# Isolamento de Microorganismos Acidofílicos Presentes em Sulfetos de Cobre, para Posterior Utilização em Processo de Biolixiviação

Letícia Sobral Maia
Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, Universidade da Cidade

Renata de Barros Lima
Orientadora, Química, M. Sc.

Luis Gonzaga Santos Sobral
Co-orientador, Eng. Químico, Ph.D.

## Resumo

Sulfetos secundário de cobre, tais como calcocita, digenita, bornita e covelita, geralmente são lixiviados muito mais facilmente que a calcopirita. No entanto, mesmo com estes sulfetos cobre, muitas vezes é necessário maior tempo de lixiviação para que sejam alcançados níveis elevados de extrações de cobre, utilizando bactérias mesófilas *Thiobacillus-Leptospirillum* que operam em temperaturas na faixa 35-45ºC.

A partir de uma amostra de um concentrado de flotação de sulfetos de cobre e de sua respectiva água ácida de mina, foram realizados diversos ensaios para o isolamento de microorganismos acidofílicos mesófilos, oxidantes de ferro e enxofre, visando uma posterior utilização da cepa isolada em processos de biolixiviação.

## 1. Introdução

A presença de metais pesados no ambiente representa uma séria ameaça ao próprio ambiente e a vida humana. Os metais pesados são geralmente liberados em conseqüência das atividades humanas, como a fundição, eliminação de metal em solo contaminado, indústrias de resíduos sólidos e águas residuais, e da utilização de pesticidas que contenham metais e Metalóides (Azabou *et al*, 2007).

Muitas bactérias acidofílicas oxidantes de ferros têm sido isoladas de ambientes ácidos tais como a drenagem ácida de minas (DAM), minas de carvão e a lixiviação de sulfetos minerais em pilha e em tanque. As bactérias mais estudadas são *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*, ambas em temperatura ambiente, que são quimioautotróficas e têm sido amplamente utilizadas no tratamento da DAM (Yabuuchi, & Imanaga, 1976), Biolixiviação (Schnell, 1997), remoção de ferro em efluentes de plantas hidrometalúrgicas e tratamento de águas residuais (Shiratori & Sonta, 1993).

## 2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo isolar microorganismos acidofílicos, mesófilos, a partir de um concentrado de flotação de sulfetos de cobre, visando posterior utilização dos mesmos em um processo de biolixiviação de sulfetos minerais para a recuperação de metal de interesse.

## 3. Revisão Bibliográfica

Em seu nicho ecológico natural, as bactérias acidofílicas estão constantemente expostas a diferentes concentrações de solutos e mudanças sazonais de temperatura. Assim, as bactérias nativas apresentam vantagem sobre uma coleção de cepas, pois já estão adaptadas às condições climáticas, a mineralogia e a composição química de minérios a serem tratados. Esta vantagem especial poderia levar a um aumento nos percentuais de extração de metais durante o processo de biolixiviação (Lavalle *et al* 2005)

### 3.1. Drenagem Ácida de Mina – DAM

Em todas as áreas do planeta, tanto de mineração profunda, quanto de superfície, na extração de minérios metálicos e carvão, resultam na contaminação do solo e / ou em águas superficiais (Johnson & Hallberg, 2003).

O mais bem documentado tipo de poluição da água associada à exploração mineira é a que resulta na aceleração da dissolução oxidativa de minerais expostos, principalmente sulfetos, dando origem ao ácido, águas enriquecidas com metal geralmente referido como "drenagem ácida de mina" (DAM) ou "drenagem ácida de rocha" (DAR). Resumidamente, os minerais, tais como pirita ($FeS_2$; o mais abundante de todos os sulfeto minerais) são quimicamente (e biologicamente) estáveis em situações onde tanto o oxigênio quanto a água são excluídos. No entanto, após a exposição a ambos e à umidade do ar (por exemplo, na seqüência da fratura e de fissuras dos sulfetos minerais e carvões), sulfetos minerais irão se oxidar espontaneamente, quer com o oxigênio molecular ou com o íon férrico agindo como o oxidante (por exemplo, reação 1):

$$FeS_2 + 6Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow 7Fe^{2+} + S_2O_3^{2-} + 6H^+ \quad (1)$$

#### 3.1.1. Fatores que Influenciam a Formação de Água Ácida de Mina

Uma gama de processos físicos, químicos e biológicos podem influenciar na geração de água ácida de mina. Esses fatores variam com a localidade e podem ser agrupados em controles primário, secundário e terciário (Ferguson & Erickson, 1988).

Os fatores primários estão diretamente envolvidos na geração dos produtos da oxidação de sulfetos (disponibilidade de água para o processo de oxidação e transporte; disponibilidade de oxigênio; características físicas do material; e, em menor escala, temperatura, pH, equilíbrio $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ e atividade microbiológica). Os fatores secundários consomem ou alteram esses produtos (presença de outros minerais capazes de neutralizar a acidez) e os fatores terciários são as condições físicas (materiais, topografia da área minerada, clima etc.) que influenciam a oxidação de qualquer sulfeto, o potencial de migração para o meio ambiente mais amplo, e consumo dos produtos de oxidação (Ferguson & Erickson, 1988).

### 3.2. Possíveis Microorganismos presentes em minérios e seus produtos

Em geral, os processos industriais de lixiviação operam naturalmente com microrganismos oriundos da água ácida de mina ou de qualquer outra fonte microbiana disponível. Isto significa que a população microbiana que

opera em um processo de lixiviação natural não tem características de cultura pura, embora as condições ambientais favoreçam o desenvolvimento, principalmente, de acidófilos como *Acidithiobacillus* e *Leptospirilum* (Norris, 1990).

Foi demonstrado que populações mistas de bactérias que oxidam ferro e enxofre (A. *ferrooxidans, L. ferrooxidans* e *A. thiooxidans)* estão presentes em sistemas de lixiviação natural, à temperatura ambiente, e são as principais responsáveis pela solubilização de minerais sulfurados (Norris, 1990).

Microorganismos procariontes que são metabolicamente ativos em ambientes extremamente ácidos (muitas vezes descrita como tendo um pH < 3) são amplamente distribuídos nos domínios Bacteria e Archaea. A diversidade fisiológica e filogenética dos microorganismos procariontes acidofílicos foram estudados em alguns artigos (Hallberg & Johnson, 2001).

As bactérias quimioautotróficas, gram-negativas e acidofílicas, do tipo *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*, anteriormente denominada *Thiobacillus ferrooxidans*) tem despertado grande interesse devido à sua utilização na indústria de processamento mineral e sua fisiologia incomum. *A. ferrooxidans* pode oxidar íon ferroso, enxofre elementar, seus compostos reduzidos e sulfetos minerais.

### 3.3. Atuação dos Microorganismos em processos de biolixiviação de sulfetos minerais

O papel das bactérias e arqueas oxidantes de ferro e enxofre na dissolução de sulfetos minerais é bem documentado, e é utilizado em "biolixiviação" (Rawlings, 2002), onde suas atividades facilitam a extração de ouro (o que ocorre com a oclusão de grãos finos em minérios refratários) ou na solubilização de metais comuns (tais como o cobre e o cobalto). Sulfetos minerais diferem na sua susceptibilidade à oxidação. Alguns (tais como a pirita) são oxidados por íon férrico e microorganismos procariontes acidofílicos oxidantes (por exemplo, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus* ("*At.*"). f*errooxidans*, *Acidimicrobium* ("*Am.*") *ferrooxidans*, *Sulfolobus metallicus*) têm um papel central na sua dissolução, em contextos ambientais e comerciais.

As características que fazem com que um organismo seja atuante na lixiviação/oxidação de um mineral são: a possibilidade de atuação numa faixa expandida de temperatura (de 30 a 70ºC), faixa de pH ácido (1,8 a 2,2) e alta relação dos íons $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ (Suzuki, 2001).Assim, as bactérias nativas apresentam vantagem sobre uma coleção de cepas, pois já estão adaptadas às condições climáticas, à mineralogia e à composição química de minérios a serem tratados. Metodologia

## 4. Metodologia

### 4.1. Concentrado de Flotação

O concentrado de sulfetos utilizado nos experimentos é resultado do processo de flotação de sulfetos de cobre a partir de um minério bruto da mineração subterrânea (minério primário). O concentrado de flotação de sulfetos de cobre, foco do estudo, contém cerca de 30% de bornita ($Cu_5FeS_4$) e 70% de calcopirita ($CuFeS_2$), resultado das operações de classificação granulométrica e separação em meio denso.

4.2. Água Ácida de Mina

A água ácida de mina, utilizada nos ensaios, foi coletada diretamente da mina de cobre da Mineração Caraíba, onde foi extraído o concentrado de flotação a ser biolixiviado. Esta água apresentou um pH $\cong$ 2,0 e foi preservada, por refrigeração, por no máximo 2 meses ou até o início de cada batelada de testes.

4.2.1. Quantificação Microbiana na Água Ácida de Mina.

Com o objetivo de quantificar as células de microorganismos oxidantes de ferro, supostamente existentes na água de mina, utilizada nos ensaios de biolixiviação, foram feitos ensaios utilizando a Norma CETESB / L5.217 *Thiobacillus* – Determinação do número mais provável (NMP) pela técnica de tubos múltiplos. O meio de cultura empregado neste ensaio foi o 9K ($(NH_4)_2SO_4$ – 3,0 g; $MgSO_4$ . $7H_2O$ – 0,5 g; $K_2HPO_4$ – 0,5 g; KCl – 0,1 g; $Ca(NO_3)_2$ – 0,01 g; $H_2SO_4$ 1N – 1 mL; $H_2O$ 700 mL e $FeSO_4$ . 7 $H_2O$ 44,22 g; $H_2O$ - 300 mL) (Garcia Jr., 1991) e o cultivo permaneceu por 21 dias em estufa com temperatura de 30ºC.

4.3. Preparo do Meio de Cultura:

O isolamento foi realizado utilizando o meio de cultura MKM 2x, como fonte de nutriente, cuja composição se faz em $(NH_4)_2SO_4$: 0,8 g/L, $MgSO_4$ : 0,8 g/L e $K_2HPO_4$ : 0,08 g/L; e TWEEN 80: 0,45 %(v/v) e, como fonte de energia, foram utilizados 33,3 g/L de $FeSO_4$ . 7 $H_2O$ e 1 g/L de $S^0$.

4.4. Procedimento do Isolamento:

Para o primeiro ensaio do processo de isolamento de microrganismos foram utilizados oito testes contendo 250 mL de volume. Destes, quatro empregaram o meio MKM 2x e quatro empregaram TWEEN 80 (surfactante químico), ambos divididos em 2,5 g e 5 g de concentrado de flotação.

As condições de ensaio foram mantidas em 150 rpm e temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), onde o ajuste do pH, seja este inicial ou ao longo do processo, não foi realizado.

O pH inicial dos testes foi em torno de 4,0 e a expectativa para replicação do processo é que este se reduza a 2,0 (Kumar *et al*, 2007). Ao alcançar tal resultado, cada um desses será duplicado nas mesmas proporções e os novos, utilizarão 5% (v/v) do ensaio anterior.

4.5. Propagação do Isolamento:

Para proceder ao isolamento, avaliou-se parâmetros como valores de pH e Eh, em relação ao tempo de reação. Esse procedimento teve por objetivo a verificação do crescimento dos microrganismos e posterior constatação da presença dos mesmos pela Câmara de *Thoma*.

Para a propagação utilizou-se 50% (v/v) de relação entre o meio de cultivo e o teste escolhido avaliando os parâmetros supracitados, sem o ajuste de pH, porém fazendo monitoramento diário do mesmo.

4.6. Quantificação de microrganismos

Esta câmara de quantificação microbiana é um compartimento de dimensões definidas: área de 0,0025 $mm^2$ e profundidade de 0,100 mm, dotado de divisões quadrangulares. Escolhe-se aleatoriamente um quadrante e conta-se o número de células.

4.7. Plaqueamento *"Spread Plate"* em Meio Sólido

Com o objetivo de determinar a presença de bactérias acidofílicas que oxidam ferro, supostamente existentes no concentrado de flotação utilizado no processo de isolamento de microrganismos, foi realizado um plaqueamento em meio de cultura sólido, utilizando agarose (0,9%). Essa técnica feita nos ensaios 2, 4, 6 e 9 do isolamento e teve como finalidade a detecção de microrganismos. Por só terem sido detectados microrganismos nos ensaios 6 e 9, os procedimentos detalhados a seguir serão referentes a eles.

Em ambiente asséptico, foram preparados dois meios de cultura para proceder ao plaqueamento, com a finalidade de isolamento de colônias contendo microorganismos oxidantes de ferro e enxofre. Portanto, $FeSO_4$ (33,3 g/L) e $Na_2S_2O_3$ (1 g/L de S), foram adicionados à solução de nutrientes em separados, mantendo o pH dessa igual a 1,8. Alíquotas de 0,1 mL de cada solução dos testes foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MKM solidificado, onde com auxílio de uma alça de Drigalsky cada alíquota foi espalhada/rasqueada.Todo o procedimento do plaqueamento foi feito em duplicata e os cultivos permaneceram por cerca de 7 dias em estufa com temperatura de 30ºC.

## 5. Discussão de Resultados

5.1. Quantificação Microbiana na Água Ácida de Mina.

Este ensaio foi realizado por três vezes consecutivas, porém os resultados não foram coerentes com o exposto na Norma CETESB / L5.217, já que após 21 dias as soluções deveriam apresentar coloração "vermelha acastanhada". Nos ensaios realizados encontramos uma coloração alaranjada, como pode ser visto na Figura 1, em todas as diluições, invalidando, assim, os ensaios.

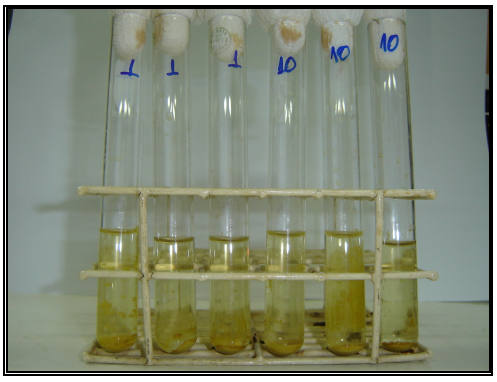


Figura 2. Teste realizado seguindo a Norma CETESB / L5.217 *Thiobacillus* – Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos.

5.2. Detecção de microorganismos nos isolamentos

Para o processo de propagação do Isolamento, foi escolhida a rota que apresentasse os maiores valores de potencial redox (Eh). Tendo por base parâmetros, como os valores de pH e Eh, foi selecionado o teste onde o meio de cultura MKM foi utilizado, com a relação sólido/líquido de 5g/L. Na Tabela 1, abaixo, podem ser observadas as médias dos valores dos parâmetros mencionados e o tempo de duração de cada ensaio.

Tabela 1. Acompanhamento dos parâmetros envolvidos nos ensaios de isolamento de microorganismos.

| Ensaios | MKM | | Tween | | MKM | | Tween | | MKM | | Tween | | Tempo (dias) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2,5 g/L | 5,0 g/L | 2,5 g/L | 5,0 g/L | $pH_i$ | $pH_f$ | $pH_i$ | $pH_f$ | $Eh_i$ | $Eh_f$ | $Eh_i$ | $Eh_f$ | |
| 1 | x | x | x | x | 2,7 | 2,2 | 2,3 | 2 | 600 | 660 | 600 | 660 | 43 |
| 2 | x | x | x | x | 2,7 | 2 | 2,7 | 2 | 590 | 720 | 590 | 680 | 70 |
| 3 | x | x | x | x | 2 | 2 | 2,2 | 2,2 | 720 | 820 | 670 | 720 | 32 |
| 4 | x | x | x | x | 1,9 | 1,9 | 2,2 | 2,1 | 770 | 840 | 610 | 640 | 21 |
| 5 | x | x | | | 1,8 | | | | 850 | | | | 11 |
| 6 | | x | | | 2 | 1,6 | | | 800 | 850 | | | 6 |
| 7 | | x | | | 1,8 | | | | 860 | | | | 4 |
| 8 | | x | | | 1,8 | | | | 640 | | | | 3 |
| 9 | | x | | | 2 | 1,8 | | | 850 | 870 | | | 8 |
| 10 | | x | | | 1,5 | | | | 880 | | | | 3 |

A partir do ensaio 6, foi observado, o tempo de oxidação dos íons ferrosos, presentes no meio de cultura, detectado pela mudança de coloração (de amarelo ao castanho avermelhado). Onde, por meio de plaqueamento *"Spread Plate"* , foi possível observar a presença de colônias características de microorganismos acidofílicos mesófilos oxidantes de ferro, como por exemplo, *A. ferrooxidans* ou *L. ferrooxidans*, apenas nos ensaios 6 e 9.

5.2.1. Quantificação Microbiana Utilizando Câmara de *Thoma*

A Tabela 2 mostra a evolução e a confirmação da presença de microorganismos nos ensaios mencionados.

Tabela 2. Quantificação, em número de célula por mL (cel/mL), utilizando câmara de Thoma

| Ensaios | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MKM (5,0 g/L) | $1{,}55 \times 10^7$ | $1{,}88 \times 10^7$ | $3{,}58 \times 10^7$ | $7{,}25 \times 10^7$ | $3{,}78 \times 10^7$ | $7{,}65 \times 10^7$ | $3{,}85 \times 10^7$ |

## 6. Conclusões

A partir dos ensaios realizados, concluiu-se que devido á localidade da mineração, onde foi coletada a água ácida de mina (norte da Bahia), pela ausência de chuva e o valor de pH (pH=4,0), não foi detectada a presença de microorganismos na mesma. Entretanto, o concentrado de flotação mostrou-se uma boa fonte microbiana, como pode ser observado na Tabela 2, onde dos 10 ensaios realizados, 7 detectaram a presença de microorganismos com características daqueles que oxidam ferro.

## 7. Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Renata de Barros Lima e Luis Gonzaga Santos Sobral pelo apoio e incentivo; ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica/CNPq, pela bolsa concedida e a todos do Centro de Tecnologia Mineral que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## 8. Referências Bibliográficas

AZABOU, S.; MECHICHI, T.; PATEL, B.; SAYADI, S. Isolation and characterization of a mesophilic heavy-metals-tolerant sulfate-reducing bacterium *Desulfomicrobium* sp. from an enrichment culture using phosphogypsum as a sulfate source. Journal of Hazardous Materials, v.140, p. 264–270, 2007.

FERGUSON, K. D.; ERICKSON, P. M. In: W. Salomons & U. Forstner, Springer-Verlag. Pre-Mine Prediction of Acid Mine Drainage in Environmental Management of Solid Waste. Berlin, 1988.

GARCIA Jr., O. Isolation and Purifications of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some Coal and Uranium Mines of Brazil. Rev. Microbiol., São Paulo, 22 (1), p.1-6, 1991.

HALLBERG, K. B; JOHNSON, D. B. Biodiversity of acidophilic microorganisms, Adv. Appl. Microbiol., v.49, p. 37–84, 2001.

KUMAR, R.N.; NAGENDRAN, R. Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans.* Chemosphere, v. 66, p. 1775-1781, 2007.

NORRIS, P. R. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulfide oxidation. Microbial Mineral Recovery, New York, McGraw-Hill, p. 3-27, 1990.

LAVALLE, L.; CHIACCHIARINI, P.; POGLIANI, C.; DONATI, E. Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. Process Biochemistry, v. 40, p. 1095–1099, 2005.

RAWLINGS, D.E. Heavy metal mining using microbes, Annu. Rev. Microbiol. v. 56, p. 65–91, 2002.

SCHNELL, H. A. Bioleaching of copper, In Rawlings, D. E. (ed.), Biomining, theory, microbes and industrial process. Springer-Verlag, Berlin, 1997, p. 21–43.

SHIRATORI, T. AND SONTA, H. Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and $H_2S$ desulfurization. FEMS Microbiol. Rev., v. 11, p.165–174, 1993.

SUZUKI, I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. Biotechnology Advances, Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, v. 19, p. 119-132, 2001.

YABUUCHI, E.; IMANAGA, Y. Oxidation of ferrous ion in mine drainage by iron-oxidizing bacteria,. In Weiss, A. (ed.), World mining and metals technology. American Institute of Mining, Metallurgical, and Petroleum Engineers, New York, USA, 1976, p. 943–956.