizando meio sólido seletivo. Após a identificação do isolado por suas características fisiológicas (oxidação de ferro e enxofre), os pesquisadores confirmaram tratar-se de tal espécie após a amplificação da região 16S do rDNA por PCR, usando *primers* para as posições 8-27 e 1510-1492 da região 16S do rDNA de *Escherichia coli*. Após amplificação, o produto foi clonado e então sequenciado, tendo como resultado o compartilhamento de 98% de identidade com a linhagem tipo.

Uma nova linhagem de *A. ferrooxidans* foi isolada da mina de cobre de Aliabad, localizada em Yazd (Irã), utilizando meio 9K e meio sólido 9k-agarose (agarose à 0,6%), por Raheb e colaboradores (2007). O crescimento da cultura foi acompanhado pela precipitação de ferro férrico e mudança de coloração (de verde para alaranjado). Após isolamento, a caracterização foi realizada a nível molecular, utilizando-se espaçadores gênicos da região 16S e 23S do rRNA obtida por PCR. O produto do PCR foi sequenciado e, após o alinhamento com o material de referência (*A. ferrooxidans* DSMZ 583), percebeu-se 99% de identidade entre as espécies estudadas, sendo considerada uma nova linhagem, que foi denominada de *A. ferrooxidans* NIC11.

Zhang e colaboradores (2013) isolaram uma cepa de *A. ferrooxidans* QXS-1 de uma região que sofre com DAM na mina Qixiashan, na China. O local de coleta da amostra para isolamento apresentava coloração marrom avermelhada, típico da presença de ferro férrico e pH 3,0. O isolamento foi realizado após enriquecimento usando 9K e purificação com meio 9K-agarose (agarose à 5%). A espécie foi confirmada por PCR usando *primer* universal 27F para a região 16S rRNA. Esta linhagem exibiu uma característica incomum para a espécie. As células que foram cultivadas apenas em enxofre, somente utilizaram esta fonte de energia durante seu crescimento em 9K, contendo ferro e enxofre como fonte de energia, enquanto que as bactérias isoladas em meio ferro-oxidante utilizaram as duas fontes de energia quando cultivadas em 9K com ferro e enxofre. Além disso, estes autores demonstraram que a

cepa QXS-1 exibiu notável capacidade de biolixiviar a marmatite, extraindo 6585 mg/L de zinco em 18 dias de experimento em frasco agitado.

No Brasil *A. ferrooxidans* foi isolado por Garcia Jr. (1991), a partir de amostras sólidas e líquidas com pH ácido (abaixo de 4), nos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Bahia, sendo este último obtido no efluente de lixiviação em coluna da mina de urânio de Lagoa Real (no Sudoeste baiano). O procedimento foi realizado utilizando-se meio 9K para o enriquecimento e 9K-agarose (agarose 0,45%) para a purificação da cultura. A incubação foi realizada à 30°C e sob agitação (150 RPM). Foram obtidos 13 isolados de *A. ferrooxidans* que foram identificados pelo crescimento utilizando íon ferroso, enxofre elementar e tiosulfato como fonte de energia, tendo estes isolados apresentado diferenças quanto à eficiência da utilização dessas fontes energéticas.

Após isolamento, Garcia Jr. (1991) procedeu a uma investigação sobre o crescimento de 4 dos isolados, usando meio T&K (uso deste meio para evitar formação de precipitados). A investigação foi feita por meio da observação da oxidação de íon ferroso (medida por titulação com dicromato de potássio 0,1 N), turbidez da colônia e contagem de colônias em placas com 9K-agarose. Garcia observou que a viabilidade bacteriana declina rapidamente após o seu crescimento máximo ($8,0 \times 10^6$ cel/mL), o que ocorreu após 60 horas de cultivo. Passadas 72 horas de cultivo, o número de células caiu pela metade. Além disso, constatou-se, pela boa correlação existente entre os parâmetros usados para avaliar o crescimento, que a medição da oxidação de íon ferroso é suficiente para a realização desta avaliação, sendo um modo fácil e confiável de realizar esta avaliação em comparação à turbidez e à contagem de colônias em placas.

Shirakawa e colaboradores (1991) também isolaram essa bactéria, a partir de amostra de arenito cimentado por sulfetos. O arenito foi coletado em uma região rica em pirita do Porto de Areia de Itaquaquecetuba (São Paulo). O isolamento foi realizado após enriquecimento com meio 9K e purificação pela técnica do isolamento de colônias únicas, utilizando para isto placas contendo meio sólido 9K-agarose.

A. ferrooxidans, no entanto, não são encontradas apenas em locais que sofrem com a DAM. Estas bactérias também já foram isoladas, por exemplo, de amostras de lodo de esgoto por Zhou e colaboradores (2003) e de um sistema geotérmico de um vulcão por Lavallo e colaboradores (2005). A presença desta espécie nos locais

citados deve-se, principalmente, à grande quantidade de enxofre presente nestes ambientes.

É importante salientar que esses estudos sobre o cultivo e obtenção de bactérias isoladas são de extrema importância e pré-requisito para estudos fisiológicos e aplicações destes micro-organismos em processos de biolixiviação.

3.3 BIOLIXIVIAÇÃO

A biolixiviação não é um processo biotecnológico novo, sendo usado desde a pré-história; provavelmente, Grécia e Roma extraíam cobre há 200 anos desta maneira (Bosecker, 1997); no entanto, obviamente, não conheciam os princípios físico-químicos e biológicos atuantes no processo. A interação entre a bactéria e o mineral, como responsável pela produção das lixívias, foi estabelecida apenas em 1951, por Temple & Colmer (1951), após o isolamento da bactéria *A. ferrooxidans*.

3.3.1 Mecanismos de ação das bactérias na biolixiviação

As bactérias agem durante o processo de biolixiviação atacando os minerais sulfetados de três formas básicas, segundo Crundwell (2003): ataque por contato direto, por contato indireto e de maneira indireta (Figura 2).

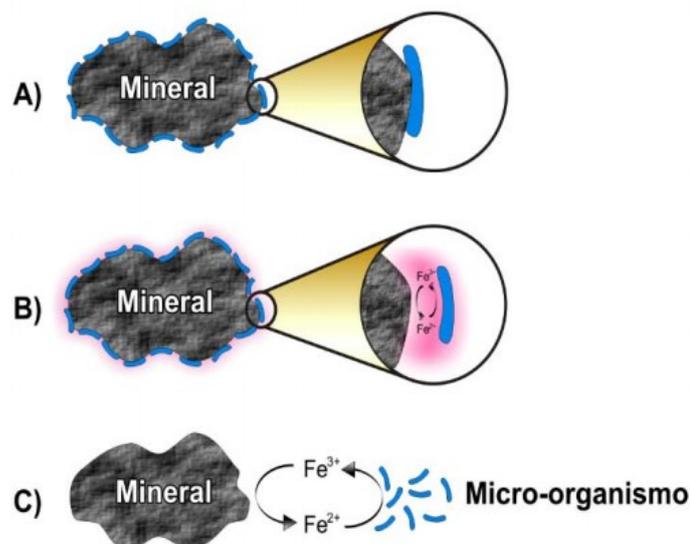


Figura 2 - Mecanismos de ação da bactéria na biolixiviação: A) Mecanismo de contato direto; B) mecanismo de contato indireto; C) mecanismo indireto (Oliveira *et al.*, 2010).

Anteriormente, acreditava-se que a oxidação era gerada por uma ação indireta, porém Berry & Murr (1978) e Bennet & Tributsch (1978) perceberam, em seus estudos, evidências da ação direta destes micro-organismos pela secreção de algumas substâncias. Atualmente, inúmeras pesquisas confirmam que os três mecanismos ocorrem simultaneamente em um sistema de lixiviação (Tributsch, 2001).

O mecanismo de contato direto ocorre quando a bactéria adere à superfície do sulfeto durante a dissolução oxidativa do mineral, mediada por enzimas que atuam diretamente em sua estrutura cristalina. A bactéria utiliza enzimas para atacar os minerais oxidáveis através do contato físico entre eles. Nesse processo, a bactéria obtém energia da troca de elétrons entre o elemento oxidado (Fe^{2+} ou S) e o oxidante (O_2). Os elétrons da oxidação são transportados através de proteínas na membrana das células. A transferência eletrônica fornece energia que é, então, associada à formação de trifosfato adenosina (ATP), responsável pela circulação de energia da célula (Tributsch, 2001).

No mecanismo de contato indireto, uma substância exopolimérica é secretada pela bactéria e esse polímero é importante na dissolução do minério, pois esta complexa-se ao ferro, conferindo carga positiva à célula, estabelecendo-se, assim, uma atração eletrostática entre o micro-organismo e a superfície carregada negativamente de alguns minerais (Crundwell, 2003).

No ataque indireto, por sua vez, não há adesão ou contato da bacteriana com a superfície do mineral, não ocorrendo ação direta contra a estrutura atômica do mineral. A bactéria gera Fe^{3+} por solubilização oxidante do Fe^{2+} . O Fe^{3+} , forte agente oxidante, reage com outros metais, tornando-se solúvel, e nesta reação o Fe^{2+} é novamente oxidado, lixiviando o minério (Tributsch, 2001).

Sand e colaboradores (2001) propõem dois tipos diferentes de mecanismos indiretos de oxidação: o mecanismo tiosulfato e o mecanismo polissulfeto (Figura 3). O primeiro (Figura 3A) ocorre com pirita (FeS_2), molibdenita (MoS_2) e tungstenita (WS_2), no qual a oxidação do sulfeto pelo íon férrico gera tiosulfato como intermediário, sendo este novamente oxidado pelo íon férrico; este íon, por sua vez, é fornecido pela oxidação direta dos íons ferrosos pela bactéria. Já o mecanismo polissulfeto (Figura 3B) ocorre com calcopirita (CuFeS_2), esfarelita (ZnS), galena (PbS), entre outros, no qual a dissolução desses sulfetos inicia-se pelo ataque de

prótons com geração de ácido sulfídrico, que são então oxidados em ambiente ácido a enxofre elementar e posteriormente oxidados biologicamente a ácido sulfúrico.

Segundo Schippers & Sand (1999), a diferenciação dos mecanismos com formação de tiosulfato e polissulfeto ocorre devido à estrutura cristalina do sulfeto mineral. No caso da pirita, da molibdenita e da tungstenita, as bandas de valência são derivadas somente dos orbitais dos átomos de metais, enquanto que, para todos os demais sulfetos minerais, as bandas de valência são derivadas de ambos os orbitais, isto é, do metal e do enxofre. Conseqüentemente, as bandas de valência da pirita, molibdenita e tungstenita não contribuem para a quebra da ligação entre o metal e o enxofre. Esta ligação pode somente ser quebrada por várias etapas de oxidação pela ação do agente oxidante (Fe^{3+}). Já no caso do mecanismo do polissulfeto, os sulfetos rompem a ligação que existe entre o metal e o enxofre antes que o enxofre seja oxidado.

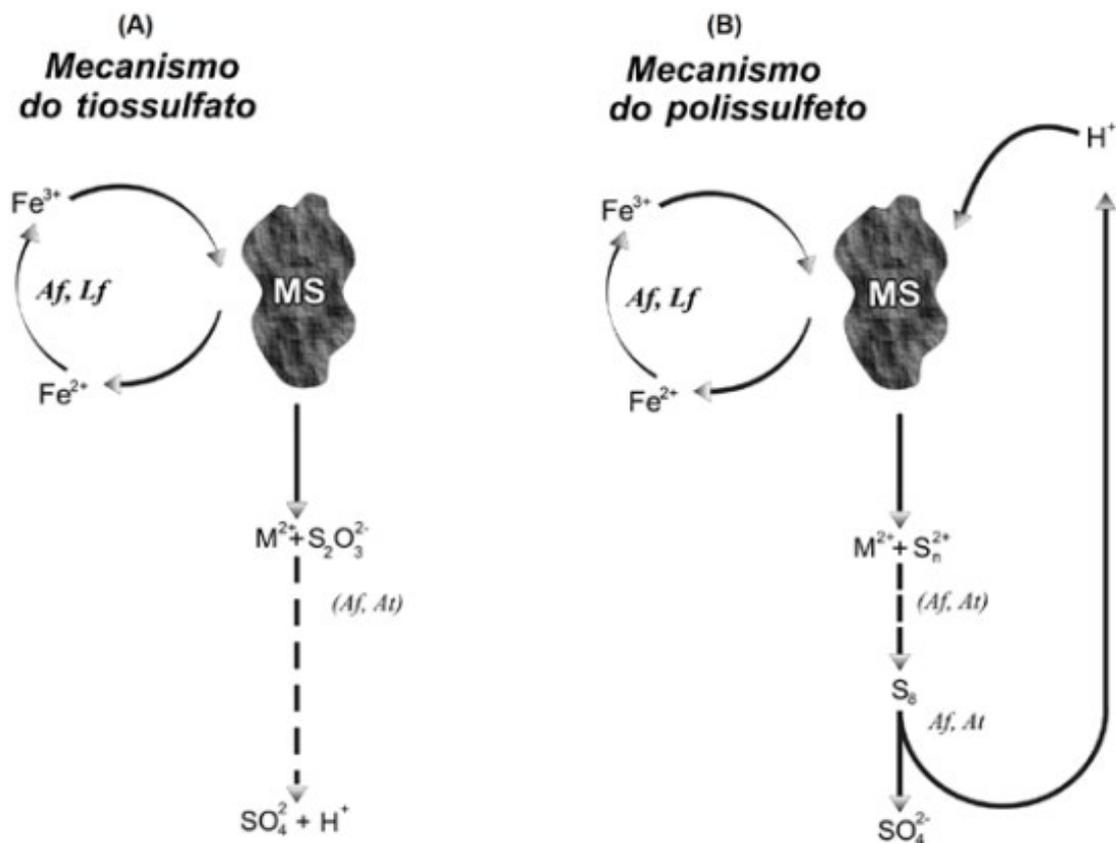


Figura 3 - Mecanismo de oxidação do (A) tiosulfato e (B) polissulfeto. Onde: M^{2+} : íon metálico; $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$: tiosulfato; S_n^{2-} : polissulfeto; S_8 : enxofre elementar; *A.f.*, *Lf.*, *At.*: reação enzimática catalisada por *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* e/ou *A. thiooxidans* (Sand et al., 2001).

3.3.2 Biolixiviação de cobre

A biolixiviação representa 20%, aproximadamente, da extração mundial de cobre e está sendo utilizada em cerca de 20 minas no mundo com bastante sucesso para recuperação deste metal a partir de sulfetos de cobre (Lima, 2011). Esta técnica tem como vantagem o baixo custo operacional e curto tempo de construção de uma planta (Pradhan *et al.*, 2008a), além da não liberação de gás sulfídrico (SO_2), o que ocorre na rota tecnológica comumente usada para obtenção de cobre a partir de sulfetos minerais desse metal, a pirometalurgia (Watling, 2006).

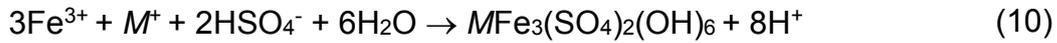
A utilização da biohidrometalurgia vem crescendo e países como Chile, Peru, Austrália, EUA, China, Canadá, dentre outros aplicam a biolixiviação para a extração de, entre outros metais, o cobre (Francisco Jr. *et al.*, 2007).

Os principais sulfetos minerais de cobre utilizados para extração deste metal por biolixiviação são a calcopirita (CuFeS_2), bornita (Cu_5FeS_4), covelita (CuS) e calcocita (Cu_2S) (Lima, 2006).

A calcopirita é o sulfeto mineral de cobre mais abundante na natureza (Carneiro & Leão, 2005), porém é um mineral refratário, ou seja, não responde satisfatoriamente à lixiviação/solubilização direta por ação de um agente lixiviante (Zhou *et al.*, 2009). Habashi (1978) demonstrou em seus experimentos que a energia de rede da calcopirita é mais alta ($\cong 17000 \text{ KJ/mol}$), quando comparada a outros sulfetos minerais, como a calcocita, covelita, pirita e outros, o que dificulta a quebra da ligação e consequente oxidação. Isto, por sua vez, torna a cinética da lixiviação lenta e leva a uma baixa taxa de extração de cobre (Zhou *et al.*, 2009). Este é o principal problema que dificulta a aplicação industrial da biolixiviação com este sulfeto. Porém, já foi demonstrado que as estruturas cristalinas refratárias que atrapalham a lixiviação podem ser rompidas com a utilização de bactérias específicas do próprio minério (Luz & Lins, 2004).

No processo de biolixiviação da calcopirita, a bactéria age no minério, oxidando íons ferrosos, o que leva a um consumo de íons de hidrogênio e consequentemente a um aumento do pH do meio e produção de grande quantidade de íons férricos, que devido à acidez precipitam, em parte, como hidróxidos e jarosita (Lima, 2006).

A jarosita é um hidrossulfato básico férrico com fórmula $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, onde M pode ser K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ag^+ ou H_3O^+ . A reação abaixo mostra como a jarosita pode ser formada (Lima, 2006).



A formação e precipitação de jarosita sobre a superfície do mineral levam também à diminuição na taxa de lixiviação. Segundo Muñoz e colaboradores (1995), a jarosita adere às partículas do minério, formando uma camada que impede o contato do minério com a solução lixivante, acarretando a paralisação do processo de lixiviação.

Segundo Vilcáez e colaboradores (2008), o controle do pH em torno de 1,5 e 2,0 durante o processo de lixiviação bioassistida, no entanto, leva a uma menor precipitação de sais férricos, como a jarosita, sendo esta uma alternativa importante para uma recuperação de cobre mais eficiente por biolixiviação.

Além da formação de jarosita, a passivação da lixiviação da calcopirita também pode ocorrer devido à formação de enxofre elementar, liberado na reação de oxidação desse mineral, o qual forma um filme na superfície das partículas dos sulfetos, impedindo a continuidade do processo de dissolução oxidativa. Porém, a bactéria *A. ferrooxidans* oxida o enxofre elementar formando sulfato, o que minimiza esse problema (Dutrizac, 1989; Lima, 2006).

Algumas substâncias tem sido investigadas para melhorar a dissolução da calcopirita, com destaque para os íons cloreto; entretanto, os estudos que envolvem esses íons e as bactérias consideram que a influência desses íons na atividade bacteriana pode otimizar a dissolução da calcopirita, uma vez que as taxas de transferência de elétrons em solução com cloreto são maiores que em solução de sulfatos, mas ao mesmo tempo inibem o crescimento da bactéria (Winand, 1991; Lu *et al.*, 2000a, 200b; Liddicoat & Dreisinger, 2007).

Existe muita controvérsia na literatura a respeito da ação dos íons cloreto na lixiviação da calcopirita. Lu e colaboradores (2000a) realizaram teste de microscopia eletrônica de varredura e observaram que as partículas de calcopirita lixiviadas na ausência de íons cloreto foram completamente cobertas por um filme de enxofre

amorfo, enquanto que, nas lixiviadas na presença desse íon, o filme mostrou-se mais poroso e cristalino, diminuindo o efeito da passivação do processo.

No entanto, estudos feitos por Yoo e colaboradores (2010) demonstraram o efeito dos íons cloreto na elevação da cinética da lixiviação da calcopirita, devido ao aumento do potencial crítico causado pela formação de complexos entre íons cuproso-cloreto no sistema. Os mesmos resultados também foram obtidos por Winand (1991), Puvvada & Murthy (2000), Skrobjan *et al.* (2005) e Carneiro & Leão (2005).

Alguns pesquisadores têm estudado a seleção e/ou obtenção de linhagens bacterianas, por melhoramento genético, por exemplo, mais adaptadas à alta concentração de íons cloreto (Lu *et al.*, 2000a, 2000b; Liddicoat & Dreisinger, 2007; Yoo *et al.*, 2010), a fim de otimizar o processo de extração de cobre a partir da calcopirita.

Firmino e colaboradores (2012) testaram diferentes linhagens de *A. ferrooxidans* no estudo para avaliar a capacidade de lixiviação da calcopirita na concentração de 50 mmol/L de íons cloreto. As linhagens AMF, LR, V3, ATCC, PCEL, S e SJ22 foram capazes de oxidar esse mineral na presença de cloreto. Estes resultados, por sua vez, servem de base na escolha das linhagens que são mais halotolerantes para futuros testes de biolixiviação.

Além da utilização de cloreto, o efeito dos íons prata também tem sido bem estudado. Sato e colaboradores (2000), por exemplo, estudaram o efeito da adição da prata na forma de sulfato e de cloreto na biolixiviação de concentrado de calcopirita juntamente com *A. ferrooxidans*, e obtiveram uma boa extração de cobre (65%) nos primeiros vinte dias de experimento. Nesse estudo, ocorreu certa inibição na capacidade oxidativa da bactéria quando o meio utilizado continha sulfato de prata, em relação ao meio com cloreto de prata, provavelmente devido à diferença de solubilidade dos compostos, já que em concentrações de prata superiores a 0,01 mMol/L ocorre uma inibição na atividade oxidativa de sulfetos e na oxidação do íon ferroso pelo *A. ferrooxidans* (De *et al.*, 1996). Ao utilizar o AgCl, que é mais insolúvel do que o Ag₂SO₄, a concentração de prata livre foi menor e, assim, a atividade bacteriana foi maior, determinando melhor taxa de extração do cobre.

Yuehua e colaboradores (2002) demonstraram, em estudos realizados em frascos agitados, a possibilidade de se utilizar prata como AgNO₃ ou prata contida em

concentrados minerais e sulfetos como a argentita (Ag_2S), como via alternativa para lixiviar calcopirita de forma mais eficiente. Os rendimentos finais de extração de cobre do minério estudado foram de 79,5%, 90,5% e 67%, na presença de AgNO_3 , de concentrado contendo prata e de Ag_2S , respectivamente. Nos frascos controle (sem Ag^+), os rendimentos não atingiram 30%.

Após a lixiviação dos sulfetos de cobre, se obtém uma lixívia ácida, contendo os íons de cobre, estando as impurezas metálicas disponibilizadas na forma de sulfato, o que permite a recuperação do referido metal, quer por cementação ou pela purificação/concentração, por extração por solvente, seguida da eletrorecuperação obtendo-se esse metal com alta pureza (99,99%) (Souza *et al.*, 2007).

2.3.3 Biolixiviação na Bahia

No Brasil, o interesse pela biolixiviação começou no início dos anos 1970 com o isolamento de *A. ferrooxidans* em águas de minas, e pela realização de alguns trabalhos sobre a potencialidade de recuperação de cobre por bactérias. A partir desta década várias instituições brasileiras começaram a realizar trabalhos na área (Garcia Jr. & Urenha, 2001).

Na Bahia, o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CEPED) iniciou estudos nessa área objetivando aproveitar minério de baixo teor da mina Caraíba e de pequenos depósitos que ocorriam na região circunvizinha (Marques, 1988).

O Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) estuda a biolixiviação desde a década de 1980. Em 1980, Souza (1980) realizou a primeira publicação do CETEM com o tema, estudando o minério sulfetado de cobre de baixo teor da Caraíba S.A. (produtora de cobre no interior da Bahia) em frasco agitado, em escala de bancada, usando *A. ferrooxidans*, conseguindo 51% de extração em 30 dias. Souza (1980) também testou a lixiviação em coluna obtendo-se uma extração de apenas 16% depois de 4 meses de experimento.

Andrade & França (1984) concluíram sobre a influência da concentração do inóculo inicial de *A. ferrooxidans* na biolixiviação do minério de cobre da Caraíba S.A. (BA), demonstrando que a concentração de 10^5 cel/mL foi mais eficiente na extração do metal, sendo superior a 50% após 120 dias de ensaio.

Em 2007, o CETEM colocou em operação a Unidade Semipiloto de Biolixiviação, sob o patrocínio da Mineração Caraíba S.A. (BA) em parceria com a empresa GEOBIOTICS LLC. Esta unidade está instalada no CETEM - RJ, sendo a primeira construída no Brasil a utilizar essa tecnologia (IBRAM, 2008).

Em um estudo recente do CETEM, Lima (2011) - utilizando consórcios microbianos com bactérias mesófilas (*Leptospirillum* spp.), termófilas moderadas (*Sulfobacillus* spp.) e termófilos extremos (*Sulfolobus* spp. e *Sulfolobus acidocaldarius*), para biolixiviação de concentrado de flotação da Caraíba S.A. (contendo 70% de calcopirita) - obteve excelente extração, 89% de extração de cobre nos ensaios em coluna, após 70 dias de experimento. Desta forma, a autora demonstrou que a biolixiviação com consórcios é uma alternativa bastante eficiente na extração de minerais refratários, como a calcopirita, que é um mineral abundante nas minas da Mineração Caraíba S.A. (BA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

4.1.1 Local da amostragem

A amostragem do sedimento usado no isolamento da bactéria de interesse foi realizada na Serra de Jacobina, nas proximidades do povoado de Itapicuru (11° 15' S e 40° 30' W) que dista 12 km da cidade de Jacobina – BA (Figura 4), no extremo norte da Chapada Diamantina, à 320 km a noroeste de Salvador – BA (Infomine, 2012).

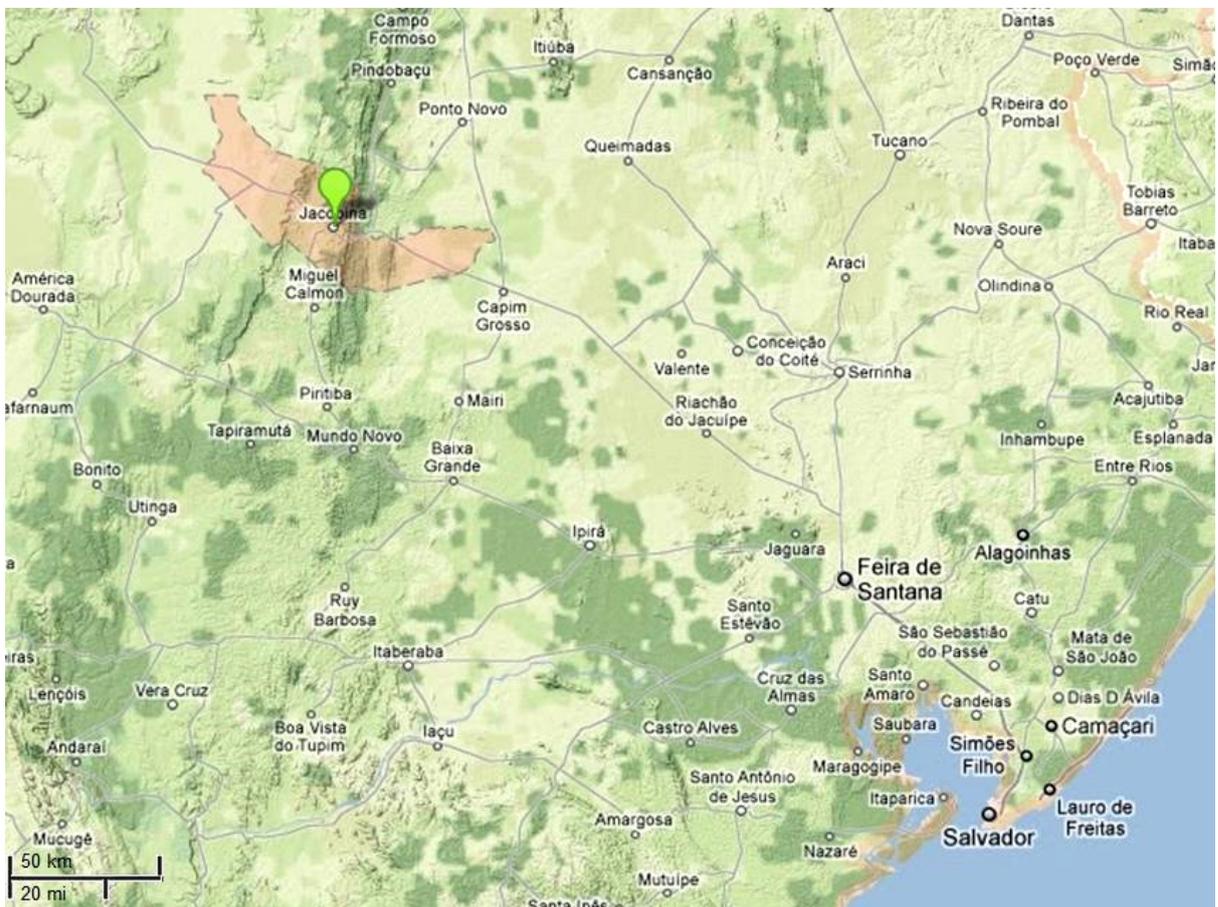


Figura 4 - Localização da cidade de Jacobina – BA (Google maps, 2012).

Na Serra de Jacobina, os principais depósitos de ouro estão predominantemente encaixados em metaconglomerados oligomíticos ricos em pirita e fuchsita mica verde (Formação Córrego do Sítio) (Porto *et al.*, 2002).

Os diferentes corpos mineralizados são constituídos principalmente de seixos de quartzo, dentro da matriz arenosa com pirita, ouro, sericita, moscovita e fuchcita. A pirita é o sulfeto dominante, ocorrendo em até 30% na matriz, na forma angular ou nodular, com diâmetro variando de 0,1 a 2 mm. O ouro ocorre como grãos irregulares de 2 a 20 μm , presentes como inclusões na pirita ou em contato direto com esta; porém também pode ser encontrado como grão livre disperso na matriz, associado a quartzo ou fuchcita. Outros sulfetos, como calcosita, bornita, calcopirita, covelita, esfalerita, galena e molibdenita ocorrem em pequenas percentagens. O óxido de urânio está presente em grãos detríticos. Outros minerais acessórios identificados são: turmalina, zircão, espinélio, torita, monazita, magnetita e cromita (Molinari & Scarpelli, 1988; Carvalho, 2001).

A presença desses sulfetos, principalmente da pirita, fornece nutrientes a bactérias oxidantes, gerando sulfatos, e como consequência tem-se à acidificação das águas na região da Serra.

4.1.2 Metodologia da amostragem

As amostras usadas para o isolamento das bactérias envolvidas na formação de drenagem ácida mineira devem ser coletadas em locais com pH baixo, que contenham algum mineral sulfetado, como em efluentes naturais ácidos de minas, em águas de drenagem de pátios de estocagem de minério ou de rejeitos e, ainda, em soluções produzidas por um processo hidrometalúrgico. Além disso, a coloração marrom avermelhada (Fe^{3+}) também é um bom indício da presença destas bactérias (Garcia Jr., 1989).

Após a observação destes aspectos, foi escolhido o local de coleta que apresentava o pH abaixo de 4 e a coloração indicativa de íon ferroso (Figura 5). A amostra de sedimento foi coletada no dia 10 de maio de 2012 em uma barragem (Figura 6) na região da Serra. Foram coletados, aproximadamente, 250 g de sedimento do local, usando-se saco hermético estéril, sendo estes armazenados sob refrigeração ($\cong 4^{\circ}\text{C}$) no laboratório de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia (UFBA).



Figura 5 - Coloração marrom avermelhada indicativa da presença de Fe^{3+} na barragem.



Figura 6 - Local de onde foi retirada a amostra da barragem.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA

A caracterização microbiológica da amostra foi realizada em BioSigma S.A. (Chile), por meio de um *Microarray* (patentes BioSigma 2007a, 2008 e 2012), técnica esta que usa microchips de DNA especificamente designada para identificar a presença de 25 taxas de micro-organismos biomineiros (identifica o domínio Bacteria e os seguintes taxas desse domínio: *Acidithiobacillus* spp., *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *Acidiphilium* spp., *Leptospirillum* spp., *Leptospirillum* tipo I, *Leptospirillum* tipo II, *Leptospirillum* tipo III, *Desulfovibrio* spp., *Geobacter* spp., *Sulfobacillus* spp.; o domínio Archaea e os seguintes taxas desse domínio: *Acidianus* spp., *Ferroplasma* spp., *Ferroplasma* tipo I, *Ferroplasma* tipo II, *Metallosphaera* spp., *Sulfolobus* spp., *S. acidocaldarius*, *S. tokodaii*, *Thermoplasma* spp., *T. acidophilum*, *T. volcanium*; e o domínio Eukaryote) e 8 funções biológicas destes taxas que são relevantes para a biolixiviação (formação de biofilme, oxidação de ferro e enxofre, fixação de nitrogênio, fixação de carbono, mobilidade, quimiotaxia e *quorum sensing*).

O *Microarray*, realizado por esta empresa é feito por meio de um *software* personalizado desenvolvido junto com o LBMG/CMM (Laboratory for Bioinformatics and Mathematics of the Genome/ Centre for Mathematical Modeling) da Universidade do Chile.

Antes da realização do *Microarray*, foi realizada pela BioSigma S.A. a extração de DNA (patentes BioSigma, 2009 e 2011) dos micro-organismos presentes no sedimento coletado.

4.3 ISOLAMENTO DE *A. FERROOXIDANS*

O isolamento da bactéria *A. ferrooxidans* foi feito com a amostra de sedimento, sendo realizado primeiramente o enriquecimento dessa bactéria em meio líquido seletivo (a fim de favorecer o crescimento destas, aumentando-as em número, causando a extinção por redução de outros micro-organismos presentes na amostra), com uma posterior inoculação destas, em meio sólido T&K-agarose para a purificação.

4.3.1 Meios de cultura

Abaixo segue a composição e o modo de preparo dos meios usados nos experimentos de isolamento de *A. ferrooxidans*.

Meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1973)

0,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,4 g K_2HPO_4
 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 800 mL de água destilada

Solução A pH ajustado para 1,8 com H_2SO_4 Autoclavada à 121°C durante 20 minutos
--

33,4 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 200 mL de água destilada

Solução B pH ajustado para 1,8 com H_2SO_4 Filtrada com membrana de acetato de celulose 0,22 μm

Misturar soluções A e B na proporção de 4:1, respectivamente no momento do uso. As soluções podem ser armazenadas, separadamente, por no máximo 15 dias, sob refrigeração ($\cong 4^\circ\text{C}$).

Meio T&K-agarose (Garcia Jr. *et al.*, 1992) – meio sólido

Para a elaboração deste meio deve-se preparar o meio T&K, descrito acima, com o dobro da concentração de sais, porém usando 0,1 g/L de K_2HPO_4 , ao invés de 0,4 g/L.

Deve-se preparar, também, uma solução com 0,9% (m/v) de agarose (esterilizada em autoclave à 121°C durante 20 minutos), em igual volume ao meio T&K preparado.

As duas soluções são colocadas em banho maria à 55°C e, após atingirem tal temperatura (importante para não haver hidrólise da agarose provocada pelo ácido), são misturadas e distribuídas imediatamente, em condições estéreis, em placas de petri. Após a solidificação do meio, deve-se realizar o teste de esterilidade em incubadora microbiológica à 30°C. Caso não se for usar as placas posteriormente ao teste, as mesmas devem ser armazenadas sob refrigeração ($\cong 4^\circ C$) até momento do uso.

4.3.2 Procedimento para o isolamento

O isolamento foi realizado usando 4 erlenmeyers estéreis contendo 50 mL de meio T&K estéril (pois facilita as análises, uma vez que não forma precipitados), sendo que em 3 deles foram inoculados 5 g da amostra e um permaneceu apenas com o meio esterilizado (controle) a fim de permitir um fácil reconhecimento da atividade das bactérias e evidenciar que a oxidação puramente química não estava ocorrendo. Os frascos foram incubados em incubadora shaker (marca SOLAB SL-223) a 30°C e 130 RPM (Garcia Jr., 1991).

O período de incubação dependeu do comportamento da amostra inoculada. Quando o crescimento bacteriano atingiu a fase estacionária, que segundo Alves (2010) ocorre quando a porcentagem de oxidação de Fe^{2+} (medida titulando-se o Fe^{2+} residual com dicromato de potássio, detalhes no item 4.6.1) atingir, aproximadamente, 75%, alíquotas de 2,5 mL das culturas foram transferidas para novos frascos contendo 50 mL de meio T&K recém-preparado. Esse procedimento foi repetido 5 vezes sucessivamente, antes da purificação de *A. ferrooxidans* pelo plaqueamento em meio sólido e isolamento de colônias individualizadas (Garcia Jr., 1989).

Para o plaqueamento em meio sólido, uma alíquota de 1 mL de cultura de cada erlenmeyer, na fase estacionária, foi retirada e diluída em série, em tubos contendo 9 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,5% acidificada com ácido sulfúrico concentrado (pH 1,8), até a diluição 10^{-5} (Garcia Jr., 1989; Garcia Jr. *et al.*, 1992). Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi inoculada em placas contendo T&K-agarose, sendo enroladas em filme plástico de parafina (Parafilm[®], para evitar ressecamento do meio) e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por aproximadamente 15 dias, ou até o aparecimento das colônias (Garcia Jr., 1989).

Após o crescimento celular, uma colônia de cada placa foi transferida para o meio T&K e incubadas em shaker a 30°C e 130 RPM. Ao atingir a fase estacionária, foi feito novo plaqueamento das diluições. Este procedimento foi realizado 5 vezes, a fim de garantir a purificação da cultura (Garcia Jr., 1989). Após a purificação, foi realizado o teste de Gram de uma das colônias isoladas.

Após o último plaqueamento, uma colônia isolada foi transferida para o meio T&K e incubadas em shaker a 30°C e 130 RPM. Ao atingir a fase estacionária, uma alíquota de 1 mL de cultura de cada erlenmeyer foi retirada e inoculada em frascos com meio T&K recém-preparado, e armazenadas sob refrigeração à $\cong 4^{\circ}\text{C}$ (cultura estoque).

A linhagem isolada será mantida por repiques a cada três meses em meio T&K recém-preparado a $\cong 4^{\circ}\text{C}$ no laboratório (Oprime, 2001).

4.3.3 Identificação morfológica

A identificação morfológica das bactérias foi realizada pela técnica da coloração de Gram. Esta técnica foi realizada com as colônias que cresceram em meio sólido, durante a fase logarítmica de crescimento. Foram observadas a forma, arranjo celular e coloração.

Inicialmente, foi realizado um esfregaço das bactérias de cada colônia em lâminas de microscopia contendo 10 μ L solução salina 0,9% estéril. Após a fixação destas bactérias na lâmina com ajuda de uma chama, foi adicionado solução de cristal violeta até cobrir o esfregaço. Esta solução permaneceu na lâmina por 1 minuto, sendo posteriormente lavada em água corrente. A lâmina foi coberta, então, com lugol por 1

minuto, sendo após este tempo lavada em água corrente. Foi adicionada solução descorante (acetona) por 30 segundos, seguido de uma lavagem com água corrente. Por fim, colocou-se fucsina por 30 segundos, seguido de nova lavagem com água corrente. Esperou-se a lâmina secar e observou-se ao microscópio óptico na objetiva de 100x com óleo de imersão.

4.3.4 Identificação molecular

Após o isolamento, foi realizada a identificação a nível molecular das bactérias presentes na cultura, das três amostras, a fim de confirmar a presença de *A. ferrooxidans*.

Para a identificação foi realizado, pela BioSigma S.A., a extração do DNA dos micro-organismos, seguindo as patentes BioSigma (2009 e 2011). O DNA extraído, por sua vez, foi usado para realizar uma qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa, seguindo as patentes BioSigma, 2007b e 2007c), usando *primer* específicos para *A. ferrooxidans*, sendo então possível identificar e quantificar, em cel/mL, esta espécie na cultura.

4.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

O crescimento de *A. ferrooxidans* no meio de cultura foi acompanhado de forma indireta, retirando-se, de 12 em 12 horas, alíquotas de 1 mL do frasco inoculado (com a bactéria) e do controle (meio estéril sem bactéria) para determinação de Fe^{2+} residual por meio de titulação com solução padrão de dicromato de potássio 0,1 N (detalhes no item 4.6.1) e 2 mL para determinação do Eh (detalhes no item 4.6.2).

4.5 ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO

4.5.1 Minério

O minério que alimenta a planta de flotação da Mineração Caraíba S.A foi fornecido por essa empresa para a realização deste ensaio. Este minério possui cerca de 95% de suas partículas inferior a 212 μm e 55% inferior a 74 μm , e é composto de

97% de silicatos (90% de hiperstênio, 5% de plagioclásio e 2% de magnetita), 2% de sulfetos de cobre (3/4 de calcopirita e 1/4 de bornita) e 1% de outros minérios, sendo a concentração de cobre total igual a 0,9% (CETEM, 1989).

4.5.2 Ensaio em frascos agitados

A lixiviação em frascos agitados ocorreu em escala de bancada, a fim de avaliar a capacidade oxidativa da bactéria *A. ferrooxidans* isolada sobre o minério em estudo.

O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, utilizando-se 37,5 g de minério e 150 mL de solução lixivante (solução de ácido sulfúrico com pH 2,0) por frasco (porcentagem de sólidos 20%), sob agitação constante de 130 RPM (em incubadora shaker SOLAB SL-223) e 30°C, durante 60 dias.

Para avaliar a resposta do minério na presença e na ausência de bactérias, foi realizado, para cada solução lixivante, em duplicata, o ensaio com:

- Frasco sem inóculo com adição de formaldeído (5% v/v) para esterilização do minério (controle químico), ou seja, frasco sem bactérias;
- Frasco inoculado (com 10% v/v de *A. ferrooxidans* com 10^6 UFC/mL, sendo a padronização deste inóculo feita pela técnica da contagem em placas, detalhes em 4.6.3), ou seja, com a bactéria isolada e com as possíveis bactérias nativas do minério;
- Frasco sem inóculo e sem formaldeído, ou seja, somente com as possíveis bactérias nativas do minério.

De 20 em 20 dias, foram feitos testes de viabilidade bacteriana a fim de confirmar a ausência de *A. ferrooxidans* nos frascos em que esta bactéria não foi inoculada, e a presença nos frascos em que foi adicionado o micro-organismo isolado. O teste foi realizado retirando-se 1 mL de cada frasco e inoculando-as em 20 mL de meio T&K recém-preparado, sendo estes incubados a 130 RPM e 30°C.

Para obtenção de informações sobre o consumo de ácido pela amostra, o potencial de geração de ácido e o rendimento de extração do metal, foi realizado durante o ensaio o monitoramento, de 48 em 48 horas, do pH (detalhes no item 4.6.2),

e quantidade de Fe^{2+} (detalhes no item 4.6.1) e o monitoramento semanal da concentração de cobre no sólido e seu teor no licor da lixívia.

Antes da medição do pH, o eletrodo foi esterilizado por imersão em solução de formaldeído 5% v/v durante 30 minutos. Para evitar contaminação das amostras, as medições sempre foram iniciadas pelo controle (com formaldeído), seguido pelo frasco, contendo apenas minério, e posteriormente pelo frasco com inóculo de *A. ferrooxidans*.

A cada monitoramento, quando necessário, o pH da polpa era corrigido com ácido sulfúrico concentrado estéril até que o sistema atingisse uma faixa de pH entre 1,5 e 2,0. O volume de ácido utilizado para realizar esta correção de pH foi registrado para se calcular o consumo de ácido em relação à massa do minério.

O monitoramento do teor de cobre foi realizado retirando-se, semanalmente, após homogeneização do sistema, alíquotas de 10 mL da polpa, sendo estas filtradas (poro 25 μm) e lavadas com água deionizada até a neutralização do pH. A parte sólida retida no filtro foi seca e analisada por espectrometria de fluorescência de raios X (detalhes em 4.6.3), enquanto que o líquido filtrado foi analisado por espectrometria de absorção atômica (detalhes no item 4.6.4), a fim de se obter os dados de extração de cobre.

4.5.3 Padronização do inóculo

O inóculo utilizado no ensaio de biolixiviação foi padronizado determinando-se a densidade de *A. ferrooxidans* na cultura pela técnica de contagem em placas, em triplicata.

Para a realização desta técnica preparou-se o meio sólido T&K-agarose e a água diluição (água destilada acidificada à pH 1,8 com ácido sulfúrico concentrado) com Tween 80 a 0,5%.

A água de diluição foi distribuída em volumes de 9 mL em frascos estéreis. Assepticamente foi retirado 1 mL da cultura, sendo transferida para um dos frascos contendo 9 mL de água de diluição, antecipadamente identificado, preparando-se assim a primeira diluição decimal (10^{-1}).

Após a homogeneização do frasco 10^{-1} , foi retirado 1 mL para outro frasco com 9 mL de água de diluição, obtendo-se a diluição 10^{-2} . Este procedimento foi repetido até a obtenção da diluição 10^{-8} .

Os frascos contendo as diluições foram homogeneizadas. De cada frasco foi retirado, assepticamente, 100 μ L de cada diluição, posteriormente inoculada em placa de petri contendo meio T&K-agarose, sendo espalhada com ajuda de uma alça drigalsky estéril. A Figura 7 mostra um esquema resumo do ensaio.

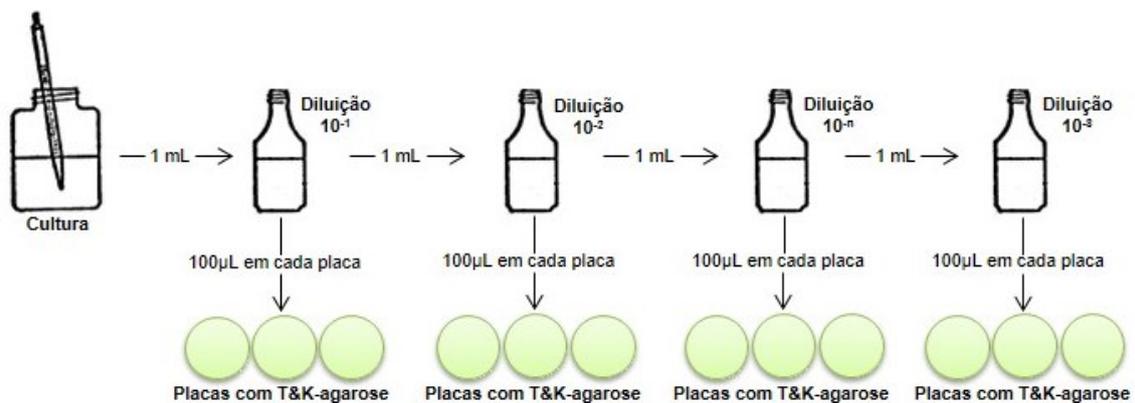


Figura 7 - Esquema da técnica da contagem em placas de *A. ferrooxidans*.

Para certificar a esterilidade do meio de cultura, validando o teste, foram utilizadas 3 placas com T&K-agarose não inoculadas.

As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30°C durante 15 dias. A concentração das bactérias foi obtida multiplicando-se a média das contagens das colônias por placa, pela diluição utilizada, e o resultado foi expresso como número de unidades formadoras de colônia de bactérias por mL (UFC/mL).

4.6 DETERMINAÇÕES ANÁLITICAS

4.6.1 Determinação de Fe^{2+} por titulação com dicromato de potássio

A concentração de Fe^{2+} foi determinada titulando-se o Fe^{2+} residual com solução padrão de dicromato de potássio 0,1 N, seguindo Vogel e Bassett (1981).

A solução padrão de dicromato de potássio deve ser preparada utilizando-se dicromato de potássio 99%. Pesa-se 6 g de dicromato, que é pulverizado num gral de

ágata, e então, aquecido em estufa a 150°C por 1 hora. Deixa-se esfriar num dessecador. Após secagem, pesa-se, com exatidão, 4,9 g de dicromato e transferindo-o, posteriormente, para um balão volumétrico de 1 L usando um funil pequeno para evitar perdas. Dissolve-se o sal em água e completa-se o volume de 1 L.

Para a determinação de íon ferroso no meio de cultura, foi transferido 1 mL do meio, assepticamente, para um erlenmeyer. Foi adicionado 40 µL de difenilaminosulfonato de sódio 0,2% (indicador redox), 8 mL de H₂SO₄ a 2,5% e 200 µL de H₃PO₄ a 85%. A solução padrão de dicromato foi titulada lentamente, com agitação constante, até a solução adquirir uma cor verde acinzentada. Continuou-se a titulação, adicionando-se o dicromato gota a gota e mantendo-se um intervalo de alguns segundos entre uma gota e outra, até que a adição de uma gota gerasse a mudança de coloração para azul violácea, que permanecesse após a agitação e não fosse afetada por posterior adição de dicromato. Este procedimento foi realizado também com o meio de cultura sem bactéria. Efetuou-se a prova em branco com os reagentes e fez-se a devida correção.

Calculou-se a porcentagem de ferro na amostra, sendo que 1 mL de K₂Cr₂O₇ 0,1 N \cong 0,005585 g de Fe (Oehlweiler, 1980).

4.6.2 Determinação do pH e Eh

As determinações do pH foram realizadas usando-se eletrodo combinado de vidro. Para o Eh (potencial oxi-redução) foi utilizado eletrodo de platina (Ag/AgCl).

4.6.3 Fluorescência de raios X

A fluorescência de raios X (XRF) foi realizada para análise do cobre no minério antes e após o processo de biolixiviação, com equipamento da Thermo Scientific Niton modelo XL3.

4.6.4 Absorção atômica

A análise da composição química dos minerais no licor da lixívia foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica de Chama (SpectranAA 55B - Varian).

Toda a vidraria e demais materiais usados na absorção atômica foram anteriormente descontaminados por imersão em detergente neutro a 3% (Extran[®], Merck) por 24 horas, seguido por imersão em ácido nítrico a 20% durante uma noite, e então, lavadas com água pura Tipo I.

A prova em branco dos reagentes foi realizada juntamente com as amostras. Verificações de rotina de exatidão e precisão foram realizadas usando-se, como material de referência, cabelo humano da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA-085). Para o cobre, o valor alvo do material de referência é de 16,8 µg/L, podendo variar entre 15,8 e 17,8 µg/L.

Quando necessário, as amostras foram diluídas em ácido nítrico a 0,2%, para que estas pudessem estar nos limites de detecção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRA

A amostra de sedimento, coletada na barragem, apresentou, após medição com eletrodo, um pH de 3,13 e Eh de 436,5 mV. Este valor de Eh demonstra alta taxa de oxidação, provavelmente devido à presença de bactérias oxidantes na amostra, que, por sua vez, produzem solução ácida, o que pode ser visto pelo baixo valor do pH.

A amostra foi caracterizada a nível molecular por *Microarray*, que identifica 25 taxas de micro-organismos biomineiros. Segundo esta caracterização, não foram encontrados organismos do domínio Eukaryote nem Archaea. Todos os taxas identificados na amostra são do domínio Bacteria. Fazem parte da comunidade bacteriana da amostra *Acidithiobacillus* spp., *A. ferrooxidans*, *Acidiphilium* spp., *Leptospirillum* tipo II (representada pela espécie *L. ferriphilum* – Coram & Rawlings, 2002) e *Sulfobacillus* spp.

Na Tabela 2 estão as bactérias identificadas na amostra coletada com informações sobre o tipo de recurso energético e de carbono utilizado, além das temperaturas e pH ótimos para o seu crescimento.

Tabela 2 - Micro-organismos identificados, por *Microarray* na amostra coletada, com o recurso energético e de carbono utilizado, a temperatura e pH ótimos de crescimento (Johnson & Hallberg, 2003; Johnson & Hallberg, 2009).

Micro-organismos	Recurso energético	Recurso de carbono*	Temperatura ótima	pH ótimo
Bacteria	-	-	-	-
<i>Acidithiobacillus</i> spp.	Oxidante de ferro e enxofre	Autotrófico	-	-
<i>A. ferrooxidans</i>	Oxidante de ferro e enxofre	Autotrófico	25°C – 30°C	2,0 – 3,0
<i>Acidiphilium</i> spp.	Redutor de ferro	Heterotrófico	30°C – 40°C	2,0 – 6,0
<i>Leptospirillum</i> tipo II	Oxidante de ferro	Autotrófico	30°C – 45°C	1,0 – 2,0
<i>Sulfobacillus</i> spp.	Oxidante e redutor de ferro e oxidante de enxofre	Autotrófico facultativo	30°C – 60°C	2,0 – 4,0

*Recurso de carbono: autotrófico – obtém carbono a partir de recursos inorgânicos (CO₂); heterotrófico – obtém carbono de fontes orgânicas; autotrófico facultativo: pode usar tanto carbono de fonte inorgânico como orgânico.

Os valores de pH e Eh, juntamente com a presença de bactérias oxidantes, demonstram que o fenômeno da drenagem ácida realmente ocorre no local de amostragem.

Pelo método do *Microarray*, utilizado neste estudo, também é possível identificar 8 funcionalidades biológicas das bactérias identificadas, que são relevantes para a

biolixiviação (formação de biofilme, oxidação de ferro e enxofre, fixação de nitrogênio, fixação de carbono, mobilidade, quimiotaxia e *quorum sensing*). Apenas a quimiotaxia (que corresponde ao estímulo que leva as células a locomoverem-se em direção a um gradiente químico) não foi identificada no grupo de micro-organismos presentes na amostra.

5.2 ISOLAMENTO DE *A. FERROOXIDANS*

O isolamento da bactéria *A. ferrooxidans* foi realizado com a amostra de sedimento, sendo realizado primeiramente o enriquecimento dessa bactéria em meio líquido seletivo, com uma posterior inoculação destas, em meio sólido T&K-agarose para a purificação.

5.2.1 Enriquecimento

O processo de enriquecimento foi realizado utilizando-se meio líquido T&K, usado para obter bactérias ferro-oxidantes. Quando houve indício de atividade bacteriana (diminuição da quantidade de Fe^{2+} na cultura, mudança de cor e aumento do Eh), sob incubação a 30°C e 130 RPM, esta foi transferida para meio recém-preparado. Após 5 transferências, obteve-se a seleção das espécies de *A. ferrooxidans*.

As espécies do gênero *Leptospirillum*, que também estavam presentes na amostra, também são ferro-oxidantes e poderiam crescer neste meio, porém temperaturas acima de 40°C e valores de pH abaixo de 1,0 seriam as condições mais adequadas para o crescimento de bactérias deste gênero que as do gênero *Acidithiobacillus* (Coram & Rawlings, 2002). Portanto, este procedimento de enriquecimento - com meio T&K (para ferro-oxidantes), com pH inicial de 1,8 e incubação à 30°C (temperatura ótima de crescimento para a espécie *A. ferrooxidans*) - selecionou esta espécie em detrimento às outras, uma vez que causou a redução dos outros micro-organismos presentes na amostra devido à competição entre eles.

No processo de enriquecimento, a cultura chegou à fase estacionária, que, segundo Alves (2010), ocorre quando a porcentagem de oxidação de Fe^{2+} atinge $\cong 75\%$ (medida titulando-se o Fe^{2+} residual do meio com dicromato de potássio), em 2

a 3 dias após o inóculo, tendo um aumento de Eh bastante significativo neste período (de $\cong 300$ mV para $\cong 570$ mV). Além disso, ocorreu a mudança de cor, de verde claro para marrom avermelhado, devido ao aumento da concentração de Fe^{3+} no meio pela atividade oxidativa da bactéria (Figura 8). Resultado semelhante foi obtido por Garcia Jr. (1989).

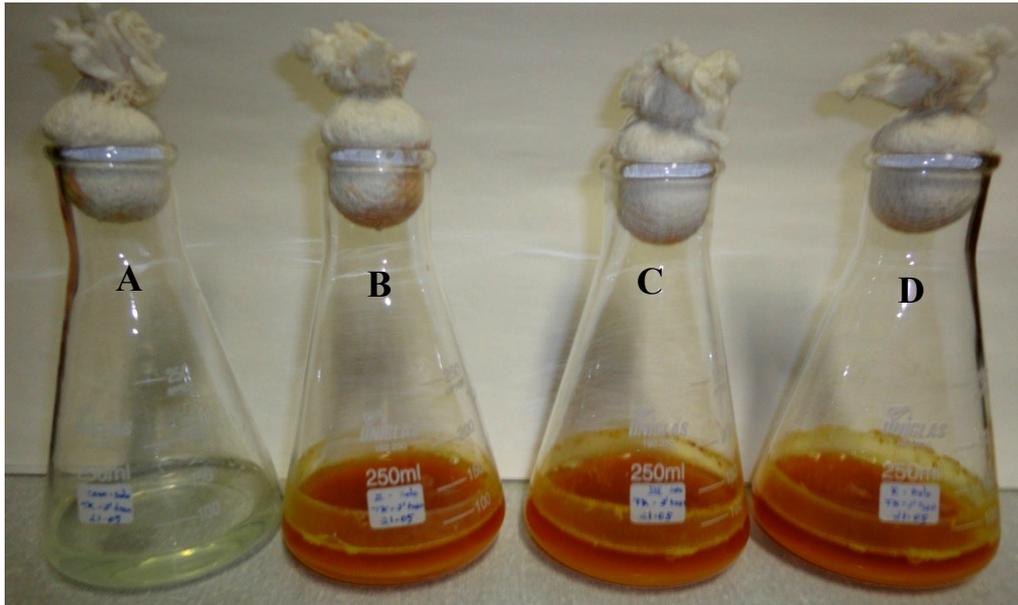


Figura 8 - Erlenmeyers após 3 dias de incubação em shaker a 30°C e 130 RPM. A) Meio T&K sem bactéria; B, C e D) Meio T&K com bactéria, evidenciando a cor marrom avermelhada.

5.2.2 Purificação

A bactéria enriquecida foi então purificada (para obter-se bactérias geneticamente e morfolologicamente idênticas) pelo plaqueamento da cultura, após diluição sucessiva, em meio T&K-agarose. Após o crescimento nas placas, uma colônia isolada de cada replicata foi selecionada e transferida para meio líquido. Ao chegar à fase estacionária, a cultura líquida foi novamente diluída e inoculada em meio sólido. Após repetir 5 vezes este procedimento obteve-se uma cultura pura e isolada.

O crescimento bacteriano em meio sólido foi muito lento. Os primeiros vestígios de crescimento ocorreram, geralmente, no 6º dia após o inóculo, porém só foram obtidas colônias isoladas (Figura 9) do 10º ao 15º dia nas placas mais diluídas. As colônias obtidas possuem margem irregular e apresentam uma coloração marrom avermelhada devido à precipitação do Fe^{3+} , assim como as obtidas por Mishra e colaboradores (1983) e Garcia Jr. (1989).

Existe uma grande dificuldade em cultivar *A. ferrooxidans* em meio sólido, como já foi reportado por Garcia Jr. (1991). Apenas ocorre crescimento desta espécie em tipos purificados de ágar, como a agarose de marcas específicas (Garcia Jr., 1989). A agarose usada para a preparação do meio sólido foi de fabricação VETEC, não sendo comum o crescimento dessa espécie com esta marca de agarose, que é mais barata que outros tipos de agarose mais puros e considerados, até então, mais eficientes.

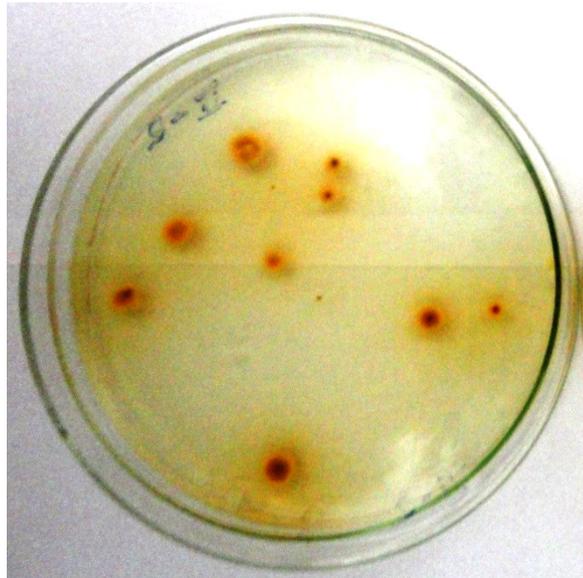


Figura 9 - Colônias de *A. ferrooxidans* isoladas em meio T&K-agarose.

5.2.3 Identificação morfológica

As bactérias isoladas foram coradas pela técnica de coloração de Gram, sendo estas identificadas como Gram negativas, em forma de bastonetes e arranjadas em diplobacilos (Figura 10), igualmente a bactérias do gênero *Acidithiobacillus* (Holt, 1994). No entanto, é importante salientar que *Acidithiobacillus* também podem ocorrer sozinhas ou como estreptobacilos (Jensen & Webb, 1994).

Entre as possíveis bactérias que poderiam estar presentes na cultura, já que estas foram identificadas na amostra por *Microarray*, devido a um possível erro no processo de isolamento, estão: as bactérias do gênero *Sulfobacillus* que apesar de também serem capazes de oxidar ferro são bactérias Gram positivas (Holt, 1994); e a *Leptospirillum* que por sua vez tem forma de vibrião ou espiral (Holt, 1994). As bactérias obtidas no isolamento não possuem tal morfologia, o que corrobora que a bactéria isolada é uma *Acidithiobacillus*.

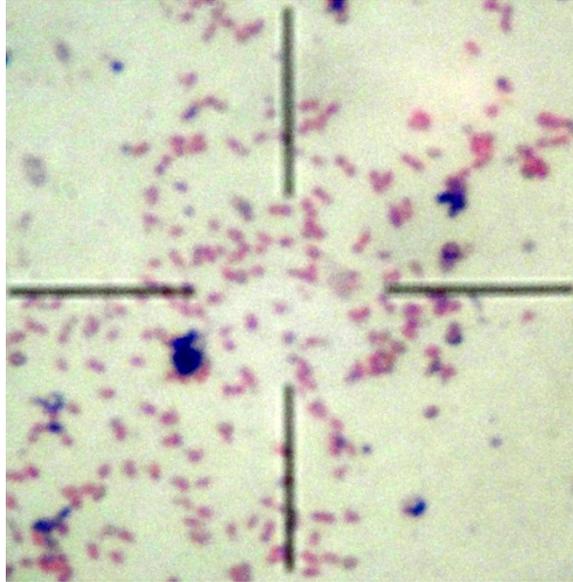


Figura 10 - Bactérias isoladas (cor rósea) após coloração de Gram, vistas ao microscópio óptico.

5.2.4 Identificação molecular

O qPCR é uma técnica que utiliza um *primer* (região iniciadora da replicação do DNA) específico para uma determinada espécie. Neste estudo, foi realizado o qPCR para a espécie *A. ferrooxidans* a fim de confirmar se a mesma era a espécie obtida no processo de isolamento. Após a realização da técnica molecular com as três amostras obtidas no experimento de isolamento, confirmou-se que a bactéria isolada é *A. ferrooxidans*.

Como esta técnica é quantitativa, permite que seja obtido o número de células por mL de meio. O qPCR foi realizado após 72 horas de cultivo, sendo que a concentração celular encontrada para cada uma das três amostras foi em torno de 10^6 cel/mL. A tabela abaixo (Tabela 3) mostra a concentração de DNA extraído e a concentração celular de *A. ferrooxidans* nas três amostras.

Tabela 3 - Concentração de DNA extraído e a concentração celular obtida por qPCR para cada amostra isolada.

Amostras	DNA total extraído (ng/ μ L)	qPCR para <i>A. ferrooxidans</i> (cel/mL)
Isolado I	37,25	$2,7 \times 10^6$
Isolado II	84,63	$5,5 \times 10^6$
Isolado III	67,74	$3,9 \times 10^6$

5.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

A avaliação do crescimento de *A. ferrooxidans* em meio líquido T&K foi realizada de forma indireta, pela determinação por meio de titulação com dicromato de potássio 0,1 N, de Fe^{2+} residual no frasco inoculado e no controle e pela medição do Eh.

Segundo Garcia Jr. (1989), a porcentagem de oxidação de Fe^{2+} do meio é um critério suficiente para acompanhar o crescimento desta espécie bacteriana, assim como demonstrou Hoffman & Hendrix (1976), apesar desta técnica não demonstrar a fase de declínio da cultura. A determinação do Fe^{2+} residual do meio é, portanto, uma boa alternativa em relação à contagem em placas para evitar a perda da cultura pela escassez de nutrientes, uma vez que *A. ferrooxidans* apresenta a dificuldade de crescimento em meio sólido (Garcia Jr. 1991).

A oxidação completa do Fe^{2+} do meio pelo isolado obtido ocorreu após 60 horas de cultivo (Figura 11), assim como foi obtido por Garcia Jr. (1989), enquanto que a oxidação do meio sem bactéria (controle) permaneceu praticamente inalterado, tendo um pequeno aumento após 36 horas devido, provavelmente, a uma oxidação puramente química.

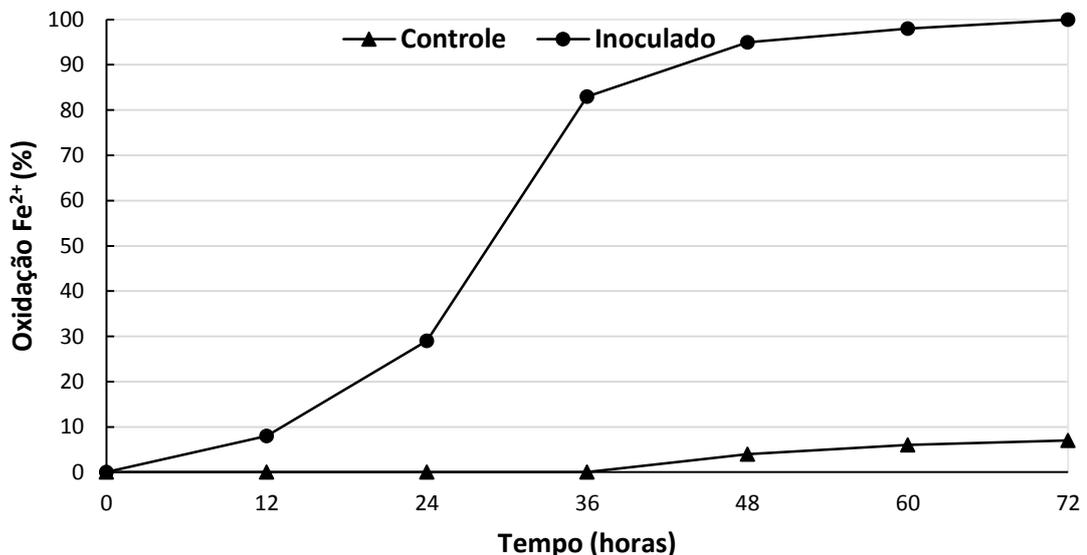


Figura 11 - Curva de crescimento de *A. ferrooxidans* isolado segundo a oxidação de Fe^{2+} .

Garcia Jr. (1989) demonstrou que as culturas de *A. ferrooxidans*, isoladas por ele, tinham uma queda na viabilidade muito rápida após 60 horas de cultivo, com uma

significativa diminuição das unidades formadoras de colônias, obtendo-se após 72 horas de cultivo cerca de metade das células viáveis em relação ao obtido em 60 horas. Este decaimento ocorre provavelmente devido ao esgotamento do nutriente (Fe^{2+}) dessa bactéria e ao acúmulo de Fe^{3+} , o qual é tóxico à este micro-organismo em altas concentrações como afirma Jones e Kelly (1983). Por este motivo, para não perder a cultura, antes da completa oxidação do Fe^{2+} , deve-se transferi-la para um novo meio recém-preparado estéril ou retirá-las da incubação e guardá-las sob refrigeração ($\cong 4^\circ\text{C}$).

Quanto à variação do Eh (Figura 12) durante o crescimento microbiano do isolado, percebe-se que ocorreu um aumento progressivo deste parâmetro, atingindo um pico de 575 mV após 48 horas de cultivo, devido ao aumento da oxidação do sistema. Após este período, o valor do potencial redox começou a diminuir. Isto se deve, principalmente, à diminuição da quantidade de Fe^{2+} disponível para a oxidação (menos de 10% da quantidade inicial), como pode ser observado na Figura 11. Nos frascos sem bactéria (controle), por sua vez, o valor deste parâmetro permaneceu abaixo de 400 mV, demonstrando uma baixa taxa de oxidação, como era esperado.

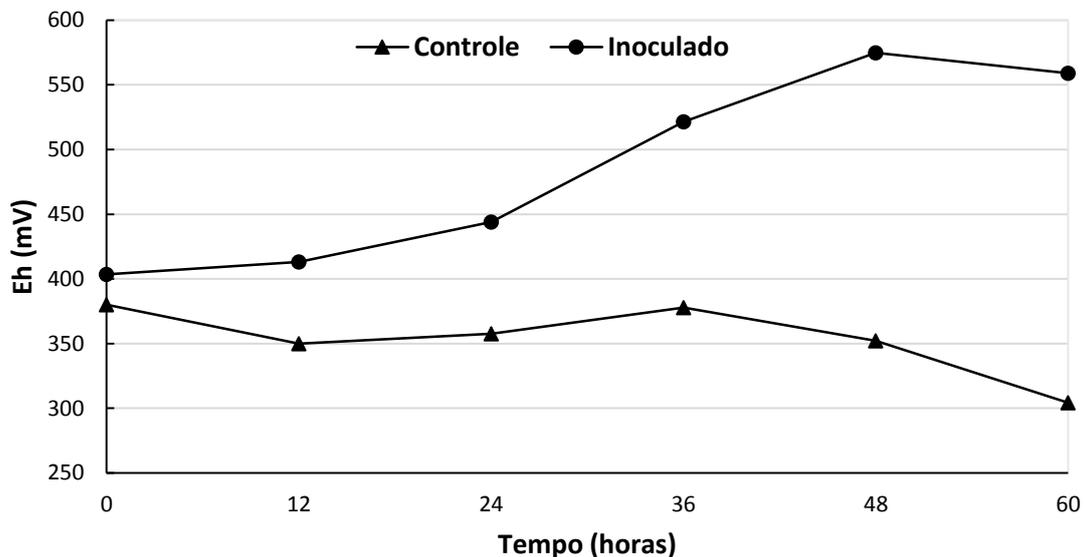


Figura 12 - Curva de crescimento de *A. ferrooxidans* isolado segundo o Eh (mV).

5.4 ENSAIO DE BIOLIXIVIAÇÃO

O ensaio de biolixiviação foi realizado para avaliar a capacidade oxidativa da bactéria *A. ferrooxidans* isolada sobre o minério em estudo. O mesmo foi feito com 20% de sólidos na lixívia, com pH inicial de 2,0, agitação constante (130 RPM), temperatura de 30°C e duração de 60 dias, em três condições: o frasco sem inóculo e esterilizado pela adição de formaldeído; o frasco inoculado com *A. ferrooxidans*; e o frasco sem inóculo e não esterilizado.

No ensaio, foi observada uma solubilização de cobre crescente em todos os tratamentos. Porém, nos frascos em que foi inoculada a bactéria *A. ferrooxidans* isolada, a solubilização do cobre presente no minério foi maior que nos frascos que continham apenas minério e os frascos esterilizados.

Como pode ser visto na Figura 13, já na primeira semana de ensaio, o teor de cobre no licor da lixívia nos frascos com inóculo do isolado foi o triplo do obtido nos outros tratamentos sem adição de bactéria, sendo esta razão mantida durante os primeiros 30 dias de ensaio. Após este período, ocorreu uma diminuição na cinética de recuperação no frasco inoculado.

Quanto aos frascos sem inóculo bacteriano, seja o esterilizado com o formaldeído ou o que continha apenas o minério e solução lixivante, pouca diferença foi observada entre eles. Os frascos que não tinham formaldeído apresentaram uma solubilização do cobre um pouco maior que os frascos sem este agente bactericida (Figura 13), provavelmente devido à possível ação de oxidação das bactérias que estavam presentes no próprio minério, que não *A. ferrooxidans* (uma vez que nos testes de viabilidade bacteriana ambos os frascos sem o inóculo apresentaram resultado negativo para a presença desta). No entanto, ou a biomassa dessas bactérias no minério deve ter sido muito pequena para permitir uma resposta efetiva na extração do cobre, ou os possíveis micro-organismos presentes não são eficientes na temperatura utilizada no ensaio. Já nos frascos com formaldeído estas possíveis bactérias “nativas” do minério foram mortas pela ação dos mesmos, o que teria levado a esta menor solubilização.

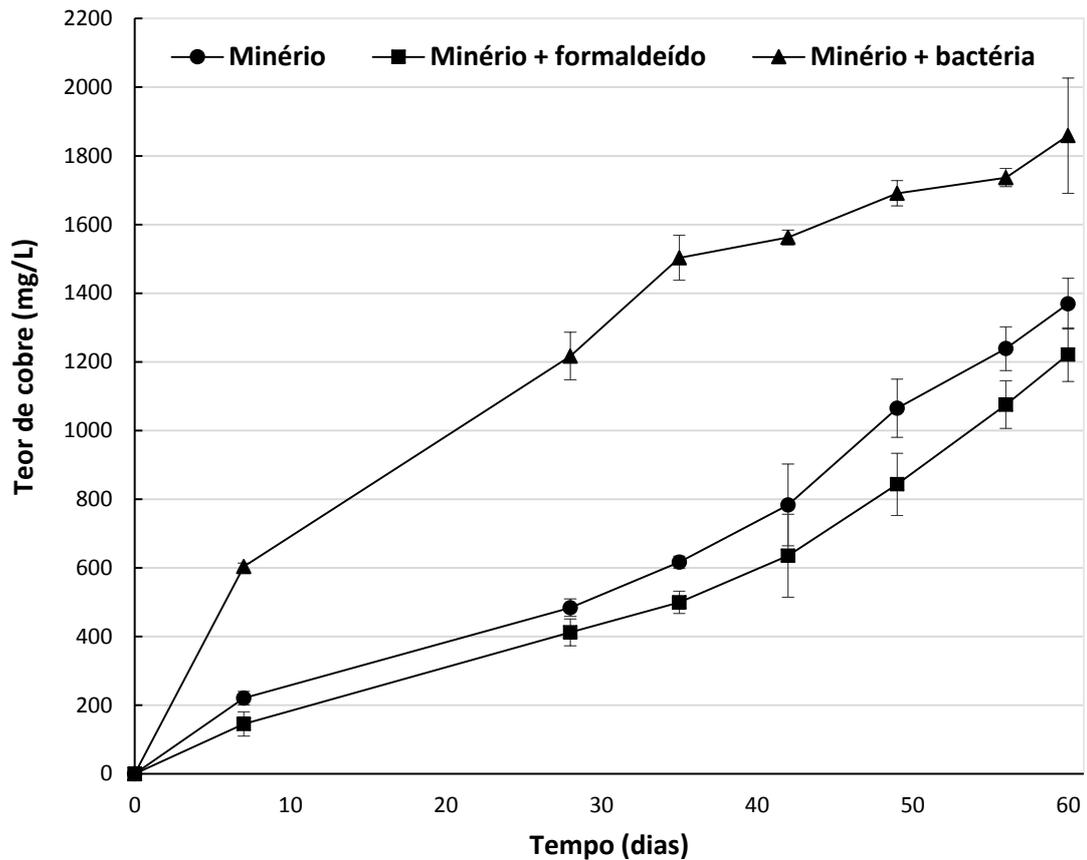


Figura 13 - Teor de cobre no licor da lixívia, em mg/L, durante o ensaio de biolixiviação.

Na Tabela 4, são apresentadas as quantidades de cobre no sólido, obtidas por fluorescência de raios X, antes e após o ensaio de biolixiviação, assim como a recuperação final deste metal. Ao final dos 60 dias de experimento, recuperou-se 58 e 60% de cobre nos frascos com *A. ferrooxidans*, enquanto que nos frascos sem inóculo obteve-se um rendimento de 31 e 35% (com formaldeído) e 37 e 44% (sem formaldeído).

Tabela 4 - Porcentagem de cobre no minério antes e após os 60 dias de ensaio, obtido por fluorescência de raios X, e a recuperação final deste metal.

Tratamentos	Quantidade de cobre no minério (%)		Recuperação do cobre (%)
	antes dos experimentos	após os experimentos	
Experimento I			
Minério	0,849	0,533	37
Minério + formaldeído	0,849	0,550	35
Minério + bactéria	0,849	0,359	58
Experimento II			
Minério	0,849	0,474	44
Minério + formaldeído	0,849	0,584	31
Minério + bactéria	0,849	0,343	60

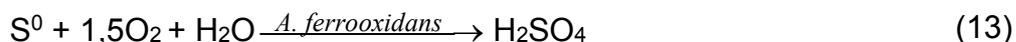
O aumento constante da concentração de cobre na lixívia pode não ser devido à maior solubilização deste durante o experimento, mas devido à evaporação dessa solução, uma vez que este parâmetro não foi controlado durante o ensaio. Porém, os resultados da recuperação comprovam que realmente a solubilização ocorreu e que foi maior nos frascos com a bactéria.

Como também pode ser observado nos resultados apresentados, apesar da refratariedade da calcopirita, foram obtidas extrações de cobre de até 60%, possivelmente por conta da maior suscetibilidade da bornita aos processos oxidativos, como referido na literatura (Mascarin, 1999).

Além da maior recuperação de cobre utilizando a bactéria, foi necessário adicionar menos ácido ($\cong 1,8$ mL) em relação aos frascos sem o inóculo ($\cong 2,5$ mL). O consumo de ácido pelo sistema foi realizado com a consequente liberação do cobre na forma de sulfato de cobre, segundo a reação abaixo:



Este menor consumo de ácido no frasco inoculado ocorreu porque o ácido utilizado pelo sistema na reação de oxidação dos sulfetos neste frasco foi produzido pela bactéria *A. ferrooxidans* adicionada, segundo as reações:



O ensaio foi realizado sem adição de nutrientes, sendo utilizado o próprio minério para prover as necessidades energéticas da bactéria. Isto foi feito, pois as plantas industriais evitam esta adição a fim de prevenir a precipitação de sólidos, como a jarosita, que possam prejudicar o processo de biolixiviação (McCready *et al.*, 1986). De acordo com o resultado obtido, o minério utilizado forneceu nutrientes necessários ao crescimento da bactéria estudada e conseqüentemente o sucesso na solubilização/recuperação do cobre utilizando a mesma.

O pH inicial do processo foi 2,0, visto que este é o valor de pH ótimo para o crescimento de *A. ferrooxidans*. Para manter o crescimento ótimo deste micro-

organismo e evitar a formação de jarosita durante o ensaio, foi de suma importância realizar a manutenção do pH. Lima (2006) mostrou que a recuperação de cobre a partir do concentrado de flotação de sulfetos deste metal é 55% maior com controle de pH, do que a alcançada sem o controle do mesmo.

A curva dos valores de pH no gráfico da Figura 14 corresponde à verificação inicial desse parâmetro, ou seja, antes do ajuste do mesmo a faixa ótima de 1,5 a 2,0. Estes dados permitem identificar a ação dos micro-organismos com relação à produção de ácido e ao consumo do mesmo pelo sistema.

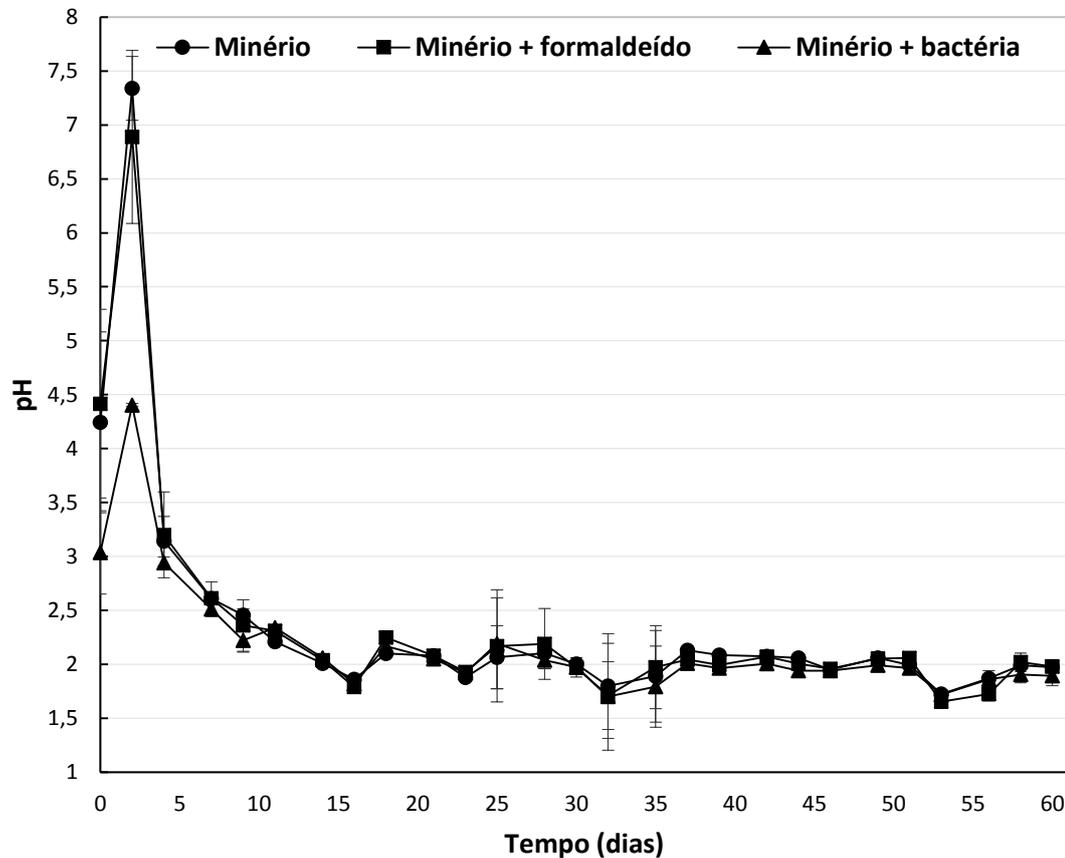


Figura 14 - Variação do pH da polpa durante o ensaio de biolixiviação, antes do ajuste à faixa de 1,5 a 2,0.

É possível avaliar que, nos primeiros dias de ensaio, o pH sofreu um acréscimo significativo, chegando a ser superior a 7,0 nos ensaios sem inóculo bacteriano e aproximadamente 4,0 nos frascos contendo o isolado. Este aumento do pH foi devido ao grande consumo do ácido presente na solução lixiviante para a oxidação do minério. No entanto, o pH no sistema com a bactéria, o aumento não foi tão

exacerbado, pois estes micro-organismos produziram parte do ácido utilizado, como já discutido anteriormente, por meio da oxidação do enxofre elementar, formado pela dissolução da calcopirita (Sandstorm & Petersson, 1997).

Em um sistema com ausência de micro-organismos, os valores de pH também aumentam devido à lenta, mas progressiva, oxidação de íons ferrosos e à dissolução ácida da calcopirita, com consumo do ácido sulfúrico, como relatam Qiu e colaboradores (2005) em seus estudos. Por isso, nestas condições, também se faz necessária a manutenção do pH.

A partir do 30° dia de lixiviação pode ser constatada uma maior tendência à estabilização do pH, tanto nos frascos com inóculo, quanto nos sem. Isto ocorreu devido à diminuição do consumo de ácido pelo sistema em relação ao início do processo e conseqüente diminuição da cinética de extração do cobre.

Quanto à concentração de Fe^{2+} (Figura 15), esta mostrou-se bastante oscilante durante o ensaio, tendo, no entanto, todos os tratamentos comportamento semelhante nesta oscilação. A oscilação do gráfico pode ter ocorrido devido ao método analítico utilizado, neste caso, a titulação, que não foi um método preciso.

Assim como era esperado, nos frascos com bactéria, a concentração do íon ferroso foi inferior aos frascos sem bactéria (Figura 15), ao contrário do que aconteceu com o teor de cobre. Os micro-organismos presentes nos frascos inoculados consumiram o Fe^{2+} no processo de oxidação dos sulfetos, o que levou a essa menor concentração deste íon e conseqüente maior extração de cobre (Figura 13).

Em experimento de biolixiviação com concentrado de flotação da Caraíba, realizado por Lima (2006), utilizando cepa bacteriana de *A. ferrooxidans*, uma relação de sólido/líquido de 50 g/L e meio de cultura, obteve-se uma extração de 67% em 60 dias. Este valor de extração é superior ao obtido no trabalho apresentado; porém, esta diferença pode ser devido à maior relação sólido/líquido utilizada nessa dissertação, 250 g/L. Segundo conclusão de Lima (2011), uma menor relação sólido/líquido leva a um aumento na porcentagem de extração de cobre. A hipótese de que a utilização do meio de cultura seja responsável por essa diferença pode ser descartada, pois, como demonstrou Neto (2007) em seus estudos, a adição de fonte de energia suplementar para a bactéria não determina uma elevação na solubilização do cobre.

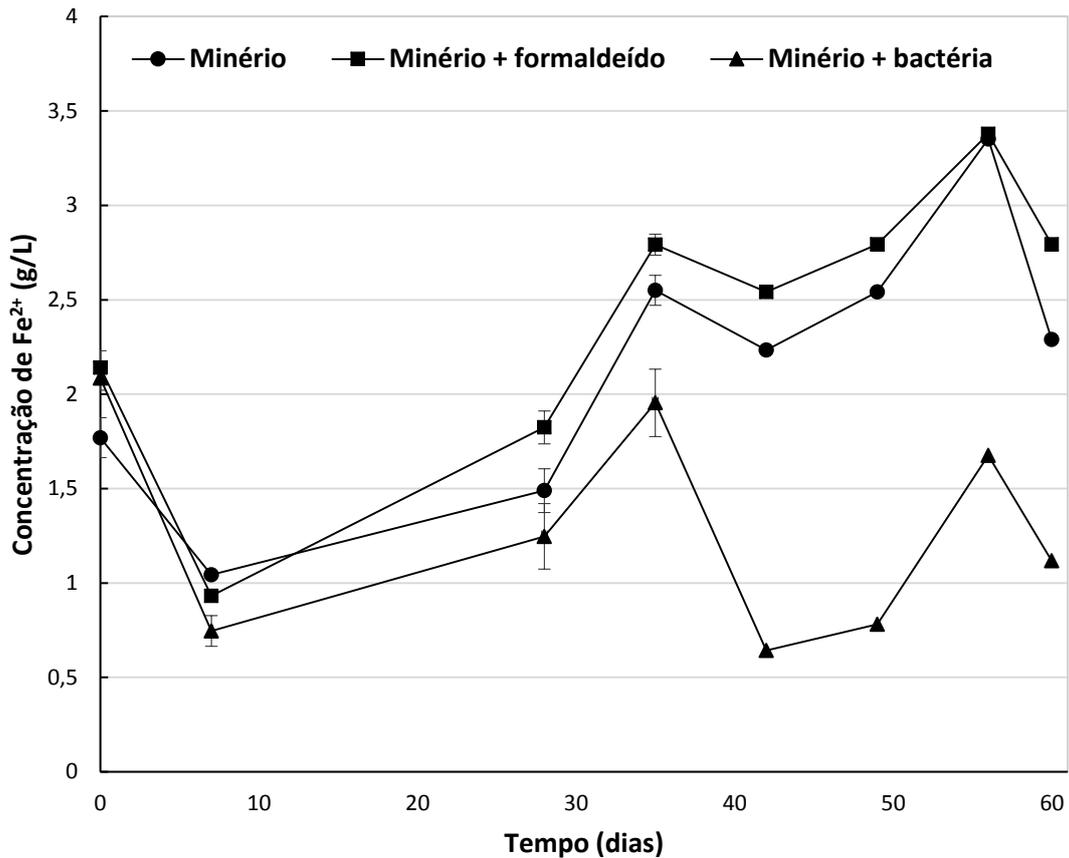


Figura 15 - Concentração de Fe^{2+} (g/L) durante o ensaio de biolixiviação.

Apesar do valor obtido nesse trabalho ser considerado alto, melhores resultados já foram obtidos por Lima (2011), utilizando também concentrado de flotação da Caraíba (10g/ml relação minério/solução lixiviante) e consórcios microbianos (bactérias mesófilas (*Leptospirillum* spp.), termófilas moderadas (*Sulfobacillus* spp.) e termófilos extremos (*Sulfolobus* spp. e *Sulfolobus acidocaldarius*)). Esse obteve 82% de extração de cobre nos ensaios em frascos agitados com adição de nutrientes, e 89% nos ensaios em coluna de polipropileno, nos moldes da GEOCOAT®, após 70 dias de experimento. A utilização de consórcios foi fundamental para este resultado, pois cada espécie presente pôde exercer sua atividade metabólica quando as condições para o crescimento estavam propícias.

6 CONCLUSÃO

A partir da caracterização microbiológica da amostra coletada para o isolamento, foram identificados quatro tipos de bactérias oxidantes por *Microarray*, sendo todas do domínio Bacteria.

A presença dessas bactérias com capacidade oxidativa, o alto valor de Eh e o baixo de pH encontrados no local estudado em Jacobina evidenciam que a área sofre com o problema da drenagem ácida mineira.

Entre as bactérias identificadas na amostra coletada na barragem, tem-se *A. ferrooxidans*, a qual foi isolada após enriquecimento e posterior purificação em meio sólido seletivo. Este isolamento foi confirmado ao nível molecular por qPCR.

A. ferrooxidans isolada foi utilizada no ensaio para avaliar a capacidade oxidativa desta sobre o minério em estudo. O processo de biolixiviação ficou evidenciado quando utilizada esta cepa bacteriana, uma vez que os frascos que as continham apresentaram melhor recuperação de cobre, 58 e 60%, em relação aos frascos sem inóculo, cuja recuperação foi de 31 e 35% para os esterilizados com formaldeído, e de 37 e 44% para o não esterilizado.

A manutenção e ajuste do pH durante a lixiviação bacteriana foi de suma importância para esta recuperação eficiente de cobre, pois permitiu o crescimento da bactéria acidófila empregada e evitou a formação de jarosita, a qual dificultaria o processo de lixiviação do minério, devido à formação de uma camada que impediria o contato do minério com a solução lixiviante.

O mineral mais abundante no minério em estudo é a calcopirita e, apesar da refratariedade do mesmo, este minério mostrou boa potencialidade na utilização de bactérias para recuperação de cobre por biolixiviação, pois este forneceu um substrato oxidável, que serviu de nutriente para o crescimento da bactéria estudada; isto permitiu a geração de ácido, que foi utilizado no processo de solubilização/recuperação deste metal.

O isolamento de *A. ferrooxidans*, junto ao resultado positivo da biolixiviação do minério estudado, servirá de base para novas pesquisas e futuras aplicações desta bactéria no processo de biolixiviação na Bahia.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, W.A.P. 2002. Aspectos químicos e mineralógicos relacionados à geração experimental de drenagem ácida em geomateriais sulfetados. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas**, UFV.
- ALVES, R.C. 2010. Indução de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e seleção de linhagens mutantes para utilização na biohidrometalurgia. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, UNESP-Araraquara.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. & K.H. SCHLEIFER. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol Review**, 59(1): 143-169.
- AMARAL, J.E. & A.S.J. KREBS. 2010. Drenagem ácida da mineração de carvão e sua interrelação com metais pesados e recarga de aquíferos na bacia carbonífera do estado de Santa Catarina. **XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços**.
- ANDRADE, T.R. & F.P. FRANÇA. 1984. Lixiviação bacteriana de cobre de baixo teor em escala de bancada. **Série tecnologia Mineral**. CETEM, (33): 1-36.
- AULD, R.R.; MYRE, M.; MYKYTCZUK, N.C.S.; LEDUC, L.G. & T.J.S. MERRITT. 2013. Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. **Journal of Microbiological Methods**, 93: 108–115.
- BAKER, B.J. & J.F. BANFIELD. 2003. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS Microbiology Ecology**, 44: 139-152.
- BERRY, V.K. & L.E. MURR. 1978. **Basic microbial studies applied to leaching**. Academic Press, New York.
- BENNET, F.F. & H. TRIBUSCH. 1978. Bacterial leaching patterns on pyrite cristal surface. **Journal of Bacteriology**: 134-310.
- BIOSIGMA S.A. (CL), 2007a. CORTÉS, P.A.M.; DUARTE, A.O.A. & P.A.P. VALDECANTOS. **Método e arranjo para detectar e identificar os microorganismos presentes em uma amostra usando as regiões genômicas que codificam para as distintas RNAt sintetases**. BR nº PI0605802-7 A, 17 nov. 2006, 04 set. 2007.
- BIOSIGMA S.A. (CL), 2007b. SEPÚLVEDA, A.E.M.; DUARTE, A.O.A.; CANALES, M.A.G.; AGUILERA, S.M.; VALDECANTOS, P.A.P. & K.N.E. STOLZENBACH. **Método para projetar oligonucleotídeos para técnicas de biologia molecular**. BR nº PI0604215-5 A, 15 ago. 2006, 10 abr. 2007.
- BIOSIGMA S.A. (CL), 2007c. VALDECANTOS, P.A.P.; STOLZENBACH, K.N.E.; CRUZ, I.A.P.; SEPÚLVEDA, A.E.M.; DUARTE, A.O.A.; CANALES, M.A.G. & S.M. AGUILERA. **Método para identificar e quantificar microorganismos do ambiente úteis em processos de biomineração**. BR nº PI0603939-1 A, 24 ago. 2006, 24 abr. 2007.
- BIOSIGMA S.A. (CL), 2008. OHLBAUM, R.B.; SEPÚLVEDA, A.E.M.; VALDECANTOS, P.A.P.; DUARTE, A.O.A.; CANALES, M.A.G.; AGUILERA, S.M.; STOLZENBACH, K.N.E. & P.A.M. CORTÉS. **Arranjo de fragmentos de DNA de microorganismos biominerais e método de detecção dos mesmos**. BR nº PI0606663-1 A, 17 nov. 2006, 15 jan. 2008.
- BIOSIGMA S.A. (CL), 2009. STOLZENBACH, K.N.E. & P.A.P. VALDECANTOS. **Método para a separação de microorganismos que aderem a uma amostra sólida por meio de um tampão à base de fosfato e de sonicação da amostra**. BR nº PI0803772-8 A2, 27 jun. 2008, 22 abr. 2009.

BIOSIGMA S.A. (CL), 2011. JARA, A.R.; VALDECANTOS, P.A.P.; OHLBAUM, R.B. & E.R. ESPINOZA. 2011. **A method of nucleic acids extraction from microorganisms in the presence of metallic ions that employs particulated chitosan.** CL WO2011055266 A2, 25 out. 2010, 12 mai. 2011.

BIOSIGMA S.A. (CL), 2012. STOLZENBACH, K.N.E.; UGALDE, J.; LOIRA, N.; SEPÚLVEDA, A.E.M.; VALDECANTOS, P.A.P. & OHLBAUM, R.B. **Array of nucleotidic sequences for the detection and identification of genes that codify proteins with activies relevant in biotechnology present in a microbiological sample, and method for using this array.** US Pat. 8207324 B2, 13 mar. 2008, 26 jun. 2012.

BORMA, L.S & P.S.M. SOARES. 2002. Drenagem ácida e gestão de resíduos sólidos de mineração. *In*: TRINDADE, R.B.M. & O.B. FILHO (Eds.). **Extração de Ouro: Princípios, Tecnologias e Meio Ambiente.** CETEM/MCT.

BOSECKER, K. 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, 20: 591-604.

BRYNER, I.C. & A.K. JAMESON. 1958. Microorganisms in leaching sulfide minerals. **Applied Microbiology**, 6: 281-287.

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

CAMPANER, V.P. & W. LUIZ-SILVA. 2009. Processos físico-químicos em drenagem ácida de mina em mineração de carvão no sul do Brasil. **Química Nova**, 32(1): 146-152.

CARNEIRO, M.F.C. & V.A. LEÃO. 2005. Lixiviação da calcopirita com cloreto férrico e cloreto de sódio. **Revista Escola de Minas**, 58(3): 231-235.

CARVALHO, E.M. 2001. A imiscibilidade de fluidos em mineralizações auríferas do tipo lode na Bacia Paleoproterozóica de Jacobina, BA. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Geociências**, UNICAMP.

CETEM. 1989. Mineração Caraíba. *In*: **Manual de usinas de beneficiamento.** Rio de Janeiro: CETEM/CNPq/DNPM/FINEP.

CETESB. 1991. *Thiobacillus* – Determinação do número mais provável de *Thiobacillus* sp. em água pela técnica dos tubos múltiplos: método de ensaio (Norma L5.217). **Norma Técnica CETESB**: 1-34.

CHURCH, C.D.; WILKIN, R.T.; ALPERS, C.N.; RYE, R.O. & R.B. MCCLESKEY. 2007. Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water. **Geochemical Transactions**, 8:10

COLMER, A.R. & M.E. HINKLE. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. **Science**, 106: 253-256.

COLMER, A.R.; TEMPLE, K.L. & M.E. HINKLE. 1949. An iron-oxidizing bacterium from the drainage of some bituminous coal mines. **Journal of Bacteriology**, 59: 317-328.

CORAM, N. J. & D. E. RAWLINGS. 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 838-845

CRUNDWELL, F.K. 2003. How do bacterial Interact with minerals? **Hydrometallurgy**, 78: 198-208.

DAS, A.; BHATTACHARYYA, S. & P.C. BANERJEE. 1989. Purification of *Thiobacillus ferrooxidans* cultures by single colony isolation and influences of agarose on the colony morphology. **Journal of Microbiological Methods**, 10: 281- 287.

- DE, G.C.; OLIVER, D.J. & B.M. PESIC. 1996. Effect of silver on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, 41: 211-229.
- DISPIRITO, A.A.; SILVER, M.; VOSS, I. & O.H. TUOVINEN. 1982. Flagella and pilli of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from a uranium mine in northern Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, 43(5): 1196-1200.
- DUTRIZAC, J.E. 1989. Elemental sulphur formation during the ferric sulfate leaching of chalcopyrite. **Can Metall Quartz**, 28(4): 337-344.
- EDWARDS, K.J.; BOND, P.L.; GIHRING, T.M. & J.F. BANFIELD. 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science*, 287(5459): 1796-1799
- FARFÁN, J.R.J.Z.; BARBOSA FILHO, O. & V.P. de SOUZA. 2003. Impactos ambientais da drenagem ácida de resíduos sólidos da indústria mineral. **58º Congresso Anual da ABM**; [CDROM] pp. 1171-1181.
- FARFÁN, J.R.J.Z.; BARBOSA FILHO, O. & V.P. de SOUZA. 2004. Avaliação do potencial de drenagem ácida de rejeitos da indústria mineral. **CETEM/MCT**, 58p.
- FIRMINO, S.M.; ROSA, T. & D. BEVILAQUA. 2012. Biossolubilização de calcopirita (CuFeS_2) na presença de íons cloreto. **Actas 7mo Congresso de meio ambiente AUGM**.
- FRANCISCO JR, W.E.; BEVILAQUA, D. & O. GARCIA JR. 2007. Estudo da dissolução oxidativa microbiológica de uma complexa amostra mineral contendo pirita (FeS_2), Pirrotita (Fe_{1-x}S) e Molibdenita (MoS_2). **Química Nova**, 30(5): 1095-1099.
- GARCIA JR., O. 1989. Estudos da biolixiviação de minérios de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans*. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética**, UNICAMP.
- GARCIA JR, O. 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, 22(1): 1-6.
- GARCIA JR., O. & L.C. URENHA. 2001. Lixiviação bacteriana de minérios. *In*: LIMA, U.A. **Biotechnologia industrial**. Vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher.
- GARCIA JR., O.; MUKAI, J.K. & C.B. ANDRADE. 1992. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, 38: 279-282.
- GEOCOAT. 2013. Disponível em: <http://www.geobiotics.com/geocoat>. Acesso em: nov. 2013.
- GEOLEACH. 2013. Disponível em: <http://www.geobiotics.com/geoleach>. Acesso em: nov. 2013.
- GOOGLE MAPS. 2012. Disponível em: <http://maps.google.com.br>. Acesso em: fev. 2012.
- HABASHI, F. 1978. **Chalcopyrite – its chemistry and metallurgy**. New York: Mac Graw-Hill.
- HALLBERG, K.B. & D.B. JOHNSON. 2001. Biodiversity of acidophilic microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, 49: 37–84.
- HOFFMAN, L.E. & J.L. HENDRIX. 1976. Inhibition of *Thiobacillus ferrooxidans* by soluble silver. **Biotechnology and Bioengineering**. 18: 1161-1165.
- HOLT, J.G. 1994. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ºed., Baltimore: Willians & Wilkins Company, 787 p.
- HUTCHINSON, I.P.G. & R.D.E. ELLISON. 1992. Mine waste management. *In*: **A Resource for Mining Industry Professionals, Regulators and Consulting Engineer**, 2ª ed., Lewis Publishers

HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M.S.; BRIERLEY, J.A. & C.L. BRIERLEY. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Annual Review of Microbiology**, 40: 311-336.

IBRAM. 2008. Mineração Caraíba investe em tecnologia inovadora para extração de cobre. **Indústria da Mineração**, Ano III – 20.

INFOMINE. 2012. Disponível em: <http://brasil.infomine.com/>. Acesso em: mar. 2012.

JENSEN, A.B. & C. WEBB. 1994. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. **Process Biochemistry**, 30(3): 225-236.

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

JOHNSON, D.B. & K.B. HALLBERG. 2003. The microbiology of acid mine waters. **Research in Microbiology**, 153: 466-473.

JOHNSON, D.B. & K.B. HALLBERG. 2009. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, 54: 201-255.

JOHNSON, D.B.; ROLFE, S.; HALLBERG, K.B. & E. IVERSEN. 2001. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. **Environmental Microbiology**, 3(10): 630-637.

JONES, C.A. & D.P. KELLY. 1983. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 33(8): 241-261.

KAWABE, Y.; INOUE, C.; SUTO, K. & T. CHIDA. 2003. Inhibitory effect of high concentrations of ferric ions on the activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96(4): 375-379.

KELLY, D.P. & A.P. WOOD. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50: 511-516.

KELLY, D.P. & O.H. TUOVINEN. 1975. Metabolism of inorganic sulphur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* and some comparative studies on *Thiobacillus-A2* and *T. neapolitanus*. **Plant and soil**, 43: 77-93.

LANDESMAN, J.; DUNGAN, D.W. & C.C. WALDEN. 1966. Iron oxidation by washed cell suspensions of the chemoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, 12: 957-964.

LAVALLE, L.; CHIACCHIARINI, P.; POGLIANI, C. & E. DONATI. 2005. Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. **Process Biochemistry**, 40(3-4): 1095-1099.

LEATHEN, W.W.; KINSEL, N.A. & S.A. BRALEY. 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: a chemosynthetic autotrophic bacterium. **Journal of Bacteriology**, 72: 700-704.

LEWIS, M.E. & M.L. CLARK. 1996. How does stream flow affect metals in the upper Arkansas river? **US Geological Survey Fact Sheet**: 226-296.

LIDDICOAT, J. & D. DREISINGER. 2007. Chloride leaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, 89: 323-331.

LIMA, R.B. 2006. Biolixiviação de concentrado de flotação de sulfetos de cobre. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos**, Escola de Química/UFRJ.

- LIMA, R.B. 2011. Biolixiviação de concentrado de flotação de sulfetos de cobre, em coluna, utilizando consórcios de micro-organismos mesófilos e termófilos. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos**, Escola de Química/UFRJ
- LUNDGREN, D.G. & M. SILVER. 1980. Ore leaching by bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 34: 263-283.
- LU, Z.Y.; JEFFREY, M.I. & F. LAWSON. 2000a. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, 56: 189-202.
- LU, Z.Y.; JEFFREY, M.I. & F. LAWSON. 2000b. An electrochemical study of the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, 56: 145-155.
- LUZ, A.B. & F.A.F. LINS. 2004. Introdução ao Tratamento de Minério. *In*: **Tratamento de Minérios**, 4ª ed., CETEM/MCT. p. 3-14.
- MAIA, A.D. 2004. Avaliação da geração de drenagem ácida em um solo fabricado em laboratório contendo sulfeto de ferro e matéria orgânica. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências em Engenharia Civil**, COPPE/UFRJ.
- MAIA, L.S.; LIMA, R.B. & L.G.S. SOBRAL. 2008. Isolamento de microorganismos acidofílicos presentes em sulfetos de cobre para posterior utilização em processo de biolixiviação. **Resumos do XVI Jornada de Iniciação Científica – CETEM**: 64-70.
- MARQUES, M.S. 1988. Lixiviação bacteriana uma alternativa para a recuperação de metais. **Anais do XIII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Hidrometalurgia**. 17pp.
- MASCARIN, D.B. 1999. Solubilização da calcopirita e da bornita por *Thiobacillus ferrooxidans*. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**, UNESP/ARAR.
- MATIN, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 32: 433-468.
- McCREADY, R.G.L.; WADDEN, D. & A. MARCHBANK. 1986. Nutrient requirement for the in-place leaching of uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, 17(1): 61-71.
- MISHRA, A.K.; ROY, P. & S.S.R. MAHAPATRA. 1983. Isolations of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium. **Current Microbiology**, 8: 147-152.
- MOLINARI, L. & W. SCARPELLI. 1988. Depósitos de ouro de Jacobina, Bahia. *In*: SCHOBENHAUS, C. & C.E.S. COELHO (Eds.). **Principais depósitos minerais do Brasil**. DNPM. Vol. 3: 463-478.
- MUÑOZ, J.A.; BALLESTER, A.; GONZÁLEZ, F. & M.L. BLÁZQUEZ. 1995. A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part II: Orbital shaker experiments. **Hydrometallurgy**, 38(1): 59-78.
- NETO, W.A.R. 2007. Biolixiviação de minério de cobre da mina de Sossego, PA – Companhia Vale do Rio Doce. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, UNESP-Araraquara.
- OHLWEILER, O.A. 1980. **Química analítica quantitativa**. 2 Ed., Vol. 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 664 p.
- OLIVEIRA, M.D.; SÉRVULO, E.F.C.; SOBRAL, L.G.S. & G.H.C. PEIXOTO. 2010. Biolixiviação: utilização de micro-organismos na extração de metais. **Série tecnologia Ambiental**. CETEM/MCT. (53): 1-38.
- OPRIME, E.A.G. 2001. Processo combinado químico-bacteriano para a remoção de H₂S de gases. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, UNESP-Araraquara.

PORTO, C.G.; PALERMO, N. & F.R.M. PIRES. 2002. Panorama da exploração e produção do ouro no Brasil. *In*: TRINDADE, R.B.M. & O.B. FILHO (Eds.). **Extração de Ouro**: Princípios, Tecnologias e Meio Ambiente. CETEM/MCT.

PRADHAN, D.; PAL, S.; SUKLA, L.B.; ROY, C.G. & T. DAS. 2008a. Bioleaching of low-grade copper ore using indigenous microorganisms. **Indian Journal of Chemical Technology**, 15: 588-592.

PRADHAN, N.; NATHSARMA, K.C.; RAO, K.S.; SUKLA, L.B. & MISHRA, B.K. 2008b. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. **Minerals Engineering**, 21: 355-365.

PRONK, J.T.; BRUYN, J.C.; BOS, P. & J.G. KUENEN. 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(7): 2227-2230.

PUVVADA, G.V.K. & D.S.R. MURTHY. 2000. Selective precious metals leaching from chalcopyrite concentrate using chloride/hypochlorite media. **Hydrometallurgy**, 58: 185-191.

QIU, M.; XIONG, S.; ZHANG, W. & G. WANG. 2005. A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or mixed culture. **Minerals Engineering**, 18: 987-990.

RAHEB, J.; KHOHROO, H.; AZIMI, A.; NASERNAJAD, B.; SANATI, M.H.; NAGHDI, S. & M. ARABNEZHAD. 2007. Isolation and characterization of a new *Acidithiobacillus ferrooxidans* from the Aliabad copper mine in Yazd using 16s-23s spacer gene nucleotide sequencing method. **Journal of Sciences**, 18(3): 209-213.

RAMPINELLI, L.R. 2007. Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos**, ProAGUA/UFOP.

RAWLINGS, D.E. 1981. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **Journal of Applied Bacteriology**, 51: 267-275.

RAWLINGS, D.E. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur- oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. **Microbial Cell Factories**, 4(13): 1-15.

RAWLINGS, D.E. & D. B. JOHNSON. 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. **Microbiology**, 153: 315-324.

RAZZEL, W.E. & P.C. TRUSSELL, 1962. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. **Journal of Bacteriology**, 85: 595-603.

REZENDE, A.C. 2011. Bahia vira novo polo de mineração do Brasil. Disponível em: <http://exame.abril.com.br>. Acesso em: fev./2012.

SANDSTORM, A. & S. PETERSSON 1997. Bioleaching of a complex sulphide ore with moderate thermophilic and extreme thermophilic microorganism. **Hydrometallurgy**, 46(1-2): 181-190.

SAND, W.; GEHRKE, T.; JOZSA, P. & A. SCHIPPERS. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, 59: 159-175.

SATO, H.; NAKAZAWA, H. & Y. KUDO. 2000. Effect of silver chloride on the bioleaching of chalcopyrite concentrate. **International Journal of Mineral Processing**, 59: 17-24.

SCHIPPERS, A. & W. SAND. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 319-321.

- SCHRENK, M.O.; EDWARDS, K.J.; GOODMAN, R.M.; HAMERS, R.J. & J.F. BANFIELD. 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage. **Science**, 279: 1519-1521.
- SHIRAKAWA, M.A.; GARCIA JR., O. & B.M. RZYSKI. 1991. Isolamento e purificação de *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans* do Porto de Areia de Itaquaquecetuba – SP. **Revista de Microbiologia**, 22(3-1): 106.
- SILVERMAN, M.P. & D.G. LUNDGREN. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I: An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, 77: 642-647.
- SKROBIAN, M.; HAVLIK, T. & M. UKASIK. 2005. The effect of NaCl concentration and particle size on chalcopyrite leaching in cupric chloride solution. **Hydrometallurgy**, 77: 109-114.
- SMITH, J. R.; LUTHY, G.R. & A.C. MIDDLETON. 1988. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, 60: 518-530.
- SOUZA, C.E.G.; LIMA, R.B. & L.G.S. SOBRAL. 2007. Biolixiviação de sulfetos metálicos. In: **Anais I Jornada do Programa de Capacitação Interna do CETEM**. CETEM: 1-7.
- SOUZA, V.P. 1980. Lixiviação bacteriana do sulfeto de cobre de baixo teor – Caraíba. **Série tecnologia Mineral**. CETEM, (12): 1-34.
- TAN, G.L.; SHU, W.S.; ZHOU, W.H.; LI, X.L.; LAN, C.Y. & L.N. HUANG. 2009. Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. **FEMS Microbiology Ecology**, 277–285.
- TEMPLE, K.L. & A.R. COLMER. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, 62: 605-611.
- TRIBUTSCH, H. 2001. Direct versus indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, 59: 177–185.
- TUOVINEN, O.H. & D.P. KELLY. 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I: Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with ¹⁴CO₂ – fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, 88: 285-298.
- TYSON, G.W.; LO, I.; BAKER, B.J.; ALLEN, E.E.; HUGENHOLTZ, P. & J.F. BANFIELD. 2005. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. **Applied and Environment Microbiology**, 71: 6319–6324.
- VILCÁEZ, J.; SUTO, K. & C. INOUE. 2008. Bioleaching of chalcopyrite with thermophiles: Temperature–pH–ORP dependence. **International Journal of Mineral Processing**, 88: 37-44.
- VOGEL, A.I. & J. BASSETT. 1981. **Análise inorgânica quantitativa**: incluindo análise instrumental elementar. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 690 p.
- WATLING, H.R. 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review. **Hydrometallurgy**, 84: 81-108.
- WINAND, R. 1991. Chloride hydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, 27: 285-316.
- YOO, K.; KIM, S.K.; LEE, J.C.; ITO, M.; TSUNEKAWA & N. HIROYOSHI. 2010. Effect of chloride ion on leaching rate of chalcopyrite. **Minerals Engineering**, 23: 471-477.
- YOUNGER, P.L. 1997. The longevity of mine water pollution: a basis for decision-making, **Science Total Environment**: 457–466.

YUEHUA, H.; GUANZHOU, Q.; JUN, W. & W. DIANZUO. 2002. The effect of silver bearing catalysts on bioleaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, 64: 81-88.

ZHANG, Y.; YANG, Y.; LIU, J. & G. QIU. 2013. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain QXS-1 capable of unusual ferrous iron and sulfur utilization. **Hydrometallurgy**, 136: 51-57.

ZHOU, H; ZENG, W.; YANG, Z.; XIE, Y. & G. QIU. 2009, Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor. **Bioresource Technology**, 100 (2): 515-520.

ZHOU, S.; WANG, S.; YU, S. & L. ZHOU. 2003. Isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* and its application on heavy metal bioleaching from sewage sludge. **Huan Jing Ke Xue**, 24(3):56-6.