

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

Biofilmes: A interação micro-organismo/substrato mineral na biolixiviação

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA

Dilma Vana Rousseff

Presidente

Michel Miguel Elias Temer Lulia

Vice-Presidente

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Clelio Campolina Diniz

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação

Alvaro Toubes Prata

Secretário-Executivo

Kayo Julio Cesar Pereira

Coordenação-Geral das Unidades de Pesquisa

CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL

Fernando Antonio Freitas Lins

Diretor

Arnaldo Alcover Neto

Coordenador de Análises Minerais

Claudio Luiz Schneider

Coordenador de Processos Minerais

Cosme Antônio de Moraes Regly

Coordenador de Administração

Francisco Wilson Hollanda Vidal

Coordenador de Apoio Tecnológico às Micro e Pequenas Empresas

Jackson de Figueiredo Neto

Coordenador de Planejamento, Gestão e Inovação

Ronaldo Luiz Correa dos Santos

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-8261-023-7

STA - 72

Biofilmes: A interação micro-organismo/substrato mineral na biolixiviação

Ellen Cristine Giese

Química, D. Sc., Tecnologista Pleno do CETEM/MCTI.

CETEM/MCTI

2014

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

Luis Gonzaga Santos Sobral

Editor

Andréa Camardella de Lima Rizzo

Subeditora

CONSELHO EDITORIAL

Mariza Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio M. Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Sílvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos A. da Costa (UERJ), Fátima Maria Z. Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánches (EPUSP) e Virginia S. Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minerometalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Valéria Cristina de Souza

Coordenação Editorial

Valéria Cristina de Souza

Editoração Eletrônica

Andreza Milheiro

Revisão

Giese, Ellen Cristine.

Biofilmes: A interação micro-organismo/substrato mineral na biolixiviação / Ellen Cristine Giese. __Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2014.

41p. (Série Tecnologia Ambiental, 72)

1. Biolixiviação. 2. Biofilmes. 3. Adesão microbiana. I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Giese, Ellen Cristine. III. Título. IV. Série.

CDD – 669.0283

SUMÁRIO

RESUMO _____	7
ABSTRACT _____	8
1 BIOLIXIVIAÇÃO _____	9
1.1 Mecanismos da Biolixiviação _____	10
2 BIOFILMES _____	14
2.1 Adesão Bacteriana às Superfícies Minerais _____	15
3 INTERAÇÃO MICRO-ORGANISMO/SULFETO MINERAL NA BIOLIXIVIAÇÃO _____	19
3.1 Produção de EPS por Bactérias Lixiviantes _____	23
3.2 Interações EPS-Fe ³⁺ na Dissolução dos Sulfetos Minerais _____	26
3.3 A Atividade Microbiana no Processo de Biolixiviação _____	28
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	33

RESUMO

A biolixiviação é um processo extrativo de valores metálicos a partir de minérios de baixos teores pela ação de micro-organismos. Neste bioprocessos, a atividade metabólica dos micro-organismos envolvidos promove a geração de oxidantes químicos responsáveis pelo ataque à matriz mineral e liberação dos íons metálicos de interesse. A adesão bacteriana tem um papel fundamental no início do processo bio-extrativo, uma vez que as células aderidas oxidam o íon sulfeto a sulfato liberando íons ferrosos (Fe^{2+}), os quais são oxidados à íons férricos (Fe^{3+}) que atuam como agente oxidante na dissolução dos sulfetos minerais com consequente aumento da taxa de extração dos metais de interesse. Neste contexto, a formação de biofilmes, contendo comunidades de micro-organismos imobilizados numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares, é essencial para a fixação desses micro-organismos sobre a superfície mineral. Ademais, os biofilmes apresentam grupos funcionais capazes de formarem complexos com os íons Fe^{3+} e também atuam como mediadores do ataque oxidativo aos sulfetos minerais. Esta revisão bibliográfica realiza uma abordagem do papel dos biofilmes e adesão microbiana na dinâmica do processo interfacial micro-organismo-sulfeto mineral, visando ao entendimento e melhoramento dos processos de biolixiviação em indústrias de mineração.

Palavras-chave

Biolixiviação, biofilmes, adesão microbiana, substâncias poliméricas extracelulares.

ABSTRACT

The bioleaching is an extractive process of metal values out of low grade ores by using microorganisms. In this bioprocess, the metabolic activity of the involved microorganisms promotes the production of oxidizing chemicals in charge of attacking the mineral matrix releasing the metal ions of interest. The bacterial adhesion plays a fundamental role in the beginning of bioprocess, since the adhered cells oxidize the sulphide ion to sulphate releasing ferrous ions (Fe^{2+}) that are further oxidized in the bulk to ferric ions (Fe^{3+}) that act as oxidizing agent in the dissolution of sulphide minerals with consequent increase of the extraction rate of metals of interest. In this context, the formation of biofilms bearing communities of microorganisms, immobilized on a matrix of extracellular polymeric substances, is essential for fixing such microorganisms on the mineral surface. In addition, the biofilms present functional groups capable of forming complexes with Fe^{3+} ions and also act as mediators of oxidative attack to sulphide minerals. This literature survey provides an approach to the role of biofilms and microbial adherence on the dynamics of the microorganism-sulphide mineral interfacial process, aiming at understanding and improving the bioleaching processes in mining industries.

Keywords

Bioleaching, biofilms, microbial adhesion, extracellular polymeric substances

1 | BIOLIXIVIAÇÃO

A biolixiviação é um processo hidrometalúrgico de dissolução de sulfetos minerais através de processos biológicos oxidativos. A lixiviação biológica ocorre pela ação de um grupo de micro-organismos capazes de produzir ácidos e/ou agentes oxidantes a partir dos constituintes do próprio minério em processo de lixiviação, com a vantagem de requerer um baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A lixiviação natural do cobre foi descrita pela primeira vez em 162 a.C., sendo oficialmente reconhecida como um processo biológico de extração de cobre somente em 1752, com a descoberta de micro-organismos lixiviantes na mina Rio Tinto, localizada no sul da Espanha (DRESHER, 2004). Porém, somente em 1958, os pesquisadores Bryner & Jameson propuseram o uso de micro-organismos na lixiviação do cobre.

Os micro-organismos utilizados nos processos de biolixiviação são, em sua maioria, isolados bacterianos que ocorrem naturalmente em jazimentos contendo sulfetos minerais em lugares propícios à lixiviação natural. São geralmente acidófilos, autotróficos e quimiotróficos, obtendo energia a partir de dióxido de carbono e da oxidação de compostos inorgânicos, respectivamente (BOSECKER, 1997; SCHIPPERS, 2007).

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi a primeira espécie microbiana a ser empregada nos processos de biolixiviação de sulfetos minerais de cobre, sendo também considerada a espécie dominante na população microbiana nas drenagens ácidas de mina por apresentar grande capacidade de oxidar íons ferrosos (Fe^{2+}), compostos reduzidos de enxofre e sulfetos

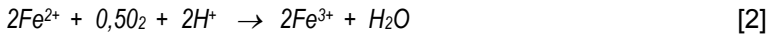
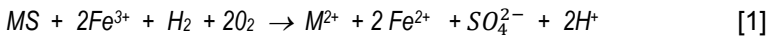
minerais. As bactérias mesófilas *Acidithiobacillus thiooxidans* (oxidante de compostos reduzidos de enxofre e, em particular, o enxofre elementar (S^0) com produção de ácido sulfúrico) e *Leptospirillum ferrooxidans* (oxidante de Fe^{2+}) atuam sinergicamente à *A. ferrooxidans* nos processos convencionais de biolixiviação, promovendo a solubilização mais efetiva dos metais de interesse constituintes dos sulfetos minerais (ROHWEDER, 2003; LAVALLE, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O uso de bactérias capazes de oxidar minérios de ferro e/ou enxofre acelera a velocidade de oxidação de diversos sulfetos minerais principalmente em função da formação de íons férricos (Fe^{3+}), sendo que diferentes mecanismos de dissolução dos minerais têm sido propostos na literatura nos últimos anos.

1.1 | Mecanismos da Biolixiviação

Os sulfetos minerais como a pirita (FeS_2) e a calcopirita ($CuFeS_2$) são oxidados naturalmente no meio ambiente em consequência de uma série de reações químicas de oxirredução catalisadas por micro-organismos que utilizam a energia de oxidação de espécies iônicas de ferro e compostos reduzidos de enxofre em benefício de seu metabolismo.

A importância da presença das bactérias capazes de dissolver sulfetos minerais está na capacidade de catalisar a reação de oxidação do íon Fe^{2+} liberado do minério a íon Fe^{3+} , o qual ataca o sulfeto mineral promovendo a extração dos metais de interesse. A Equação 1 ilustra a reação de oxidação de um sulfeto mineral (MS) na presença de íons Fe^{3+} e a Equação 2 ilustra a regeneração biológica das espécies iônicas de Fe^{2+} realizada pelas bactérias lixiviantes.



Até a década de 90, conceitos de mecanismos diretos e indiretos de lixiviação microbiana de sulfetos minerais foram considerados fundamentais para a eficiência destes bioprocessos. O mecanismo de contato direto sugeria que os componentes minerais estariam expostos a reações de transferência de elétrons subsequentes catalisadas por enzimas extracelulares, através das quais o micro-organismo poderia obter energia e promoveria a dissolução dos sulfetos minerais. Porém, a ação de enzimas nos processos de biolixiviação não foi constatada até os dias atuais (GIAVENO *et al.*, 2011).

No mecanismo de contato indireto, a interação substrato-micro-organismo mediada por substâncias extracelulares é também responsável pela dissolução do mineral e, no mecanismo indireto, os micro-organismos seriam somente responsáveis pela regeneração de íons Fe^{3+} presentes na solução, representada na Equação 2, os quais atuam na oxidação química do sulfeto mineral, reação esta representada na Equação 1 (GEHRKE *et al.*, 1998; CRUNDWELL, 2003; RAWLINGS, 2004; SAND & GEHRKE, 2006).

Atualmente, a necessidade da bactéria estar aderida à superfície dos sulfetos minerais é considerada fundamental para a eficiência da biolixiviação, e a interação micro-organismo/sulfeto mineral combina os mecanismos indiretos e de contato direto, conforme ilustrado na Figura 1.

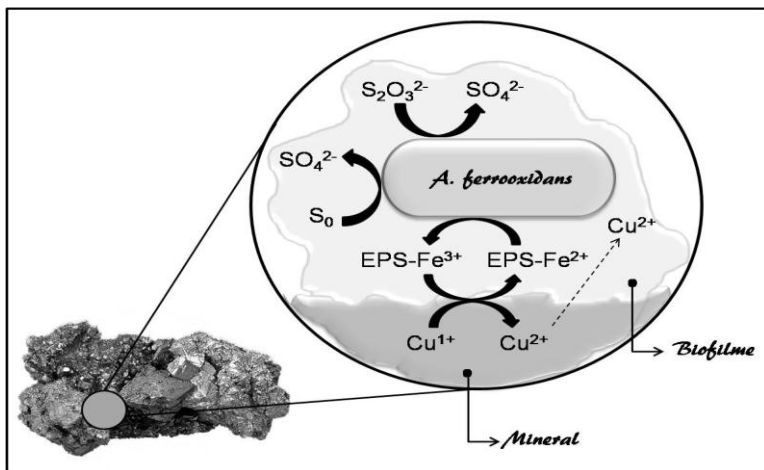


Figura 1. Mecanismo de interação entre a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* e a superfície do sulfeto mineral de cobre durante o processo de biolixiviação.

O biofilme bacteriano formado em consequência da adesão celular é capaz de complexar os íons Fe³⁺ e potencializar as reações oxidativas na superfície do sulfeto mineral, promovendo sua dissolução. Em uma primeira etapa, ocorrem interações eletrostáticas entre os íons Fe³⁺ e resíduos de ácido urônico presentes nas substâncias poliméricas extracelulares – EPS (*"Extracellular Polymeric Substances"*) produzidas pelos micro-organismos e constituintes do biofilme formado sobre a superfície mineral. Esta primeira interação é seguida por interações hidrofóbicas, considerando, por exemplo, que mais da metade das EPS de *A. ferrooxidans* são compostas por lipídios (SCHIPPERS, 2004; NOËL *et al.*, 2010; YU *et al.*; 2013).

Neste sentido, o processo de biolixiviação assemelha-se à biossolubilização, no qual a produção de substâncias biogênicas como as EPS microbianas são responsáveis pela extração de metais a partir de minerais (BEVILAQUA *et al.*, 2013). Na biolixiviação, a interface minério-EPS criada é de fundamental importância para a solubilização dos metais de interesse. A interface EPS-sulfeto mineral constitui um espaço reacional de atividade microbiana e dissolução do mineral, o conhecimento da dinâmica destas interações interfaciais e seu impacto na proliferação da população microbiana associada à superfície, através da formação dos biofilmes, são fundamentais para o entendimento e emprego eficiente deste processo biohidrometalúrgico.

2 | BIOFILMES

O termo biofilme é utilizado para se referir às comunidades microbianas que encontram-se associadas à uma superfície assim como aos micro-organismos que situam-se na forma de flocos ou agregados, sejam eles bactérias, algas, fungos e/ou protozoários. Os biofilmes se desenvolvem em todas as interfaces óleo/água/ar e estão embebidos nas substâncias poliméricas extracelulares (EPS, "*Extracellular Polymeric Substances*") produzidas pelos micro-organismos que o compõem (HALAN *et al.*, 2012).

A formação de biofilmes é essencial para a sobrevivência da população bacteriana, sendo estes encontrados em ambientes aquáticos naturais, solos, tecidos vivos, instrumentos médicos ou industriais, encanamento de água, entre outros. A ocorrência de células sésseis, ou seja, aderidas à alguma superfície, é comumente observada na natureza em contraposição àquelas livres e dispersas na fase aquosa, denominadas planctônicas (DONLAN, 2002).

Os biofilmes são formados através de uma sequência de eventos microbianos, os quais são comumente descritos em cinco estágios (Figura 2): 1) *adesão celular*, em que os micro-organismos, na forma de vida planctônica, são estimulados a aderir à alguma superfície (células sésseis) pela proximidade com o substrato; 2) *colonização*, etapa de adesão reversível na qual ocorrem interações químicas célula-substrato e multiplicação celular visando a colonização inicial da superfície aderida; 3) *acumulação*, etapa de adesão irreversível caracterizada pela presença de EPS e pela fixação de células sésseis e outras partículas através de microcolônias aderidas entre si e uma superfície; 4) *comunidade "clímax"*, estágio de

equilíbrio dinâmico após o aumento da densidade populacional e pronunciada produção e deposição de EPS, promovendo o aumento da espessura do biofilme e da estabilidade da colônia e 5) *dispersão*, onde a área limitada para adesão na superfície provoca a difusão de micro-organismos e agregados celulares da fase interfacial para a solução e parte das células aderidas se destacam do biofilme assemelhando-se às células planctônicas (JENKINSON & LAPPIN-SCOTT, 2001).

O biofilme é caracterizado por ser uma entidade dinâmica na qual as células planctônicas dispersas em solução se aderem continuamente ou deixam a comunidade, estimulando a diversificação ou dispersão celular e promovendo uma remodelação contínua da estrutura desta biopelícula.

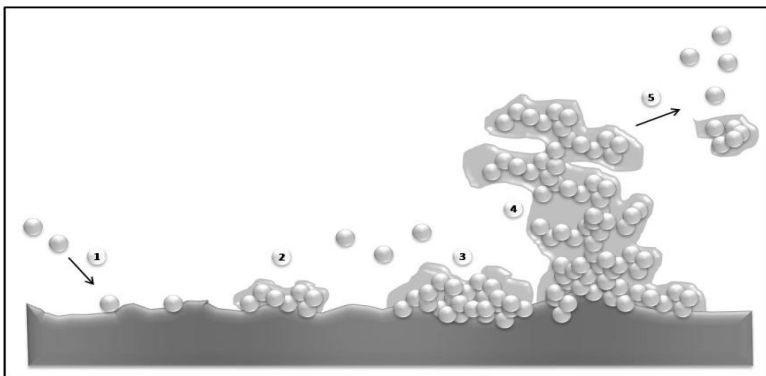


Figura 2. Ciclo de desenvolvimento e fases dos biofilmes microbianos sobre um substrato sólido.

2.1 | Adesão Bacteriana às Superfícies Minerais

A adesão microbiana sobre superfícies sólidas é a maneira mais comum de os micro-organismos estarem presentes na

natureza, especialmente sobre rochas e minerais, e está diretamente relacionada à atividade microbiana e sua sobrevivência (EHRLICH & NEWMAN, 2009).

A adesão de bactérias em substratos sólidos é um processo físico-químico resultante das propriedades hidrofílicas e/ou hidrofóbicas da superfície celular, o qual é dependente do pH e força iônica da solução em que se encontra e também da composição da superfície do suporte (BOS *et al.*, 1999).

A interação das bactérias com a superfície dos minerais pode ser dividida em duas etapas. Em um primeiro momento é observada a adsorção microbiana com produção de EPS e, posteriormente, ocorre a formação de um biofilme que recobre a superfície mineral com células microbianas embebidas em uma camada contínua de EPS, como ilustrado anteriormente (Figura 2).

A parede celular bacteriana é constituída por macromoléculas de peptidoglicano, um dissacarídeo de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico que está presente isoladamente ou ligado a outras substâncias. As paredes celulares das bactérias gram-positivas (Figura 3a) contém ácidos teicoicos, formados por um álcool e fosfato. Nas bactérias gram-negativas (Figura 3b), as camadas de peptidoglicano estão ligadas a lipoproteínas e encontram-se no espaço periplasmático, uma vez que estas bactérias apresentam uma membrana externa constituída de lipoproteínas, lipolissacarídeos e fosfolípídeos. A carga elétrica da superfície bacteriana varia com a espécie, condições do meio (pH e força iônica) e composição da membrana. Geralmente, a presença de grupos fosforil e carboxil conferem uma carga eletrostática negativa à superfície celular (TORTORA *et al.*, 2003, ARAÚJO *et al.*, 2010).

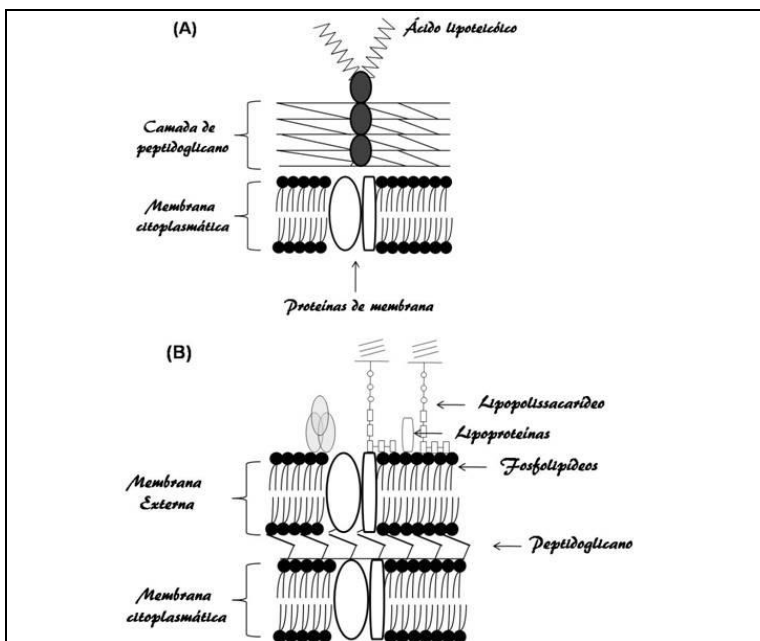


Figura 3. Representação esquemática parcial de uma célula bacteriana gram-positiva (A) e gram-negativa (B). Adaptado de Araújo *et al.*, (2010).

Além da carga eletrostática conferida pela superfície bacteriana, a carga elétrica do biofilme formado sobre o substrato mineral também depende da composição das EPS secretadas por estes micro-organismos durante o processo de adesão e fixação celular, as quais alteram as características físico-químicas das superfícies celulares e, conseqüentemente, afetam a formação do biofilme e adesão celular.

As EPS são biopolímeros nos quais os micro-organismos que compõem o biofilme encontram-se embebidos. Arqueas, bactérias e micro-organismos eucarióticos produzem EPS, os

quais são constituídos por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolípídios e, em alguns casos, também por DNA extracelular. As EPS determinam as propriedades dos biofilmes, pois afetam diretamente a porosidade, densidade, atividade de água, hidrofobicidade, estabilidade mecânica dos mesmos e, principalmente, a carga e as propriedades de adesão (FLEMMING *et al.*, 2007).

Como a maioria das partículas minerais apresentam excesso de carga negativa em suas superfícies, é necessário que os grupos aniônicos microbianos, tanto provenientes da superfície celular quanto presentes nas EPS secretadas, estejam complexados com constituintes catiônicos que confirmam carga positiva ao biofilme para que seja possível a adesão celular sobre o mineral. Nos sulfetos minerais, por exemplo, o biofilme carregado positivamente se adere à superfície carregada negativamente através de interações eletrostáticas, onde as espécies catiônicas podem atuar como ácidos de Lewis, aceitando o par de elétrons não compartilhado do enxofre presente na superfície mineral (GEHRKE *et al.*, 1998).

Além das EPS, os lipopolissacarídeos (LPS) constituintes da membrana celular da maioria das bactérias gram-negativas, como a *A. ferrooxidans* podem favorecer a adesão bacteriana sobre a superfície de minerais como a pirita e a calcopirita. Os LPS apresentam alta eletronegatividade e a maioria da carga aniônica, assim como nas EPS secretadas, é proveniente dos grupos carboxílicos e fosforílicos expostos. Estes grupos podem se ionizar dependendo das condições de pH da solução e, desta maneira, agirem como grupos funcionais na ligação com metais e na adesão às superfícies minerais (CHANDRAPRABHA & NATARAJAN, 2013).

3 | INTERAÇÃO MICRO-ORGANISMO/SULFETO MINERAL NA BIOLIXIVIAÇÃO

Os micro-organismos envolvidos nos processos de biolixiviação geralmente crescem aderidos à superfície dos sulfetos minerais (células sésseis), enquanto uma menor parte da população microbiana pode ser encontrada dispersa em solução (células planctônicas). Quando a biolixiviação é realizada em escala de bancada com o uso de frascos agitados, pode-se observar que mais de 80% do inóculo inicial contendo células livres não se encontra mais em suspensão no meio de cultivo após as primeiras 24 horas de incubação (HARNEIT *et al.*, 2006; VERA *et al.*, 2013), indicando o processo de adesão à superfície mineral. As mudanças químicas em solução, ocorridas durante o processo de biolixiviação, afetam, significativamente, as forças de adesão das bactérias lixiviantes e influenciam também na conformação do biopolímero formado (DIAO *et al.*, 2014).

Recentemente, a regulação da transição do estado planctônico (livre) para sésil (aderido) durante a biolixiviação foi descrita para a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A formação de um mensageiro secundário c-di-GMP (3',5'-diguanylate cíclico) pela bactéria crescida em pirita e enxofre elementar (S⁰) inibe várias formas de motilidade e controla a adesão das células bacterianas na forma sésil em biofilme (RUIZ *et al.*, 2012). A limitação de fosfato inorgânico (Pi) também é capaz de promover rearranjos celulares que desencadeiam a formação das biopelículas (AMARO *et al.*, 1993). Deve-se considerar, ainda, que as células de *A. ferrooxidans* podem colonizar superfícies sólidas através da *pili*, um apêndice filiforme

encontrado na superfície celular, combinando motilidade e adesão e resultando em um forte vínculo substrato-*pili* (LI *et al.*, 2010).

A interação micro-organismo/superfície mineral é principalmente regulada por um fator imprescindível aos processos biohidrometalúrgicos: a produção de EPS (VU *et al.*, 2009). Os micro-organismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme ($\leq 10\%$). A fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme é constituída pelas EPS secretadas, as quais são de fundamental importância para o ciclo de vida dos mesmos.

Os exopolímeros secretados pelas bactérias lixiviantes são responsáveis pela interação bactéria-sulfeto mineral e são decorrentes da ativação do sistema de quimiotaxia microbiana. Os micro-organismos acabam sendo atraídos para locais na superfície mineral eletricamente carregados através de sistemas sensoriais quimiotáticos ocasionando a formação de ânodos e catodos na superfície do sulfeto mineral de forma permanente. O número de sítios de ligação acessíveis pela bactéria estudada é também regulado pelo sistema de quimiotaxia, o qual é iniciado imediatamente após o contato bactéria-mineral. O processo de dissolução ocorre na camada de EPS, a qual encontra-se embebida no biofilme formado no espaço interfacial entre a membrana externa das células e a superfície mineral (ACUÑA *et al.*, 1992; TAN *et al.*, 2012).

As bactérias são capazes de adaptar a composição de suas EPS secretadas de acordo com o minério a ser colonizado a fim de que se propicie o ambiente adequado para sua adesão e consequente formação de biofilme. As células cuja superfície apresentam propriedades hidrofóbicas, caracterizadas pela

carga eletrostática positiva, se aderem mais facilmente à superfície mineral que as células hidrofílicas. Estas últimas apresentam carga negativa em solução e tendem a aderir a superfícies positivas através de atrações eletrostáticas. Neste caso, o substrato mineral atua como indutor da secreção de EPS que apresente grupos funcionais que tornem a superfície celular adequada para a adesão microbiana e formação de biofilme (BERNSTEIN *et al.*, 2011; RENNER & WEIBEL, 2011; CHEN *et al.*, 2013).

Os sulfetos minerais possuem carga negativa em ambientes extremamente ácidos, especialmente nos valores de pH empregados nos processos de lixiviação microbiana, os quais variam de 1,5 a 3,0 (WILLS & NAPIER-MUNN, 2006). Para que o biofilme bacteriano apresente carga positiva e se ligue à superfície destes sulfetos, os grupos carboxila, presentes nas EPS na forma de ácidos urônicos ou ainda outros resíduos negativamente carregados, formam complexos com os íons Fe^{3+} , provenientes da dissolução dos sulfetos minerais e presentes em solução, resultando em uma carga líquida positiva para as células. Assim, as EPS produzidas pelos micro-organismos parecem desempenhar um papel fundamental na biolixiviação de sulfetos minerais ao possibilitarem a adesão celular através de interações eletrostáticas entre as células carregadas positivamente através da formação do complexo EPS-íons Fe^{3+} com a superfície mineral.

Interações hidrofóbicas e ligações covalentes são mediadoras da adesão celular secundária à superfície mineral. Por exemplo, células bacterianas crescidas em enxofre elementar (S^0), o qual possui caráter hidrofóbico, não se aderem à pirita (FeS_2) e nem a resinas de troca catiônica. Este fato é

observado em consequência das EPS produzidas em S^0 apresentarem caráter hidrofóbico e composição diferenciada das EPS secretadas por bactérias crescidas em pirita ou sulfato ferroso (VERA *et al.*, 2013). Na presença de S^0 , não ocorre a presença de íons carregados positivamente, como íons Fe^{3+} , e somente as forças de atração do tipo van der Waals são relevantes no processo de adesão celular (GEHRKE *et al.*, 1998).

A adesão aos sulfetos minerais não ocorre aleatoriamente. Estudos de microscopia de força atômica (AFM), microscopia de epifluorescência (EFM) e de microscopia confocal a laser (CLSM) demonstraram que as células de *A. ferrooxidans* se aderem preferencialmente (>80%) a determinados locais na superfície mineral, os quais tendem a apresentar imperfeições visíveis. As imperfeições aumentam a área de contato, porém a adesão em áreas específicas na superfície do mineral também pode ser influenciada por desequilíbrios de carga criados em processos de oxidação. A aderência em áreas com baixo grau de cristalização também é favorecida, e as células sésseis parecem se orientar ao longo dos eixos cristalográficos em cuja direção podem propagar reações de oxidação (MANGOLD *et al.*, 2008; VERA *et al.*, 2013).

A seletividade no processo de adesão microbiana depende tanto das bactérias envolvidas quanto do substrato mineral utilizados no bioprocessamento. Dentre as principais cepas utilizadas na biolixiviação, a *L. ferrooxidans* exibiu maior força de adesão e maior ângulo de contato na presença da calcopirita em comparação com *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. A adesão desses micro-organismos encontra-se restrita às bordas ou defeitos nos minérios e é intermediada por interações químicas e biológicas, as quais incluem a quimiotaxia, a atividade

metabólica e a produção de EPS (BERRY *et al.*, 1978; WATLING, 2006). Em estudo posterior, imagens obtidas através de AFM demonstraram que a remoção de EPS da superfície das bactérias avaliadas é capaz de diminuir a força de adesão e, conseqüentemente, a ligação com a calcopirita (ZHU *et al.*, 2012).

A afinidade bactéria-substrato é outro fator que tem sido considerado para as bactérias lixiviantes, como a *A. ferrooxidans*. Este micro-organismo oxidante de ferro adere preferencialmente a substratos contendo íons ferrosos, como a pirita e calcopirita. Já os micro-organismos que não produzem EPS e não têm a mesma capacidade de utilizar espécies iônicas de ferro como fonte de energia não aderem a esses substratos pois sua adesão é mediada apenas por interações hidrofóbicas (OHMURA *et al.*, 1993; TAN & CHEN, 2012).

3.1 | Produção de EPS por Bactérias Lixiviantes

A adesão bacteriana sobre um substrato mineral estimula a secreção de EPS e a formação de biofilmes pelas bactérias lixiviantes, uma vez que as células planctônicas crescidas em substratos solúveis dificilmente são produtoras de EPS (VERA *et al.*, 2013).

A produção de EPS por *A. ferrooxidans* pode variar de acordo com o substrato utilizado. As células crescidas em sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), por exemplo, produziram menor quantidade de EPS em comparação com as células cultivadas na presença de pirita (FeS_2), nas quais a produção de EPS foi 13 vezes maior (GEHRKE *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram obtidos para a produção de EPS por outra cepa de *A.*

ferrooxidans, que foi cerca de 10 vezes maior na presença de pirita em comparação com os meios contendo íons Fe^{2+} (BELLENBERG *et al.*, 2012).

Além de serem as principais responsáveis pela adesão microbiana, as EPS apresentam também um papel secundário na concentração de nutrientes e íons. Em um estudo utilizando pirita intemperizada, Lara *et al.* (2010) constataram a formação de biofilme em monocamada pela bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* simultaneamente ao aumento na produção de EPS, a qual representou cerca de 90% do biofilme. A forte força de adesão (467 Np), resultante da irreversibilidade da ligação, e a produção de EPS permaneceram constantes mesmo após 5 dias de cultivo, sugerindo que as EPS garantiram um microambiente adequado para a sobrevivência celular mesmo após a depleção do S^0 .

Apesar de as bactérias utilizadas nos processos de biolixiviação serem autotróficas e sintetizarem seus componentes celulares a partir de CO_2 via ciclo de Calvin-Benson, estes micro-organismos incorporam pequenas quantidades de aminoácidos e monossacarídeos em suas EPS (BARRETO *et al.*, 2005; QUATRINI *et al.*, 2007). As EPS produzidas pela bactéria *A. ferrooxidans* são constituídas pelos monossacarídeos glucose, ramnose, fucose, xilose e manose, ácidos graxos saturados (C12-C20), ácido glucurônico e íons Fe^{3+} (BELLENBERG *et al.* (2012); VERA *et al.*, 2013). Geralmente, a fração lipídica é composta por cerca de 50% de ácido esteárico (C18) (GEHRKE *et al.*, 1998).

Independentemente da diferença quantitativa na produção, as EPS secretadas pelos micro-organismos envolvidos no mecanismo de biolixiviação apresentam composições químicas

semelhantes e consistem, basicamente, de açúcares e lipídios. A proporção destas moléculas nas EPS é que são passíveis de mudanças e sofre variações de acordo com o substrato utilizado e o tempo de biolixiviação (GIAVENO *et al.*, 2011). Em pirita, por exemplo, as EPS tendem a conter mais açúcares que lipídios (55:45) pelo caráter hidrofílico da superfície. Já em um ambiente hidrofóbico como o enxofre elementar, a proporção açúcares/lipídios muda para 40:60 (NÖEL *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2013).

A relação entre a composição das EPS e a interação micro-organismo/substrato mineral tem sido amplamente descrita na literatura. A superfície celular de *Metallosphaera hakonensis*, crescida em calcopirita, apresentou características hidrofóbicas quando comparada com os cultivos realizados na presença de Fe^{3+} ou S^0 (BROMFIELD *et al.*, 2011). Bellenberg *et al.* (2012) observaram que a produção de EPS por *A. ferrooxidans* crescidas em S^0 aumentou em comparação com a presença de íons Fe^{2+} . No entanto, estas EPS apresentaram um aumento das suas propriedades hidrofóbicas devido ao incremento do conteúdo em lipídios e ácidos graxos, os quais são responsáveis pela interação hidrofóbica com o S^0 .

Análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), absorção de raios-X e AFM têm demonstrado que as EPS bacterianas podem se ligar às superfícies minerais através de ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato presentes nas EPS e os grupos silanol neutros da sílica (Si-O-H) (KWON *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2012).

No caso da biolixiviação, o ácido glucurônico tem sido descrito como principal responsável na interação entre as bactérias lixiviantes e os sulfetos minerais. Estes derivados 6-carboxil da

glucose contêm grupos carboxílicos que se ligam às espécies iônicas de Fe^{3+} presentes em solução. A proporção de resíduos ácidos nos complexos EPS- Fe^{3+} formados é de 2 moles de ácido glucurônico para 1 mol de íons Fe^{3+} , resultando na carga positiva do biofilme que irá aderir ao sulfeto mineral carregado negativamente (SOLARI *et al.*, 1992; GEHRKE *et al.*, 1998).

3.2 | Interações EPS- Fe^{3+} na Dissolução dos Sulfetos Minerais

Os micro-organismos envolvidos na lixiviação microbiana tendem a se deslocar dentro do biofilme formado para a fase interfacial e desta para a superfície do minério. As regiões próximas à superfície mineral apresentam maiores concentrações de espécies iônicas Fe^{3+} e enxofre, facilitando a adesão microbiana pela formação de complexos com as EPS secretadas. Os complexos EPS- Fe^{3+} são resultantes da re-oxidação biológica dos íons Fe^{2+} formados durante a oxidação química do sulfeto mineral. Esta re-oxidação é mediada pela associação das EPS com citocromos e componentes redox da cadeia respiratória bacteriana situadas na membrana externa celular (BELLENBERG *et al.*, 2012).

As forças eletrostáticas, provenientes das cargas elétricas derivadas destes complexos presentes na superfície celular, em conjunto com as forças hidrofóbicas indicadas pelos ângulos de contato, induzem ao mecanismo de interação bactéria-minério favorecendo a manutenção da adesão celular (ZHU *et al.*, 2012; GOVENDER *et al.*, 2013).

A principal contribuição bacteriana no processo de biolixiviação de sulfetos minerais é a manutenção da concentração de espécies iônicas de ferro, em seu estado oxidado (Fe^{3+}), as

quais atuam como agente oxidante dos sulfetos promovendo a dissolução dos mesmos, conforme descrito anteriormente. Assim, a formação de complexos EPS-Fe³⁺ favorece não somente a interação bactéria-sulfeto mineral pela contraposição de cargas elétricas, como é fundamental para aumentar a área reacional do processo oxidativo que ocorre no espaço interfacial entre o micro-organismo e o minério.

O comportamento das bactérias aderidas é muito dependente da relação Fe³⁺/Fe²⁺ na camada de EPS, a qual, por sua vez, depende do potencial de oxi-redução (*Eh*) e da concentração de espécies iônicas de ferro em solução. Em sistemas de biolixiviação, a oxidação de íons Fe²⁺ é indicada pela elevação do potencial de oxi-redução, a qual assinala a dissolução dos sulfetos minerais e solubilização do metal de interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2013).

O bioprocesso é favorecido quando ocorre a manutenção das espécies iônicas de ferro no meio reacional. Pode se afirmar que a biolixiviação é, então, beneficiada pela existência de um espaço reacional interfacial bactéria-substrato onde há elevada concentração do agente oxidante na forma de complexos EPS-Fe³⁺ que favorece a solubilização dos metais de interesse através de reações oxi-redutivas.

Porém, os mecanismos de oxirredução envolvendo os complexos microbianos EPS-Fe³⁺ ainda necessitam de elucidção. Uma vez que a distância correspondente ao espaço entre a membrana celular e a superfície mineral é igual a no mínimo 2 nm, a redução dos íons Fe³⁺ poderia ocorrer por transferência eletrônica por tunelamento de elétrons (MEDVEDEV & STUCHEBRUKHOV, 2001). Os elétrons são

capazes de atravessar uma barreira de espécies iônicas ou moléculas, doadoras e receptoras de elétrons, e permanecerem com suas energias inalteradas.

Outra hipótese estudada é a menor estabilidade dos complexos formados pelos íons Fe^{2+} /ácido glucurônico em comparação com os complexos correspondentes EPS- Fe^{3+} (NIST, 2004). Os íons Fe^{3+} seriam reduzidos aos respectivos íons Fe^{2+} e liberados em solução, e os resíduos de ácidos urônicos remanescentes se ligariam a uma nova espécie Fe^{3+} estabelecendo um equilíbrio.

A capacidade de formação de complexos das EPS bacterianas com espécies iônicas em solução também tem sido utilizada para explicar a solubilização de íons Cu^{2+} a partir de sulfetos minerais como a calcopirita. Yu *et al.* (2013) observaram que a presença de íons Cu^{2+} estimulou a produção de EPS pela *A. ferrooxidans*, além de se ligarem, preferencialmente, aos sítios ativos destas EPS. A proporção de íons $\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ ligados às EPS diminuiu de 4:1 para 2:1 quando a concentração de íons Cu^{2+} em solução aumentou de 0,01 para 0,04 mol/L (YU *et al.*; 2013).

3.3 | A Atividade Microbiana no Processo de Biolixiviação

O crescimento e adesão das bactérias envolvidas na biolixiviação parecem estar diretamente relacionados com a adaptação destas culturas ao ambiente oxidativo deste bioprocessos. Durante a biolixiviação, a adesão celular gera um ambiente com alto *Eh* na interface minério-bactéria, o qual é favorável para a dissolução dos sulfetos minerais e solubilização das espécies metálicas. Como descrito anteriormente, esta região propícia para as reações de

oxi-redução é consequência da formação de complexos EPS-Fe³⁺ embebidos no biofilme, os quais promovem uma maior concentração das espécies Fe³⁺ que atuam como agentes oxidantes.

A adesão microbiana também favorece outro aspecto importante do crescimento microbiano caracterizado pela limitação de substrato. As células sésseis não estão sujeitas a esta limitação, e atuam disponibilizando substrato para as células planctônicas. Pakostova *et al.* (2013) observaram a interação entre a oxidação de S⁰ e células sésseis e planctônicas de *A. ferrooxidans*. Através de medidas de ATP e biomassa, concluiu-se que as bactérias aderidas à superfície mineral são as primeiras a oxidar o enxofre. Embora a proporção de células de *A. ferrooxidans* aderidas seja relativamente baixa em culturas crescidas em S⁰, acredita-se que o seu metabolismo seja muito importante no ataque a este tipo de substrato.

Uma maior eficiência dos processos de biolixiviação é alcançada com o uso de culturas mistas, em que o consórcio entre diferentes linhagens bacterianas pode atuar simultaneamente na solubilização dos sulfetos minerais e também prevenir a formação de camadas de passivação que tendem a prejudicar o processo biológico. Na ausência de bactérias oxidantes de enxofre, a lixiviação de sulfetos minerais por bactérias oxidantes de ferro podem resultar numa camada de enxofre elementar depositada sobre a superfície do minério. A oxidação desta camada pela adição de bactérias como a *A. thiooxidans* ou *Acidithiobacillus caldus* previne a formação da camada de passivação e aumenta o potencial da biolixiviação (DOPSON & LINDSTRÖM, 1999).

A interação entre as diferentes espécies microbianas nas culturas mistas presentes no processo de biolixiviação resulta no aumento da adesão celular destes micro-organismos, ocasionando o aumento da produção de EPS e das taxas de extração do metal de interesse. A bactéria *Leptospirillum* spp., por exemplo, promove a adesão de outras espécies formando biofilmes mistos (FLORIAN *et al.*, 2011). Culturas mistas de *L. ferriphilum* e *Acidithiobacillus caldus*, por exemplo, apresentam melhor adesão em pirita em comparação com suas culturas puras. Neste caso, a pré-colonização da superfície mineral pelas células de *L. ferriphilum* é a principal responsável pela formação do biofilme microbiano envolvendo as células *A. caldus*, micro-organismo não produtor de EPS (NOËL *et al.*, 2010).

As EPS são produzidas rapidamente pelas bactérias após a adesão celular; porém, estas substâncias não são eliminadas do sistema e compõem o biofilme microbiano formado no espaço interfacial entre a colônia bacteriana e o substrato mineral, mesmo nos estágios avançados de biolixiviação. Zeng *et al.* (2011) observaram que a adesão celular de termófilos moderados à superfície da calcopirita ocorre imediatamente ao contato inicial em conjunto com a produção de uma pequena quantidade de EPS. A produção destas substâncias extracelulares aumenta significativamente após o 4º dia, sendo continuamente acumuladas sobre a superfície do minério. A partir do 10º dia, tanto as células quanto a calcopirita se encontram totalmente recobertas por uma camada de EPS, na proporção de cerca de 76 mg de EPS por grama de minério.

Apesar de ser fundamental no processo de biolixiviação, o acúmulo de EPS pode causar um desequilíbrio na manutenção das espécies iônicas de ferro no meio reacional por complexar

os íons Fe^{3+} e colaborar na formação de precipitados insolúveis como a jarosita ($\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), causando a diminuição de espécies oxidantes de Fe^{3+} em solução e comprometendo a eficiência do bioprocesso (ZENG *et al.*, 2011).

Os estudos “*in situ*” da cinética de crescimento microbiano e consequente produção de EPS e formação de biofilmes durante o processo de biolixiviação são limitados, pois a reprodução em escala de bancada do processo de biolixiviação em pilha é restrita. As observações experimentais de crescimento, atividade e adesão microbiana no minério estão sujeitas diversas limitações, como a inexistência de um processo que garanta a esterilidade do minério e a pureza das culturas microbianas, bem como a falta de técnicas adequadas para a quantificação da dinâmica da população microbiana dentro da amostra mineral.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo biológico de lixiviação de sulfetos minerais ocorre naturalmente e tem sido utilizado desde épocas remotas. Devido ao esgotamento progressivo de jazidas minerais, a biolixiviação tem sido uma importante ferramenta para solubilização de metais de interesse a partir de substratos minerais e rejeitos com baixos teores nesses metais (<0,5%), uma vez que nestas condições a aplicação de processos convencionais, como a ustulação, torna-se inviável. O uso de micro-organismos capazes de solubilizar sulfetos minerais tem sido considerado uma alternativa por diversas mineradoras, em especial nos EUA e no Chile, onde estão as maiores reservas mundiais de minério de cobre. Porém, este processo biohidrometalúrgico ainda necessita ser aprimorado e seus mecanismos entendidos para que as extrações ocorram com máxima eficácia. Somente a partir da última década se iniciou a busca de conhecimento sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos da interação minério-bactéria, a fim de se esclarecer os mecanismos de ação microbiana na biolixiviação. O desenvolvimento de estudos buscando a elucidação do ciclo de vida microbiana e de como a energia de oxidação de íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre é mobilizada em benefício do seu metabolismo colaborando para a oxidação desses sulfetos é de fundamental importância para o aprimoramento do conceito da biohidrometalurgia extrativa do ponto de vista microbiológico e de sua aplicação biotecnológica eficaz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, J., ROJAS, J., AMARO, A. M., TOLEDO, H., JEREZ, C. A. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: comparison with the *Escherichia coli* chemosensory system. FEMS Microbiology Letters, vol. 96, nº 1, p. 37-42, 1992.
- AMARO, A. M., SEEGER, M., ARREDONDO, A., MORENO, M., JEREZ, C. A., 1993. The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids. In: TORMA, A. E., APEL, M. L., BRIERLEY, C. L. (Eds.), Biohydrometallurgical Technologies. The Minerals, Metals & Materials Society, p. 577-585.
- ARAÚJO, E. A., ANDRADE, H. J., CARVALHO, A. F., RAMOS, A. M., SILVA, C. A. S., SILVA, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. Química Nova, vol. 33, nº 9, p. 1940-1948, 2003.
- BARRETO, M., GEHRKE, T., HARNEIT, K., SAND, W., JEDLICKI, E., HOLMES, D., 2005. Unexpected insights into biofilm formation by *Acidithiobacillus Ferrooxidans* revealed by genome analysis and experimental approaches. In: HARRISON, S. T. L., RAWLINGS, D. E., PETERSEN, J. (Eds.), Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium. Compress, Cape Town, South Africa, p. 817-825.
- BELLENBERG, S., LEON-MORALES, C-F., SAND, W., VERA, M. Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy, vol. 129-130, nº 1, p. 82-89, 2012.
- BERNSTEIN, R., BELFER, S., FREGER, V. Bacterial attachment to RO membranes surface-modified by concentration-polarization-enhanced graft polymerization. Environmental Science Technology, vol. 45, nº 14, p. 5973-5980, 2011.

- BERRY, V. K., MURR, L. E., HISKEY, J. B. Galvanic interaction between chalcopyrite and pyrite during bacterial leaching of low-grade waste. *Hydrometallurgy*, vol. 3, n^o 4, p. 309-326, 1978.
- BEVILAQUA, D., LAHTI, H., SUEGAMA, P. H., GARCIA JR., O., CHIANG, Y. W., SANTOS, R. M., MONBALLIU, A., GHYSELBRECHT, K., MARTENS, J. A., MATTOS, M. L. T., VAN GERVEN, T., MEESCHAERT, B. Effects of bioleaching on the chemical, mineralogical and morphological properties of natural and waste-derived alkaline materials. *Minerals Engineering*, vol. 48, n^o 1, p. 116-125, 2013.
- BOS, R., VAN DERMEI, H.C., BUSSCHER, H.J., Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, n^o 2, p. 179-229, 1999.
- BROMFIELD, L., AFRICA, C.-J., HARRISON, S.T.L., VAN HILLE R.P. The effect of temperature and culture history on the attachment of *Metallosphaera hakonensis* to mineral sulfides with application to heap bioleaching. *Minerals Engineering*, vol. 24, p. 1157-1165, 2011.
- BRYNER, L. C., JAMESON, A. K. Microorganisms in leaching sulfide minerals. *Applied Microbiology*, vol. 6, n^o 1, p. 281-287, 1958.
- CHANDRAPRABHA, M. N., NATARAJAN, K. A. Role of outer membrane exopolymers of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in adsorption of cells onto pyrite and chalcopyrite. *International Journal of Mineral Processing*, vol. 123, p. 152-157, 2013.
- CHEN, Y-P., ZHANG, P., GUO, J-S., FANG, F., GAO, X., LI, C. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. *Chemosphere*, vol. 92, p. 633-638, 2013.
- CRUNDWELL, F. K. How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy*, vol. 71, p. 75-81, 2003.

- DIAO, M., TARAN, E., MAHLER, S., NGUYEN, T. A. H., NGUYEN, A. V. Quantifying adhesion of acidophilic bioleaching bacteria to silica and pyrite by atomic force microscopy with a bacterial probe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 115, p. 229-236, 2014.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infections Diseases Journal*, vol. 8, p. 881-890, 2002.
- DOPSON, M., LINDSTRÖM, B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, p. 36-40, 1999.
- DRESHER, W. H. Producing copper nature's way: bioleaching. Copper applications in mining & extraction. *Innovations*, 05/2004. Cooper Development Association Inc., 2004.
- EHRlich, H. L., NEWMAN, D. K. Geomicrobiology, 5ª edição, Editora CRC Press, Nova Iorque, 2009.
- FANG, L., CAO, Y., HUANG, Q., WALKER, S.L., CAI, P. Reactions between bacterial exopolymers and goethite: a combined macroscopic and spectroscopic investigation. *Water Research*, vol. 46, nº 17, p. 5613-5620, 2012.
- FLEMMING, H-C., NEU, T.R., WOZNIAC, D.J. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, vol. 189, p. 7945-7947, 2007.
- FLORIAN, B., NOËL, N., THYSSEN, C., FELSCHAU, I., SAND, W. Some quantitative data on bacterial attachment to pyrite. *Minerals Engineering*, vol. 24, p. 1132-1138, 2011.
- GEHRKE, T., TELEGDI, J., THIERRY, D., SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, p. 2743-2747, 1998.

- GIAVENO, M. A., URBIETA, M. S., DONATI, E. Mechanisms of bioleaching: basic understanding and possible industrial applications. In: SOBRAL, L. G. S., OLIVEIRA, D. M., SOUZA, C. E. G. Biohydrometallurgical processes: a practical approach. CETEM/MCTI, p. 27-38, 2011.
- GOVENDER, E., BRYAN, C. G., HARRISON, S. T. L. Quantification of growth and colonisation of low grade sulphidic ores by acidophilic chemoautotrophs using a novel experimental system. Minerals Engineering, vol. 48, p.108-115, 2013.
- HALAN, B., BUEHLER, K., SCHMID, A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. Trends in Biotechnology, vol. 30, p.453-465, 2012.
- HARNEIT, K., GÖKSEL, A., KOCK, D., KLOCK, J.H., GEHRKE, T., SAND, W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy, vol. 83, p. 245-254, 2006.
- JENKINSON, H.F., LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms adhere to stay. TRENDS in Microbiology, vol.9, n^o 1, p. 9-10, 2001.
- KWON, K.D., VADILLO-RODRIGUEZ, V., LOGAN, B.E., KUBICKI, J.D. Interactions of biopolymers with silica surfaces: force measurements and electronic structure calculation studies. Geochimica et Cosmochimica Acta, vol. 70, n^o 15, p. 3803-3819, 2006.
- LARA, R. H., GARCÍA-MEZA, J. V., GONZÁLEZ, I., CRUZ, R. Influence of the surface speciation on biofilm attachment to chalcopyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 97, p. 2711-2724, 2013.
- LI, Y. Q., WAN, D. S., HUANG, S. S., LENG, F. F., YAN, L., NI, Y. T. Q., LI, H. Y. Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence. Current Microbiology, vol. 60, p. 17-24, 2010.

- MANGOLD, S., LAXANDER, M., HARNEIT, K., ROHWERDER, T., CLAUS, G., SAND, W. Visualization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilms on pyrite by atomic force and epifluorescence microscopy under various experimental conditions. *Hydrometallurgy*, vol. 94, p. 127-132, 2008.
- MEDVEDEV, D., STUCHEBRUKHOV, A. DNA repair mechanism by photolyase: electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH⁻ to DNA thymine dimer. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 210, n^o 2, p. 237-248, 2001.
- NIST (2004) NIST critical selected stability constants of metal complexes database. NIST standard reference database 46, ver 8.0. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. http://www.nist.gov/srd/upload/46_8.htm.
- NOËL, N.; FLORIAN, B.; SAND, W. AFM & EFM study on attachment of acidophilic leaching organisms. *Hydrometallurgy*, vol. 104, p.370-375, 2010.
- OHMURA, N., KITAMURA, K., SAIKI, H. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n^o 12, p. 4044-4050, 1993.
- OLIVEIRA, D. M., SÉRVULO, E. F. C., SOBRAL, L. G. S., PEIXOTO, G. H. C. Biolixiviação: utilização de micro-organismos na extração de metais. Série de Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCT. 2010.
- PAKOSTOVA, E., MANDL, M., TUOVINEN, O. H. CELLULAR ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochemistry*, vol. 48, p.1785-1788, 2013.
- RAWLINGS, D. E. Microbially assisted dissolution of minerals and its use in the mining industry. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 76, p. 37-46, 2004.
- RENNER, L. D., WEIBEL, D. B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36, 347–355.

- RUIZ, L. M., CASTRO, M., BARRIGA, A., JEREZ, C. A., GUILIANI, N. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. Letters in Applied Microbiology, vol. 54, p. 133-139, 2012.
- SAND, W., GEHRKE, T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. Research in Microbiology, vol. 157, p. 49-56, 2006.
- SCHIPPERS, A. Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments, and soils. In: AMEND, J. P., EDWARDS, K. J., LYONS, T. W. Sulfur biogeochemistry - Past and present. Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 379, p 49-62, 2004.
- SOLARI, J. A., HUERTA, G., ESCOBAR, B., VARGAS, T., BADILLA-OHLBAUM, R., RUBIO, J. Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulphide mineral surfaces. Colloides and Surfaces, vol. 69, nº 2-3, p. 159-166, 1992.
- TAN, S. N., CHEN, M. Early stage adsorption behaviour of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on minerals I: An experimental approach. Hydrometallurgy, vol. 119-120, p. 87-94, 2012.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. 6ª edição, ARTMED Editora S. A. - Porto Alegre, 2003.
- VERA, M.; SCHIPPERS, A.; SAND, W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 97, p. 7529-7541, 2013.
- VU, B., CHEN, M., CRAWFORD, R. J., IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules, vol. 14, p. 2535-2554.

- WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy*, vol. 84, p. 81–108, 2006.
- WILLS, B. A., NAPIER-MUNN, T. J. *Mineral Processing Technology*, 7ª edição. Butterworth-Heinemann, Inglaterra, 2006.
- YU, R-I., LIU, J., CHEN, A., ZHONG, D-L., LI, Q., QIN, W-G., QIU, G-Z., GU, G-H. Interaction mechanism of Cu^{2+} , Fe^{3+} ions and extracellular polymeric substances during bioleaching chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC2370. *Transaction of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 23, p. 231-236, 2013.
- ZENG, W., TAN, S., CHEN, M., QIU, G. Detection and analysis of attached microorganisms on the mineral surface during bioleaching of pure chalcopyrite with moderate thermophiles. *Hydrometallurgy*, vol. 106, p.46-50, 2011.
- ZHAO, X-Q., WANG, R-C., LU, X-C., LU, J-J., LI, C-X., LI, J. Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, vol. 53, p.184-192, 2013.
- ZHU, J., LI, Q., JIAO, W., JIANG, H., SAND, W., XIA, J., LIU, X., QIN, W., QIU, G., HU, Y., CHAI, L. Adhesion forces between cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans* and chalcopyrite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 94, p. 95-100, 2012.

SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2010, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, mais de 200 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

STA-71 – **Avaliação de Emissões Radioativas em Rochas Ornamentais.** Yasmin Soares Gavioli, Julio Cesar Guedes Correia e Roberto Carlos Ribeiro.

STA-70 – **Utilização de Resíduos Oriundos do Corte de Mármore como Carga na Indústria de Papel.** Roberto Carlos da Conceição Ribeiro, Adriano Caranassios (*in memoriam*) e Beatriz Martins Morani, 2014.

STA-69 – **(Eco)toxicologia de Metais em Solos: Conceitos, métodos e interface com a geoquímica ambiental.** Ricardo Gonçalves Cesar, Zuleica Carmen Castilhos, Ana Paula de Castro Rodrigues, Edison D. Bidone, Silvia Gonçalves Egler e Helena Polivanov, 2014.

INFORMAÇÕES GERAIS

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ

Geral: (21) 3867-7222

Biblioteca: (21) 3865-7218 ou 3865-7233

Telefax: (21) 2260-2837

E-mail: biblioteca@cetem.gov.br

Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

NOVAS PUBLICAÇÕES

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.