

# IDENTIFICAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA NATIVA PRESENTE DURANTE A BIOLIXIVIAÇÃO DE SULFETOS DE COBRE



## Isabella Cesario de Amaral

Aluna de Graduação de Química, 8º período, Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras Souza Marques.

Período PIBIC/CETEM: Julho de 2010 a julho de 2011,  
isacesario@gmail.com

## Renata de Barros Lima

Orientadora, Química, D.Sc.  
renatadbarros@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

A biolixiviação representa 20%, aproximadamente, da extração mundial de cobre e está sendo utilizada em cerca de 20 minas no mundo. O resultado da ação de micro-organismos nos rejeitos minerais contendo sulfetos, a exemplo da pirita, é a geração de drenagens ácidas, conhecidas há milhares de anos, que são disponibilizadas nos corpos d'água. Entretanto, foi somente em 1947 que os micro-organismos foram identificados como os responsáveis por esse processo (Pro Cobre, 2011). O que torna a técnica da biolixiviação uma alternativa muito interessante, na substituição dos processos convencionais, é a capacidade de certos micro-organismos oxidantes de ferro ou enxofre, como os gêneros *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*, crescerem em ambientes altamente ácidos e em presença de metais pesados (Gibbs *et al.*, 1985).

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo a quantificação e identificação de micro-organismos nativos do concentrado de flotação de sulfetos de cobre durante o processo de biolixiviação para a extração do referido metal.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 Concentrado de Flotação e Rocha Suporte

Foi utilizado nos experimentos o concentrado de flotação de sulfetos de cobre, que contém cerca de 30% de bornita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ) e 70% de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e um teor de, aproximadamente, 29% em cobre. Como rocha suporte, foi empregado um minério primário de cobre, contendo cerca de 1 % desse metal.

### 3.2 Solução lixiviante – Meio de Cultura MKM

O meio de cultura MKM (Modified Kelly Medium) (Olson *et al.*, 2003) contém sais minerais e é composto por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,4 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,04g/L, com ajuste do pH para 1,7 pela adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

### 3.3 Ensaio de Controle de Biolixiviação em coluna

O ensaio de biolixiviação em coluna consiste no recobrimento da rocha suporte com o concentrado de flotação, em uma coluna de polipropileno de 60 cm de altura, com percolação contínua de solução lixiviante com vazão de 1L/h (Meio de cultura MKM, 0,2 vezes), e aeração contínua (Amaral & Lima, 2010). Por ser este um ensaio controle, não foram adicionados micro-organismos. O tempo de processo da coluna de biolixiviação foi de 70 dias, sendo os primeiros 5 dias para atuação do grupo dos micro-organismos mesófilos, nos próximos 35 dias para propiciar a ação do grupo dos micro-organismos termófilos moderados, e os 30 dias restantes para ação do grupo dos micro-organismos termófilos extremos. Os parâmetros operacionais de controle e acompanhamento do processo de biolixiviação aferidos foram: volume de evaporação de solução lixiviante, temperatura, ajuste do pH, potencial redox ( $E_h$ ), concentrações das espécies iônicas ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ), e concentração de cobre.

### 3.4 Ensaio de atividade microbiana

Durante o ensaio controle de biolixiviação em coluna, foram retiradas amostras da rocha suporte recoberta pelo concentrado de flotação da coluna nas diferentes faixas de temperatura. Estas amostras foram cultivadas em meio de cultura MKM com concentração dupla e incubadas por 10 dias em distintas temperaturas, para observação e quantificação microbiana.

Tabela 1. Descrição dos ensaios de atividade microbiana; Representação da identificação da amostragem na coluna, sem inóculo microbiano.

<i>Temperatura da Coluna</i>	<i>Grupo Atuante</i>	<i>Temperatura de Incubação Ensaio de Atividade Microbiana</i>	<i>Identificação</i>
30°C	Mesofílicos	30°C	Mes 4
		50°C	Mod 4
		70°C	Ext 4
50°C	Termófilos Moderados	30°C	Mes 5
		50°C	Mod 5
		70°C	Ext 5
70°C	Termófilos Extremos	30°C	Mes 6
		50°C	Mod 6
		70°C	Ext 6
		Sólido	Solid

### 3.5 Identificação da biodiversidade microbiana - Análise molecular

O cultivo microbiano, resultante dos ensaios de atividade microbiana, foi encaminhado para o laboratório de Serviço de Caracterização Biológica da empresa BioSigma/Santiago - Chile. Um conjunto de 10 amostras, descritas na Tabela 1, foi submetido a análises para a identificação da presença de micro-organismos mesofílicos, termofílicos moderados e termofílicos extremos.

Foram utilizadas duas classes de análises: metodologias independentes de extração de DNA e metodologias dependente de extração de DNA. Na metodologia independente de DNA foi utilizada a técnica de contagem ótica, sendo utilizado um microscópio de contraste de fase para determinar diretamente o número total de micro-organismos presentes em amostras sólidas e líquidas; e, em metodologias dependente de extração de DNA foram utilizadas duas técnicas complementares: qPCR (reação de amplificação quantitativa em tempo real) e Microarray BMS3.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio Controle de Biolixiviação

É possível observar, na figura 1-A, que a curva de extração de cobre do ensaio controle é crescente, atingindo ao 70º dia, uma extração superior a 75%. Enquanto que a curva do ensaio inoculado, neste mesmo período, mostra uma extração de cobre de 89%, bem maior que no caso anterior, Observa-se, também, que apesar do menor percentual de extração, a curva do ensaio onde não foram adicionados os micro-organismos (Controle) segue um mesmo perfil que a do ensaio onde foram adicionados os micro-organismos (Inoculado).

Observa-se também que apesar do menor percentual de extração, a curva do ensaio onde não foram adicionados os micro-organismos (Controle) segue um mesmo perfil que aquela onde foram adicionados os micro-organismos (Inoculado). Avaliando a figura 1-B, nota-se uma elevação do potencial durante o ensaio, chegando a valores de, aproximadamente, 800 mV vs. EPH, porém esse patamar só foi alcançado, no ensaio controle em aproximadamente 30 dias de processo, quando se espera a atuação dos micro-organismos termófilos moderados.

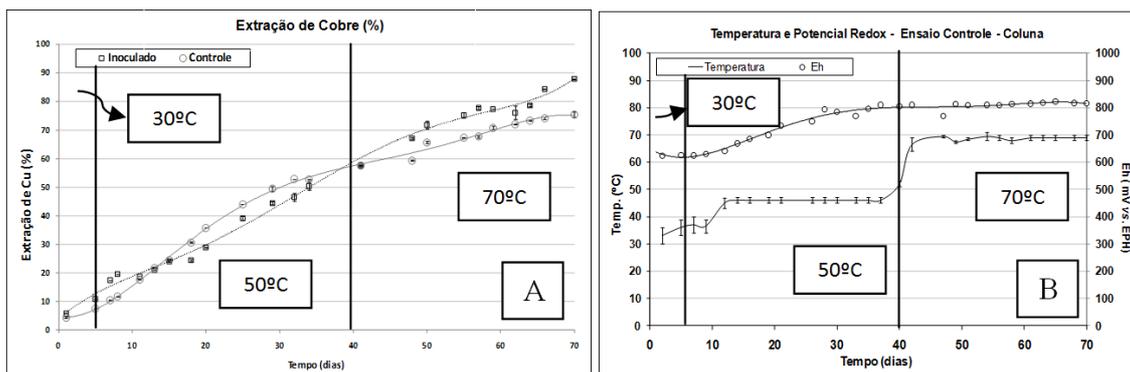


Figura 1. Porcentagem de extração de cobre durante os ensaios Inoculado e Controle [A] e valores de potencial redox (mV vs. EPH) e Incremento de temperatura (°C) durante o ensaio Controle [B]

## 4.2 Identificação da biodiversidade microbiana - Análise molecular

Como descrito no item 3.5, os ensaios de atividade microbiana foram quantificados. A tabela 2 mostra uma comparação entre a quantificação microbiana realizada em câmara de *Thoma* – realizada no laboratório de hidrometalurgia CPMA/SPMB do CETEM e a realizada no laboratório de Serviço de Caracterização Biológica da empresa BioSigma - Chile.

Foi possível observar a presença de células em todas as amostras quando avaliadas na quantificação por contraste de fase, mostrando que, mesmo quando não adicionado consórcio microbiano, ocorre ativação dos micro-organismos nativos, quando expostos a ambiente favorável aos seus metabolismos (temperatura, pH, meio de cultura, etc).

Tabela 2. Comparação da quantificação microbiana das amostras obtidas durante o ensaio Controle de biolixiviação em coluna

Temperatura da Coluna	Temperatura de Incubação Ensaio de Atividade Microbiana	Identificação	Quantificação por Câmara de Thoma (cel./mL) - CETEM	Quantificação Contrate de Fase (cel./mL)- Biosigma
30°C	30°C	Mes 4	1,88E+07	2,46E+09
	50°C	Mod 4	2,25E+06	1,13E+07
	70°C	Ext 4	-	2,19E+07
50°C	30°C	Mes 5	4,28E+07	4,50E+09
	50°C	Mod 5	7,25E+06	4,20E+08
	70°C	Ext 5	-	3,00E+07
70°C	30°C	Mes 6	-	1,69E+07
	50°C	Mod 6	2,95E+07	8,00E+08
	70°C	Ext 6	2,50E+06	5,63E+06
	Sólido	Solid	-	1,12E+08

Não Foi possível realizar a quantificação

Na quantificação realizada por contraste de fase, é possível avaliar uma maior densidade microbiana do que aquela onde a quantificação realizada foi com a utilização de microscópio ótico. Tal fato ocorreu por que com o uso do microscópio de contraste de fase é possível a quantificação das células vivas a partir da diferença de fase dos raios luminosos que atravessam o fundo relativamente à fase da luz que atravessa os micro-organismos (Albert *et al.*, 2002). Já a quantificação em microscópio ótico foi realizada apenas a partir da contagem das células em movimento.

Tabela 3. Identificação de micro-organismos e funcionalidades detectadas durante o ensaio controle de biolixiviação em coluna, a partir das técnicas qPCR e Microarray BMS3.0

<b>Bioidentificação</b>		
	<b>Ensaio Controle</b>	<b>Amostra Sólida</b>
Bactéria	X	X
<i>Leptospirillum group II</i>		X
<i>Leptospirillum spp.</i>		X
<i>Sulfobacillus spp.</i>	X	
<i>Sulfolobus spp.</i>	X	
<i>S. acidocaldarius</i>	X	
Archaea	X	
<b>Funcionalidades</b>		
Ferro-oxidantes		X
Enxofre-oxidantes		
Formação de Biofilme	X	X
Fixação de Carbono	X	X

Conforme mostrado na tabela 3, no ensaio controle foi identificada a presença de *Sulfobacillus spp.* e *Sulfolobus spp.*, porém a funcionalidade “enxofre-oxidante” não foi detectada. Pode-se considerar que diferentes técnicas foram utilizadas e por isso possuem diferentes limites de detecção.

## 5. CONCLUSÕES

A extração de cobre se mostrou crescente com o aumento da temperatura, o que propiciou a oxidação da calcopirita. Foi observada, por meio de microscópio ótico, a presença de micro-organismos no concentrado de flotação, que atuaram no processo extrativo de cobre. Com base nos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, é possível concluir que ocorreu a presença de micro-organismos nativos do concentrado de flotação no ensaio controle, em coluna automatizada, visto que a análise molecular identificou a presença de grupos como *A. thiooxidans*, Archaea, *Sulfobacillus spp.*, *Sulfolobus spp.*, além daqueles encontrados na amostra sólida do mesmo grupo de ensaios, ou seja, sem adição de consórcio microbiano: Bactéria, ferroxidantes, *Leptospirillum group II*, *Leptospirillum spp.*

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pelo apoio financeiro, ao CETEM pelo apoio logístico, ao Laboratório BioSigma – Chile pela quantificação dos micro-organismos e a orientadora Renata Lima.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, BRUCE, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, AND PETER WALTER. **Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Molecular Biology of the Cell, 4th edition**, New York: Garland Science; 2002. ISBN-10: 0-8153-3218-1

AMARAL, I. C.; LIMA, R. B.; Influência dos Micro-organismos Nativos na Oxidação de Sulfetos Minerais de Cobre; XVIII Jornada de Iniciação Científica – CETEM, 2010.

GIBBS, H.E.; ERRINGTON, M.; POOLEY, F.D. Economics of bacterial leaching. **Can. Metall. Q.**, v. 24(2), p. 121-125, 1985.

OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review B: processing in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **App. Microb. and Biotec.**, v. 63, p.249 – 257, 2003.

ProCobre.org. **Bactérias mineradoras: comem pedra e liberal cobre**. Disponível em: [http://www.procobre.org/pr/noticias/0309\\_03.html](http://www.procobre.org/pr/noticias/0309_03.html); último acesso em abril de 2011.