



7<sup>mo</sup>  
Congreso de  
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM  
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

## BIOSOLUBILIZAÇÃO DA CALCOPIRITA (CuFeS<sub>2</sub>) NA PRESENÇA DE ÍONS CLORETO

Chalcopyrite (CuFeS<sub>2</sub>) biosolubilization in presence of chloride ions

Stella Maris Firmino <sup>a</sup>, Tahuany Rosa <sup>b</sup>, Denise Bevilaqua <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Mestranda Departamento Biohidrometalurgia (IQ/UNESP), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, Brasil. [stella.maris.f@hotmail.com](mailto:stella.maris.f@hotmail.com)

<sup>b</sup> Bolsista PIBIC (IQ/UNESP), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, Brasil. [tahuanyrosa@yahoo.com](mailto:tahuanyrosa@yahoo.com)

<sup>c</sup> Orientadora e docente (IQ/UNESP), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, Brasil. [denise@iq.unesp.br](mailto:denise@iq.unesp.br)

*Palavras chaves: biolixiviação, micro-organismos.*

*Keywords: bioleaching, micro-organisms.*

*Título apreviado: Biossolubilização da calcopirita*

**ABSTRACT**

Mining currently has encountered great difficulties in obtaining high-grade ores due to depletion of mineral reserves. Conventional methods of extraction of metals (pyrometallurgy) present high energy costs and are unfriendly to the environment (e.g. SO<sub>2</sub> emissions). For this reason, alternative methods to minimize operating costs and the environmental impacts have been required. Thus, the use of bacteria as catalyst for the leaching of low-grade ores is an interesting alternative for mining companies.

The main bacterium involved in bioleaching is *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a microorganism chemolithotrophic and acidophilic that obtains energy through oxidation of ferrous ions and reduced sulfur compounds. This study used different strains of *A. ferrooxidans* from the collection belonging to the Biohydrometallurgy laboratory (IQ-UNESP) and strain ATCC 23270. For this purpose, the mentioned strains were used for kinetic studies of oxidation of ferrous ions in the presence of different concentrations of chloride ions (mmol L<sup>-1</sup>): 0, 50, 100, 200, 400 e 500. Respiriometric studies were also done in the presence of 50 mmol. L<sup>-1</sup> of chloride ions, since this was the concentration in which all strains showed no significant inhibition. In kinetic studies the most tolerant strain was the AMF. Analyzing the respirometric data a crescent order of inhibition was proposed: (AMF ≈ LR ≈ V3) > ATCC > PCEL > SJ22 > S > SSP > CMV > PCE.

**RESUMO**

A mineração, atualmente, tem encontrado grandes dificuldades na obtenção de minérios de alto teor devido aos esgotamentos das reservas minerais. Os métodos convencionais de extração dos metais (pirometalurgia) possuem altos custos energéticos e são grandes poluidores do meio ambiente (por ex: emissão SO<sub>2</sub>). Por esse motivo vem se procurando métodos alternativos para minimizar os custos operacionais e os impactos ambientais destes processos. Desta forma, o uso de bactérias como agente catalítico para a lixiviação de minérios de baixo teor é uma alternativa que cada vez mais desperta o interesse das mineradoras.

A principal bactéria envolvida na biolixiviação é a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, um micro-organismo quimiolitotrófico e acidofílico que obtêm energia através da oxidação de íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre. Este trabalho utilizou diferentes linhagens *A. ferrooxidans* da coleção pertencente ao laboratório de Biohidrometalurgia (IQ-UNESP) e a linhagem ATCC 23270. Para isto, as linhagens mencionadas foram utilizadas em estudos de cinética de oxidação de íons ferrosos na presença de diferentes

concentrações de íons cloreto ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): 0, 50, 100, 200, 400 e 500. Através de estudos de respirometria celular, estas mesmas linhagens foram testadas quanto à capacidade de oxidação da calcopirita na presença de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de íons cloreto, pois esta foi a concentração em que todas as linhagens não apresentaram inibição significativa.

Nos ensaios de cinética de oxidação de íons ferrosos a linhagem que apresentou maior tolerância aos íons cloretos foi a linhagem AMF, que foi capaz de oxidar íons ferrosos na presença de todas as concentrações de íons cloretos testadas. Em relação ao consumo de oxigênio as linhagens que apresentaram menores porcentagens de inibição na presença de cloreto foram: AMF, LR, V3, ATCC, PCEL, S e SJ22.

## **INTRODUÇÃO**

Ultimamente a indústria de mineração tem se deparado com diversos problemas tais como: aumento dos custos para a extração dos minérios, preços baixos e instáveis no mercado internacional, a crescente preocupação com o impacto ambiental das atividades mineradoras e a poluição provocada pela emissão de  $\text{SO}_2$ , responsável pela chuva ácida. Essa situação é agravada pelo progressivo esgotamento das reservas minerais com altos teores, afetando ainda mais os custos do processo. Dessa forma a indústria tem concentrado esforços no sentido de obter novas tecnologias que possam reduzir custos e se adequar às leis governamentais quanto à emissão de gases liberados na atmosfera. Uma alternativa bastante explorada tem sido a utilização da biolixiviação.

A biolixiviação é um processo biotecnológico que utiliza micro-organismos que possuem uma atividade oxidativa sobre os sulfetos metálicos para solubilizar metais de minérios de baixo teor.

Este método apresenta algumas vantagens sobre os processos convencionais (pirometalúrgicos), tais como:

- requer pouca energia;
- não emite gases nocivos ao meio ambiente que provocam a chuva ácida;
- baixo investimento, tanto de capital inicial, quanto de custo operacional uma vez que não necessita de equipamentos especiais ou de grandes quantidades de reagentes; e
- permite o aproveitamento de rejeitos de minérios com teores reduzidos de metais.

A biohidrometalurgia surge como uma alternativa econômica para o tratamento de minérios, com especial atenção aos de baixo teor (Ndlovu, 2008).

A principal bactéria envolvida nos processos de biolixiviação é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Entre as características do *A. ferrooxidans* que o tornam um interessante micro-organismo para o desenvolvimento de processos industriais em atividades biohidrometalúrgicas, pode-se destacar: crescimento em condições ambientais extremas; significativa resistência a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos, provavelmente esses micro-organismos são condicionados por um sistema genético altamente especializado; capacidade de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao seu metabolismo oxidativo que produz eficientes agentes de lixiviação ácida (Garcia, 1997).

O *A. ferrooxidans* é um organismo obrigatoriamente quimiolitotrófico, pois utiliza como fonte de energia para seu crescimento substratos estritamente inorgânicos, necessitando basicamente, além da fonte energética ( $\text{Fe}^{2+}$  ou formas reduzidas de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos), suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (Tuovinen *et al.*, 1979; Rawlings, 1981).

Essa espécie obtém todo seu carbono celular pela fixação de gás carbônico atmosférico. É uma típica bactéria aeróbica, no entanto, é capaz de crescer anaerobicamente em substrato de enxofre em condições especiais (Leduc & Ferroni, 1994).

Um dos principais sulfetos metálicos encontrados nas reservas minerais mundiais de cobre é a calcopirita, sabidamente refratária aos ataques químicos e bacterianos (Ahonen & Tuovinen, 1993). Essa refratariedade torna a dissolução desse mineral extremamente lenta devido a fatores ainda não esclarecidos na literatura. Acredita-se que este caráter refratário esteja associado à presença de polissulfetos que causam uma passivação da superfície mineral e pela formação de precipitados de jarosita. Este caráter também foi em parte justificado quando Habashi (1978) mostrou que a energia de rede da calcopirita é mais alta quando comparada com outros sulfetos minerais como demonstrado na Tabela 1 (Habashi, 1978).

**Table 1.** Energy lattice of chalcopyrite compared to other sulfide minerals (Habashi, 1978)

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

A formação de compostos na superfície da calcopirita tem sido avaliada como a causa dessa passivação. Portanto atribuem-se a passivação, devido à formação de uma densa camada de enxofre elementar (Dutrizac, 1989), à existência de sulfetos metálicos deficientes (Lu *et al.*, 2000b), à formação de polissulfetos (Rohwerder *et al.*, 2003), e à formação de jarositas devido à precipitação de íons férricos (Ahonen & Tuovinen, 1992, Córdoba *et al.*, 2008).

É aceito atualmente que a lenta cinética de dissolução da calcopirita em meios com sulfato é devida à passivação da superfície do mineral onde se tem altos potenciais em solução, mas essa camada tem sua natureza de formação bastante controversa entre os autores (Dutrizac, 1989; Lu *et al.*, 2000b; Dixon *et al.*, 2008)

Outras 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 destes íons na atividade bacteriana, podem otimizar a dissolução da calcopirita, mas ao mesmo tempo podem inibir o crescimento da bactéria.

Estudar a adaptação dessas linhagens a adição de íons cloreto à solução lixiviante têm sido realizados por acreditar-se que tais íons possam romper a camada passivadora superficial, tornando o minério mais poroso e susceptível a uma corrosão mais acelerada (Lu *et al.*, 2000; Liddicoat, 2007; Yoo *et al.*, 2010). Adicionalmente, tem-se procurado maneiras para diminuir a formação da jarosita com o intuito de obter uma maior porcentagem de extração de cobre (Daoud, 2006).

A passivação da calcopirita também tem sido estudada em meios de cloreto, embora em menor grau do que em sistemas de sulfato (Lu *et al.*, 2000b).

Estudos recentes feitos por Yoo *et al.* (2010) demonstraram o efeito do cloreto na lixiviação da calcopirita. Os resultados obtidos mostraram que a presença desses íons aumentou significativamente a cinética de lixiviação devido à elevação do potencial crítico causado pela formação de complexos entre íons cuproso-cloreto no sistema.

Nicol *et al.* (2010) também propuseram mecanismos diferentes para uma dissolução melhorada da calcopirita numa solução com potencial crítico controlado entre 550 e 600mV(SHE). Estes autores desenvolveram vários experimentos para chegarem a

possíveis mecanismos que explicariam o uso de cloreto e a rápida cinética de oxidação dos sulfetos minerais. Nesse procedimento está envolvido o meio ácido analisado através de processos oxidativo e não oxidativo para uma melhor biolixiviação e dissolução de cobre.

Dessa maneira, a seleção e obtenção de linhagens de *A. ferrooxidans* mais halotolerantes torna-se uma alternativa interessante no sentido de aumentar a solubilização de cobre da calcopirita.

## METODOLOGIA

### Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram previamente selecionadas do banco de coleção do Grupo de Biohidrometalurgia do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química (UNESP, Araraquara). As linhagens avaliadas estão listadas na Tabela 2.

**Table 2.** Bacterial strains of *A. ferrooxidans* and its origins

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

\*Strains isolated by O. Garcia Jr. (GARCIA JUNIOR, 1991)

As linhagens de *A. ferrooxidans* citadas neste trabalho já foram estudadas anteriormente por Novello (2008) através de estudos respirométricos e apresentaram maior capacidade de oxidação da calcopirita.

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio T&K modificado (Tuovinen & Kelly, 1973) composto por sais inorgânicos e pela fonte de energia ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), o pH foi corrigido a 1.8 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, a 30°C e 150 rpm em mesa agitadora (*New Brunswick Scientific*). Após crescimento bacteriano, as culturas foram mantidas em geladeira e repicadas a cada dois meses, para manter as culturas frescas.

### **Ensaio de halotolerância**

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

### **Ensaio de respirometria**

Para a quantificação da biomassa a ser utilizada nos ensaios respirométricos foi utilizada dosagem de proteínas totais (Hartree, 1972). Segundo Garcia *et al.* (1992), neste procedimento, as proteínas totais são utilizadas como unidade biológica de rotina



expressando os resultados para o estudo da respirometria celular, por ser um método sensível, preciso e simples de ser realizado.

Os ensaios respirométricos permitiram avaliar de forma rápida a atividade oxidativa celular, desacoplada de crescimento. Os ensaios foram realizados utilizando um respirômetro de Warburg (Umbreit *et al.*, 1972), o qual consiste em um frasco de reação acoplado a um manômetro. Este frasco de reação contém um reservatório lateral para adição de células, um poço central para colocar papel de filtro e KOH 20% (para a retirada de CO<sub>2</sub>) e um compartimento principal no qual ocorrem as reações.

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

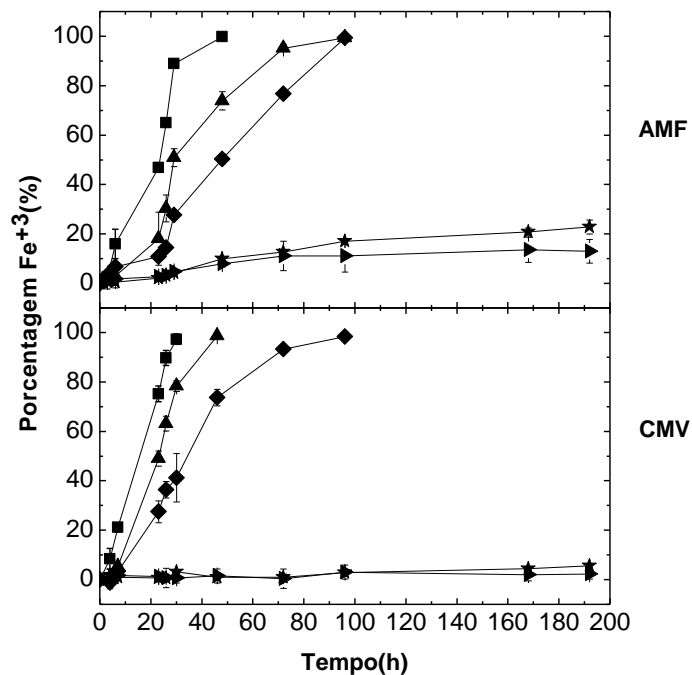
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os ensaios de cinética de oxidação dos íons ferrosos apresentaram as diferenças entre as linhagens testadas quanto à tolerância aos íons cloreto. Nas concentrações de 50 e 100 mmol. L<sup>-1</sup> todas as linhagens testadas oxidaram completamente os íons ferrosos em tempos variáveis. Com exceção da linhagem AMF, todas as outras linhagens apresentaram forte inibição na capacidade de oxidação de íons ferrosos na presença de 400 e 500 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl.

O tempo de oxidação total dos íons Fe<sup>2+</sup> apresentado na curva de crescimento de *A. ferrooxidans* AMF, foi de aproximadamente 48 horas na presença de 0 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl<sup>-</sup> e 96 horas na presença de 100 e 200 mmol. L<sup>-1</sup> desses íons (Figura 1). Nas

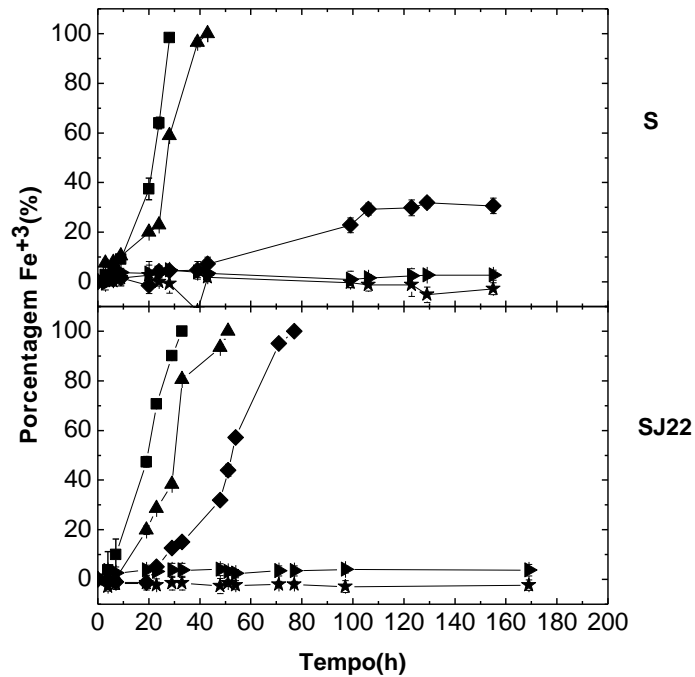
concentrações de 400 e 500 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl<sup>-</sup>, 23% e 13% dos íons Fe<sup>2+</sup> foram oxidados respectivamente. Apesar da discreta oxidação dos íons ferrosos, é relevante destacar que esta foi a única linhagem capaz de tolerar a presença de cloreto nestas concentrações.

O efeito dos íons Cl<sup>-</sup> na oxidação do íon ferroso para a linhagem CMV foi analisado (Figura 1). A oxidação total dos íons Fe<sup>2+</sup> ocorreu em aproximadamente 30, 46 e 96 horas, para as concentrações de 0, 100 e 200 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl<sup>-</sup>, respectivamente.



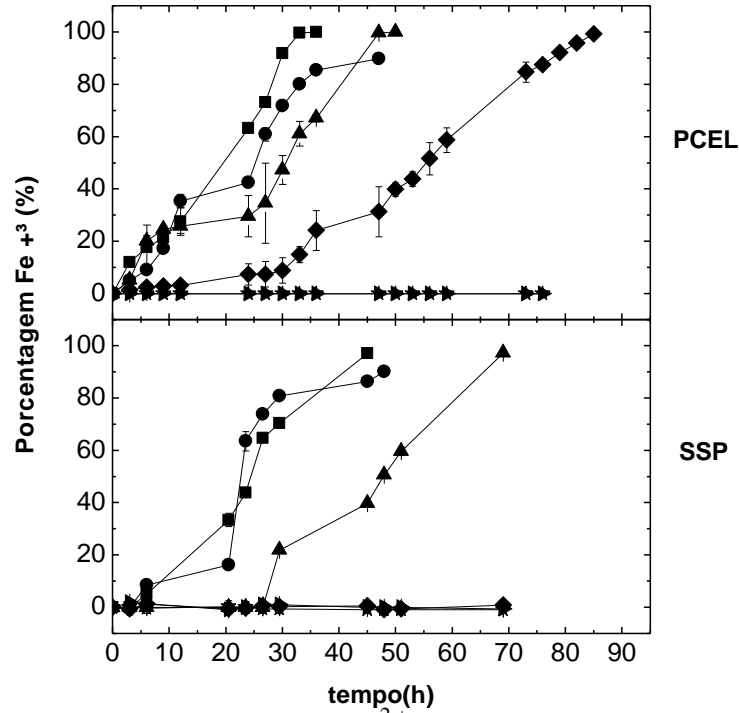
**Figure 1.** Change in percent of oxidation of Fe<sup>2+</sup> ions during the growth of *A. ferrooxidans* AMF and CMV in T & K complete in the presence of Cl<sup>-</sup> ion concentrations: ■ 0 mmol. L<sup>-1</sup>, ● 50 mmol. L<sup>-1</sup>, ▲ 100 mmol. L<sup>-1</sup>; ◆ 200 mmol. L<sup>-1</sup>, ★ 400 mmol. L<sup>-1</sup> and ► 500 mmol. L<sup>-1</sup>.

Para a linhagem *A. ferrooxidans* SJ22 foi observado uma diferença na oxidação total da fonte energética de aproximadamente 18 horas entre a condição controle (0 mmol. L<sup>-1</sup>) e na presença de 100 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl<sup>-</sup>, e de 43 horas na presença de 200 mmol. L<sup>-1</sup> de íons Cl<sup>-</sup> (Figura 2). A linhagem S apresentou inibição significativa na presença de 200 mmol L<sup>-1</sup>, atingindo cerca de 30% no tempo final.



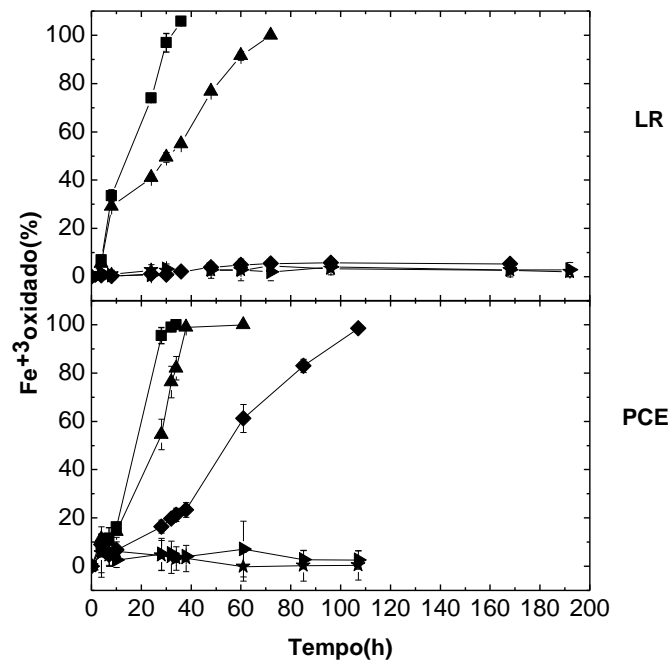
**Figure 2.** Change in percent of oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  ions during the growth of *A. ferrooxidans* S and SJ22 in T & K complete in the presence of  $\text{Cl}^-$  ion concentrations: ■ 0  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ● 50  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ▲ 100  $\text{mmol. L}^{-1}$ ; ◆ 200  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ★ 400  $\text{mmol. L}^{-1}$  and ► 500  $\text{mmol. L}^{-1}$ .

A linhagem PCEL apresentou oxidação total dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  em todas as concentrações testadas, exceto 400 e 500  $\text{mmol. L}^{-1}$ . O tempo para esta oxidação variou entre 36 e 80 horas (Figura 3). Em relação a linhagem SSP, cabe destacar que a mesma não apresentou tolerância a 200  $\text{mmol. L}^{-1}$  de cloreto.



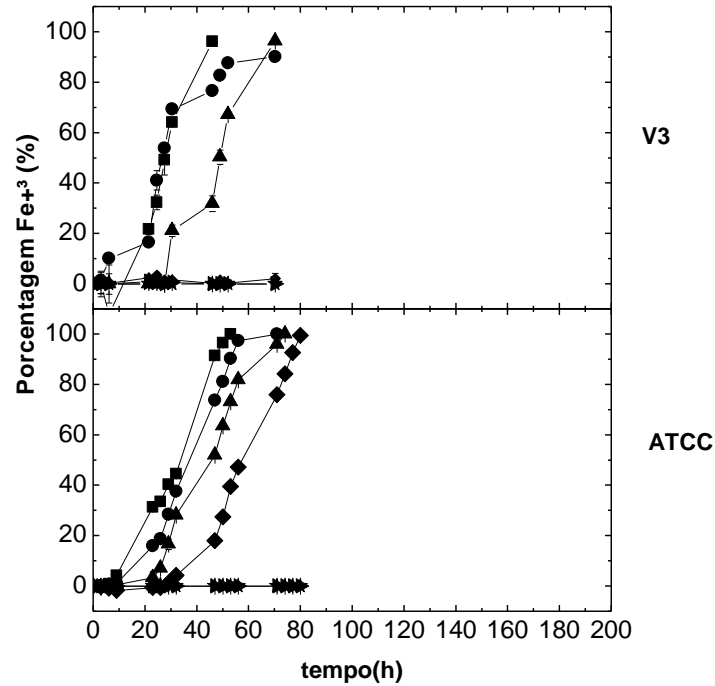
**Figure 3.** Change in percent of oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  ions during the growth of *A. ferrooxidans* PCEL and SSP in T & K complete in the presence of  $\text{Cl}^-$  ion concentrations: ■ 0  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ● 50  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ▲ 100  $\text{mmol. L}^{-1}$ ; ◆ 200  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ★ 400  $\text{mmol. L}^{-1}$  and ► 500  $\text{mmol. L}^{-1}$ .

A linhagem LR apresentou inibição da oxidação total dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  em todas as concentrações testadas, exceto 0 e 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figura 3). Em relação a linhagem SSP, cabe destacar que a mesma apresentou oxidação total dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  nas concentrações de 0 a 200  $\text{mmol L}^{-1}$  de íon cloreto. O tempo para esta oxidação variou entre 36 e 110 horas.



**Figure 4.** Change in percent of oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  ions during the growth of *A. ferrooxidans* PCEL and SSP in T & K complete in the presence of  $\text{Cl}^-$  ion concentrations: ■ 0  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ● 50  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ▲ 100  $\text{mmol. L}^{-1}$ ; ◆ 200  $\text{mmol. L}^{-1}$ , ★ 400  $\text{mmol. L}^{-1}$  and ► 500  $\text{mmol. L}^{-1}$ .

A linhagem ATCC (23270) apresentou oxidação total dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  ocorreu em aproximadamente 40 e 70 h, para as concentrações de 0 a 200  $\text{mmol. L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$  (Figura 5). A linhagem V3 não foi capaz de tolerar concentrações superiores a 100  $\text{mmol. L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$ .



**Figure 5.** Change in percent of oxidation of Fe<sup>2+</sup> ions during the growth of *A. ferrooxidans* V3 and ATCC in T & K complete in the presence of Cl<sup>-</sup> ion concentrations:

■ 0 mmol. L<sup>-1</sup>, ● 50 mmol. L<sup>-1</sup>, ▲ 100 mmol. L<sup>-1</sup>; ◆ 200 mmol. L<sup>-1</sup>, ★ 400 mmol. L<sup>-1</sup>  
and  
▶ 500 mmol. L<sup>-1</sup>.

Analisando-se esses dados em conjunto, foi possível determinar uma ordem crescente de halotolerância das linhagens em relação à capacidade de oxidação dos íons ferrosos na presença de íons cloreto: S> SSP> V3> LR>PCE>ATCC> SJ22>CMV> PCEL>AMF (Tabelas 3 e 4).

**Table 3.** Maximum percentage and time for oxidation of Fe<sup>2+</sup> by strains of *A. ferrooxidans* in the presence of different concentrations of Cl<sup>-</sup> ions.

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

\*nr: unrealized

**Table 4.** Maximum percentage and time for oxidation of Fe<sup>2+</sup> by strains of *A. ferrooxidans* in the presence of different concentrations of Cl<sup>-</sup> ions.

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

\*nr: unrealized

Avaliando os resultados de respirometria celular foi possível verificar quais linhagens apresentaram a melhor atividade frente ao consumo de oxigênio na presença de calcopirita nas diferentes concentrações de cloreto estudada. Os experimentos de respirometria apresentaram um perfil semelhante para todas as linhagens e a tabela 5 resume o consumo de O<sub>2</sub> obtido nas condições do ensaio, bem como a porcentagem de inibição.

Table 5. O<sub>2</sub> Consumption in the presence of chloride ions and percentage of inhibition

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

As linhagens AMF, LR e V3 apresentaram resultados semelhantes, nenhuma delas apresentou inibição na presença de cloreto. Os valores finais de consumo de O<sub>2</sub> também foram próximos.

A linhagem CMV teve um consumo maior de O<sub>2</sub>, quando comparado a AMF, mas a inibição pelo cloreto foi bastante relevante (63%).

A linhagem PCE e ATCC, apesar de ter apresentado consumo de O<sub>2</sub> comparável com as linhagens AMF e LR. A porcentagem de inibição na presença de cloreto foi de 71% e 14% respectivamente. Cabe ressaltar que a linhagem PCE apresentou a maior inibição ao cloreto em comparação com todas as outras.

O consumo de O<sub>2</sub> para a linhagem S foi o maior na ausência de cloreto quando comparado com as outras linhagens, mas apresentou significativa inibição na presença de cloreto (50%). Mesmo com esta porcentagem significativa de inibição, a linhagem S pode ser considerada halotolerante.



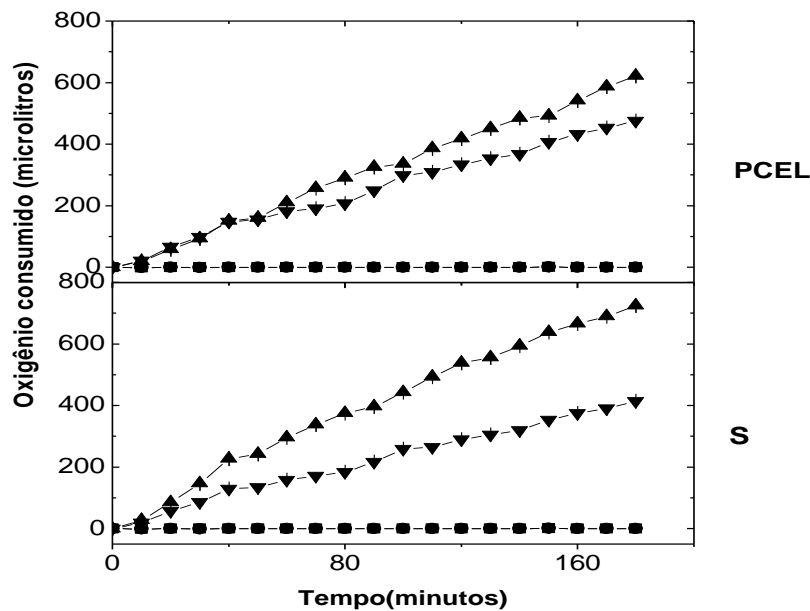
Para a linhagem SJ22 o consumo de O<sub>2</sub> foi significativo e obteve-se uma porcentagem de inibição na presença de Cl<sup>-</sup> de 40%.

A linhagem PCEL apresentou relevante consumo de O<sub>2</sub>, e uma porcentagem de inibição relativamente baixa 33%, tornando-se uma linhagem interessante no ponto de vista de halotolerância.

Para a linhagem SSP o consumo de O<sub>2</sub> foi relativamente baixo, e mostrou uma inibição bastante significativa quando comparado com as outras linhagens.

Conseguimos com os resultados obtidos determinar uma ordem crescente na porcentagem de inibição pelo cloreto na concentração estudada:

(AMF ≈ LR ≈ V3) > ATCC > PCEL > SJ22 > S > SSP > CMV > PCE.



**Figure 5.** O<sub>2</sub> consumption of strains of *A. ferrooxidans* (150µg total protein) PCEL and S. Conditions: ■ control with 0 mmol. L<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup>, ● control with 50 mmol. L<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup>, ▲ inoculum with 0 mmol. L<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup>, ▼ inoculum with 50 mmol. L<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup>.

A Figura 5 representa um comportamento observado de maneira geral para todas as linhagens testadas.

## CONCLUSÕES

Devido às dificuldades nos processos de dissolução da calcopirita, alternativas de aperfeiçoamento estão sendo necessárias. A utilização de íon cloreto neste trabalho foi bastante promissor, comparável com o que tem sido estudado e demonstrado sobre o efeito acelerador desse íon no processo de lixiviação.

O presente estudo permitiu analisar a influência dos íons  $\text{Cl}^-$  na oxidação do íon ferroso e a tolerância das linhagens de *A. ferrooxidans* na presença dos mesmos.

Os resultados mostraram diferenças na cinética de oxidação do íon  $\text{Fe}^{+2}$  nas linhagens AMF, CMV, SJ22, PCEL e ATCC 23270, na presença de íons  $\text{Cl}^-$ . As cinco linhagens testadas foram tolerantes às concentrações de 100 e 200  $\text{mmol. L}^{-1}$  desses íons, porém atingiram total oxidação da fonte energética em tempos diferentes. A linhagem AMF apresentou uma discreta tolerância nas concentrações de 400  $\text{mmol. L}^{-1}$  e 500  $\text{mmol. L}^{-1}$  com uma porcentagem de oxidação de íons ferrosos de 23% e 13% respectivamente. As outras linhagens CMV, SJ22, PCEL e ATCC 23270, não apresentaram atividade oxidante significativa nestas mesmas condições, o que mostra o efeito totalmente inibitório de íons  $\text{Cl}^-$  no crescimento dessas linhagens.

Os resultados respirométricos evidenciaram as diferenças entre as linhagens testadas, no entanto não houve uma concordância com os resultados da cinética de oxidação dos íons ferrosos.

As linhagens que apresentaram halotolerância serão futuramente testadas em ensaios de biolixiviação em frascos agitados com diferentes concentrações de cloreto. Para tanto,

todas as linhagens a serem testadas serão pré-adaptadas à presença de calcopirita e cloreto.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos são devidos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Processo 2011/19868-5), CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ahonen L & Tuovinen OH. 1992. Alterations in surfaces and textures of minerals during the bacterial leaching of a complex sulfide ore. *Geomicrobiology Journal*, 10 207-217.
- Ahonen L & Tuovinen OH. 1993. Redox-potential-controlled bacterial leaching of chalcopyrites ores. *Biohydrometallurgical Technologies*. USA: The Minerals, Metal and Material Society: 571-578
- Córdoba EM, Muñoz JA, Blázquez ML, González F & Ballester A. 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion (Part I): General aspects [J]. *Hydrometallurgy* 93: 81p
- Daoud J & Karamanev D. 2006. Formation of jarosite during Fe<sup>2+</sup> oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 19 (9): 960–967
- Dixon DG, Mayne DD & Baxter KG. 2008. Galvanox-a novel galvanically assisted atmospheric leaching technology for copper concentrates. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 47: 327-336

- Dutrizac JE. 1989. Elemental sulphur formation during the ferric sulphate leaching of chalcopyrite. *Can Metal. Q*, 28 (4): 337–344
- Garcia Junior, O. 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia*, 22: 1-6
- Garcia Jr O. & Mukai JK. 1992. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. *Journal of General and Applied*, 38 3: 279-282
- Garcia Junior O. 1997. Microorganismos e metais. In: Melo IS & Azevedo JL *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa, 1: 11-39
- Habashi F. 1978. *Chalcopyrite-its chemistry and metallurgy*. New York: Mac Graw-Hill.
- Hartree EF. 1972. Determination of proteins: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48 (2) : 422-427
- Leduc LG & Ferroni GD. 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 14:103-120.
- Liddicoat J & Dreisinger D. 2007. Chloride leaching of chalcopyrite. *Hidrometallurgy*, 89: 323-331
- Lu Z, Jeffrey Y, Lawson MI. 2000. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. *Hydrometallurgy*, 56 189-202
- Lu ZY, Jeffrey MI, Lawson F. 2000b. An electrochemical study of the effect of chloride ion son the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. *Hydrometallurgy*, 56:145-155.
- Nicol M, Miki H & Velásquez-Yévenes L.2010. The dissolution of chalcopyrite in chloride solutions. Part 3. Mechanism. *Hidrometallurgy*, 103: 86-95

- Novello APF. 2008. *Análise proteotômica diferencial de Acidithiobacillus ferrooxidans em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de A. ferrooxidans LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita*. Tese Doutorado em Biotecnologia – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- Ndlovu S. 2008. Biohidrometallurgy for sustainable development in the African minerals industry. *Hidrometallurgy*, 91: 20-27
- Rawlings DE. 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
- Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K & Sand W. 2003a. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63: 239–248
- Sandell EB 1959. *Colorimetric Determination of traces of metals*, 3rd ed., Interscience Publishers, INC., New York, NY, p. 537-542.
- Tuovinen OH. & Kelly DP. 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membranes filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with  $^{14}\text{CO}_2$  fixation and iron oxidation as measures of growth. *Archives of Microbiology*, 88(4): 285-298
- Tuovinen OH, Panda FA & Tsushuja HM 1979. Nitrogen requirements of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acid ferric sulfate regeneration. *Applied Environment Microbiology*, v. 37, p. 954-958.
- Umbreit WW, Burris RH, Stauffer, JF. 1972. P 290-305 En: *Manometric & Biochemical Techniques*. 5<sup>a</sup> ed. Burgess Publ. C, Minneapolis:
- Yoo K, Kim SK, Lee JC, Ito M, Tsunekawa & Hiroyoshi, N. 2010. Effect of chloride ion on leaching rate of chalcopyrite. *Minerals Engineering*, 23 471-477.