

## Artigo Técnico

# Identificação de micro-organismos presentes em sistemas de biolixiviação de cobre a 35 e 50°C

*Identifying microorganisms related to copper bioleaching at 35 and 50°C*

Isabel Braga Rodrigues<sup>1\*</sup> , Larissa Azevedo Melgaço Silva<sup>1</sup> ,  
Roberta D'Angelo Azevedo<sup>1</sup> , Renata Guerra-Sá Cota<sup>1</sup> , Versiane Albis Leão<sup>1</sup> 

## RESUMO

A biolixiviação de minérios de baixo teor e com elevado conteúdo de impurezas tem se mostrado alternativa importante para o aproveitamento destes, uma vez que a recuperação do metal por métodos pirometalúrgicos convencionais mostra-se economicamente inviável. A identificação e quantificação dos micro-organismos capazes de promover a biolixiviação mostram-se estratégicas para alcançar bons rendimentos no controle do processo e na recuperação de metais. Nesse sentido, as técnicas de biologia molecular são as ferramentas mais utilizadas para tal propósito. Este trabalho, utilizando técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e reação em cadeia da polimerase seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE), mostrou que a diversidade nas colunas de biolixiviação de cobre estudadas é baixa e que a temperatura é importante na manutenção de determinadas espécies, havendo predominância de *Acidithiobacillus ferroxidans* a 35°C e de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 50°C.

**Palavras-chave:** micro-organismos mesófilos; micro-organismos termófilos moderados; RNA ribossomal 16S.

## ABSTRACT

Bioleaching is an alternative to pyrometallurgy for the production of metals from low-grade ores containing high level of impurities, once that live pyrometallurgical methods are economically unfeasible. The quantification and identification of those microorganisms related to bioleaching is an important strategy for process control and thus metal recovery. In this regard, molecular biology is one of the main techniques utilized for such objective. This study applied PCR, RFLP and PCR-DGGE techniques to show that the microbial diversity in copper bioleaching columns under investigation is low and the temperature is important to define the species found, with predominance of *Acidithiobacillus ferroxidans*, at 35°C and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* at 50°C.

**Keywords:** mesophilic microorganisms; moderate thermophilic microorganisms; 16S ribosomal RNA.

## INTRODUÇÃO

Na biolixiviação induz-se intencionalmente, e de maneira controlada, a bio-oxidação de sulfetos metálicos de forma que se recupere seu conteúdo metálico. Atualmente, é uma técnica biotecnológica estabelecida (BOSECKER, 1997; OLSON; BRIERLEY; BRIERLEY, 2003), aplicada a sulfetos de cobre, zinco e cobalto (VIERA; POGLIANI; DONATI, 2007). Essa tecnologia é considerada uma opção de médio a baixo custo, ideal para o processamento de resíduos gerados pela atividade de mineração, cujo teor seja muito baixo para entrar no ciclo produtivo tradicional. Vantagens adicionais ao processo de biolixiviação são a não produção de dióxido de enxofre nem nenhum outro gás poluente e a baixa demanda energética (RAWLINGS, 2002).

A biolixiviação pode ser aplicada em tanques agitados ou em pilhas de minério e de rejeito (DOPSON *et al.*, 2008). Na biolixiviação em pilhas, o ar é soprado por debaixo delas, para garantir suprimento de oxigênio e CO<sub>2</sub> e, em alguns casos, nutrientes também podem ser adicionados à solução ácida que irriga a pilha, com o intuito de favorecer o crescimento microbiano (RAWLINGS, 2002). Em laboratório, as pilhas de biolixiviação são simuladas em colunas com leito formado pelo minério em estudo.

Os micro-organismos já caracterizados e que participam dos processos de biolixiviação são acidófilos e pertencem ao Domínio *Bacteria*. Os principais gêneros conhecidos são: *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* e *Sulfobacillus*. No entanto, micro-organismos do Domínio *Archaea* também são aplicados em ensaios de biolixiviação. Esses últimos são

<sup>1</sup>Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto (MG), Brasil.

\*Autor correspondente: isabelcristina.braga@gmail.com

Recebido: 11/06/2012 - Aceito: 19/07/2017 - Reg. ABES: 93582

capazes de viver em condições de temperatura e pH extremos (BATISTA, 2009) e são aeróbios ou anaeróbios facultativos. Os principais gêneros conhecidos são: *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfolobus* e *Ferroplasma*.

O conhecimento da estrutura e da funcionalidade das comunidades de micro-organismos presentes em sistemas de biolixiviação é importante para o controle do processo, permitindo melhorar a extração do metal de interesse (NORRIS, 2007). Nesse sentido, Demergasso et al. (2005) estudaram a comunidade microbiana de pilhas de biolixiviação de minério de baixo teor de cobre. Foram obtidos fragmentos gênicos 16S do RNA ribossomal (rRNA) para os domínios *Bacteria* e *Archae*. A análise pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*denaturing gradient gel electrophoresis* — DGGE) mostrou o aparecimento de poucas bandas, sugerindo baixa riqueza de espécies. Os resultados moleculares puderam definir três estágios de funcionamento das pilhas de acordo com os micro-organismos encontrados. No primeiro estágio, houve predominância de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, o que era condizente com as altas concentrações de ferro no início de operação das pilhas. Com a diminuição da disponibilidade de ferro e o aumento da concentração de sulfato e íons metálicos, ou seja, condições mais extremas, ocorreu predomínio de *Leptospirillum ferrooxidans*. Por fim, mudanças na temperatura da solução levaram ao predomínio de *Sulfobacillus sp.* e *Ferroplasma sp.*

Halinen et al. (2009a, 2009b) avaliaram o efeito do pH e da temperatura em colunas de biolixiviação para um minério complexo de níquel. A identificação da população microbiana por reação em cadeia da polimerase (PCR) e DGGE mostrou predominância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Lepstopirillum ferrooxidans* em todas as condições de pH, indicando que esse parâmetro não interferiu no perfil de microrganismos da operação. No entanto, foi clara a alteração da diversidade populacional quando diferentes temperaturas foram avaliadas. Houve predominância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 7°C, de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Lepstopirillum ferrooxidans* a 21°C, de *Lepstopirillum ferrooxidans* a 35°C e de *Sulfobacillus thermotolerans*

a 50°C. Os autores atribuíram a relevância de seus resultados ao fato de ser possível executar operações de biolixiviação em ampla faixa de temperatura, além da provável ocorrência de diferentes atividades microbianas nas diversas partes da pilha de biolixiviação, na qual a temperatura do interior é maior do que nas extremidades e no topo.

Nesse intuito, o presente trabalho caracterizou a diversidade de micro-organismos em colunas de biolixiviação de minerais de cobre.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

As amostras analisadas no presente trabalho foram coletadas em colunas de biolixiviação (10 cm diâmetro × 1 m comprimento) de duas amostras de minério sulfetado de cobre (denominados de minério rico — 0,9–1,43% de Cu — e minério pobre — 0,66–1,06% de Cu), nas quais estavam sendo avaliadas as variáveis temperatura (35 e 50°C), recirculação ou não de licor e adição de Al ao sistema (Tabela 1) — todas as colunas foram mantidas em pH 1,7±0,1. Detalhes sobre a construção das colunas e os meios de cultura utilizados podem ser encontrados em Rodrigues (2012). Inicialmente, as colunas a 35°C foram inoculadas com culturas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e as a 50°C, com culturas provenientes de cepas puras de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (DSMZ 9293). Foram recolhidas amostras do licor de lixiviação na base das colunas e suas características estão relacionadas na Tabela 1. A coleta foi feita no momento em que as colunas entraram em *steady state*, ou seja, estabilização do pH de saída do licor e observação de crescimento microbiano pela determinação do potencial de oxidação do meio (Eh).

### Extração de DNA genômico

As células microbianas foram recuperadas através de filtração, utilizando um conjunto de filtros com porosidades decrescentes, iniciando

**Tabela 1** - Descrição das colunas de biolixiviação (temperatura e pH de operação, material lixiviado e variável estudada) e das amostras coletadas para análise molecular (população e potencial eletroquímico).

Amostras	Código	Temperatura (°C)	Material lixiviado	Variável	População (10 <sup>6</sup> células.mL <sup>-1</sup> )	Eh (mV)
Coluna 2	C2	35	Minério pobre	Sem recirculação	34	650-6 90
Coluna 4	C4		Minério rico	Sem recirculação	18	550-690
Coluna 5	C5		Minério rico	Sem adição de Al	30	650-715
Coluna 6	C6		Minério rico	Referência*	32	650-715
Coluna 8	C8	50	Minério pobre	Sem recirculação	2	640-720
Coluna 10	C10		Minério rico	Sem recirculação	8	550-690
Coluna 11	C11		Minério rico	Sem adição de Al	5	650-720
Coluna 12	C12		Minério rico	Referência*	1	650-720

\*Coluna referência: contém minério sulfetado de cobre, há recirculação da solução lixiviada e adição de Al, na forma de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. O meio de cultura Norris foi utilizado em todas as colunas (RODRIGUES, 2012).

com 28 µm e finalizando o processo com membrana de celulose 0,22 µm (Millex, Millipore). As amostras foram exaustivamente lavadas com água destilada e solução de ácido sulfúrico 1,0 mol.L<sup>-1</sup> para remoção dos metais aderidos às células. As membranas contendo os micro-organismos foram cortadas em pequenos pedaços e transferidas para um tubo tipo *falcon* com 2 mL de tampão de lise (Tris 0,05 mM, pH 7,5, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1% de N-Laurilsarcosina) e o DNA genômico extraído pelo método brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para a avaliação da qualidade da extração, cerca de 5 µL do DNA genômico extraído foram analisados em gel de agarose a 0,6%, utilizando tris-base, ácido bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético (TBE) 0,5x como tampão de corrida. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1 µg/mL) e visualizados com auxílio de um transiluminador (Vilber Lourmat), sob luz ultravioleta (UV). O grau de pureza e a quantificação do DNA foram determinados em equipamento NanoDrop (Thermo Scientific).

### Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

Os *primers* utilizados neste estudo foram P2F: 5' GCAACCCTGACG AAGCAATG 3' e P2R: 5' GGGAATCGGAACA CAGGTGC 3' (AZEVEDO, 2008), referentes à espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, e SULFO170F — 5' CAATCCCGCATACTTCC 3' e SULFO1137R — 5' GAACCGCTGGCAACACAC 3' (DE WULF-DURAND; BRYANT; SLY, 1997), referentes à espécie *Sulfobacillus thermosulfidoxidans*. Foram utilizados 100 ng de DNA genômico para cada 50 µL de reação, utilizando kit Taq DNA Polimerase (Fermentas). Detalhes das reações de PCR estão descritos em Rodrigues (2012).

### Polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)

A técnica de RFLP foi utilizada na análise da população microbiana, por meio da comparação do tamanho dos fragmentos obtidos por PCR, digeridos com enzimas de restrição. Para determinação dos padrões de restrição para as espécies *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Sulfobacillus thermosulfidoxidans*, foi realizado um mapa de restrição virtual utilizando o programa Restriction Mapper Versão 3.0 ([www.restriction-mapper.org](http://www.restriction-mapper.org)). Esse padrão de restrição foi utilizado para confirmar a presença dessas bactérias sem a necessidade de sequenciamento.

As enzimas selecionadas foram *SacII*, *BamHI*, *SmaI* e *EcoRI* (Fermentas). As reações foram conduzidas conforme orientações do fabricante para cada enzima utilizada, com os produtos de PCR purificados. Em seguida, 5 µL do produto obtido foram analisados em gel de agarose 1,2%, utilizando TBE 0,5x como tampão de corrida. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1 µg.mL<sup>-1</sup>). O padrão

dos fragmentos foi analisado por comparação com um padrão de peso molecular de 1 kb (Fermentas).

### Reação em cadeia da polimerase-eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Foram utilizados os *primers* 968F — 5'-AACGCAAGAACCTTAC-3' com cauda CG na região 5' (5'-CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG-3') e 1392R — 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (NIELSEN *et al.*, 1999), específicos para os genes que codificam a região 16S rRNA do Domínio *Bacteria*. Após as reações de PCR, descritas por Rodrigues (2012), cerca de 5 µL dos produtos foram analisados em gel de agarose 1,2%, para verificação do tamanho dos *amplicons*, utilizando padrão de peso molecular 1 kb (Fermentas). Os géis foram corados com brometo de etídeo (1 µg.mL<sup>-1</sup>) e visualizados com auxílio de um transiluminador (Vilber Lourmat), sob luz UV. O restante da reação foi estocado a -20°C para análise por DGGE. Confirmada a presença de produtos de PCR pela eletroforese em gel de agarose, estes foram submetidos à técnica de DGGE, conforme descrito por Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993) e de acordo com as recomendações do sistema CBS Scientific EPS-30 II, modelo DGGE-2401. Os géis foram corados com nitrato de prata (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) ou com brometo de etídeo (1 µg.mL<sup>-1</sup>) e visualizados com auxílio de um transiluminador (Vilber Lourmat), sob luz branca ou UV, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos preliminares em erlenmeyers mostraram que os minerais sulfetados avaliados neste estudo possuem potencial para biolixiviação, alcançando 100% de extração de cobre utilizando as cepas estudadas. As análises de biologia molecular vêm, portanto, avaliar a manutenção dos micro-organismos inoculados nas colunas, uma vez que não houve esterilização das amostras e pode ter havido interação das bactérias inoculadas com a microbiologia original dos minérios.

O crescimento microbiano foi monitorado através da determinação do potencial eletroquímico (Eh). Os organismos mesófilos e termófilos moderados (35 e 50°C, respectivamente) são capazes de oxidar íons Fe(II) a Fe(III), utilizando a transferência de elétrons dessa reação para obtenção de energia (MADIGAN & MARTINKO, 2004). Dessa forma, as medidas do Eh da solução podem ser utilizadas para acompanhamento do crescimento bacteriano (Equação 1). Quanto maior a concentração de íon férrico em relação à concentração de íon ferroso, maior o Eh do sistema, ou seja, maior o potencial de oxidação e, conseqüentemente, maior a atividade bacteriana. As colunas foram consideradas inoculadas quando o Eh atingiu valores acima de 500 mV, o que foi confirmado pelos valores da população microbiana (Tabela 1), os quais são consistentes com a literatura (BOSECKER, 1997).

$$E_h = E_h^0 + 2,3RT \log \frac{[Fe(III)]}{[Fe(II)]} \quad (1)$$

Em que:

$E_h$  = potencial de oxidação da lixívia em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio;

$E_h^0$  = potencial padrão em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio;

R = constante universal dos gases ideais (1,987 cal/mol.K<sup>-1</sup>);

T = temperatura (Kelvin);

{Fe(III)} = atividade do íon férrico em mol.L<sup>-1</sup>;

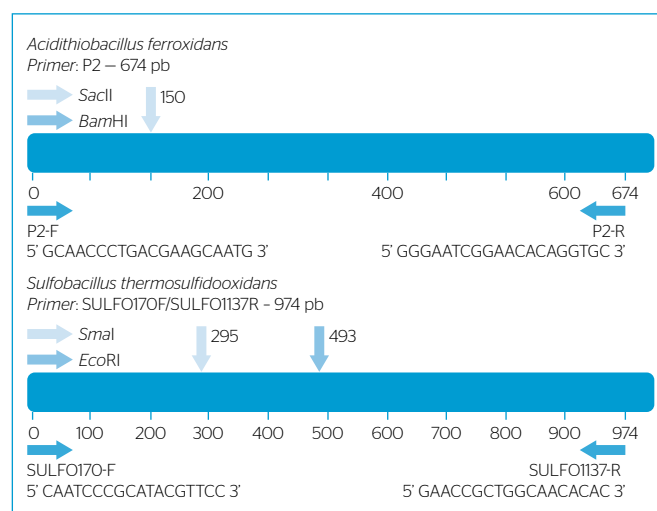
{Fe(II)} = atividade do íon ferroso em mol.L<sup>-1</sup>.

Por meio da técnica de PCR, foi possível amplificar os fragmentos do 16S rRNA das espécies de interesse neste estudo, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. A Figura 1 mostra os produtos obtidos nas reações de amplificação. O fragmento 16S rRNA de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi amplificado em alta temperatura de estringência (63°C) e o produto obtido se aproximou do esperado (674 pb); o mesmo aconteceu para o fragmento amplificado para *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: a 60°C, o produto obtido foi de aproximadamente 954 pb, como esperado (RODRIGUES, 2012).

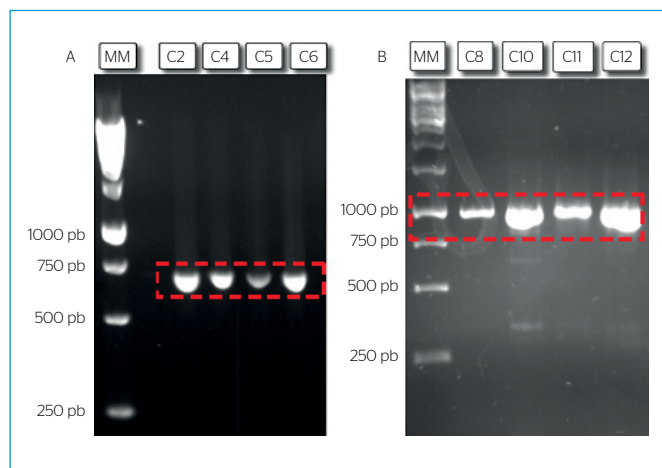
Para confirmação das espécies encontradas por meio da técnica de PCR, foi utilizada a técnica de RFLP, os padrões de restrição para as espécies *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* são mostrados na Figura 2. A confirmação das espécies por essa metodologia foi possível, pois o inóculo de *Acidithiobacillus* já havia sido sequenciado anteriormente (AZEVEDO, 2008) e o de *Sulfobacillus* foi gerado a partir do cultivo de cepa pura (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* DSMZ 9293). Não foram utilizados controles positivos, porém os fragmentos observados na Figura 3 são idênticos aos produtos esperados no mapa de restrição virtual, comprovando a presença de *Acidithiobacillus*

*ferrooxidans* nas colunas a 35° e de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* nas a 50°C, descritas na Tabela 1.

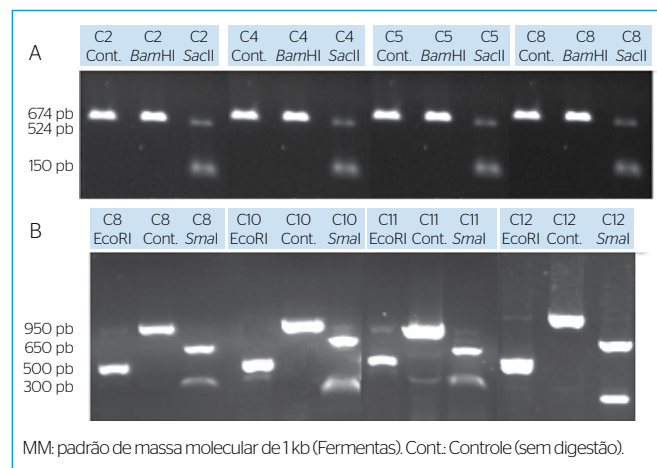
O uso da técnica de RFLP para amostras oriundas de processos de biolixiviação é descrito na literatura e os resultados mostram boa correlação entre si e com os obtidos neste trabalho (CHENG *et al.*, 2009; QIU *et al.*, 2011). Qiu *et al.* (2011) demonstraram, por análise de RFLP, que, em colunas de biolixiviação, tratando minério de urânio de baixo teor, houve predominância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* na solução rica. Por outro lado, Cheng *et al.* (2009), estudando a biolixiviação de escória metalúrgicas, contendo Pb e Zn, analisaram as características de bactérias termófilas moderadas utilizando a técnica



**Figura 2** - Mapa de restrição virtual construído a partir do programa Restriction Mapper. As setas indicam os sítios de clivagem das enzimas *SacII*, *SmaI* e *EcoRI* nas sequências correspondentes ao gene 16S rRNA de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Não há sítios para a enzima *BamHI*, utilizada como controle.



**Figura 1** - Produtos de PCR obtidos para os primers correspondentes aos gêneros *Acidithiobacillus ferrooxidans* (A) e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (B). Os códigos das amostras se encontram na Tabela 1.

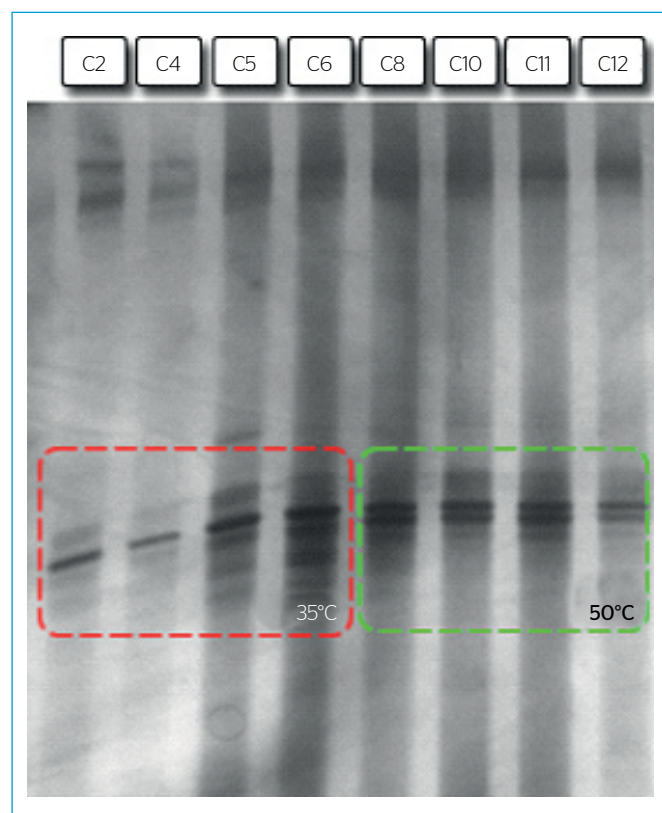


**Figura 3** - Análise do perfil de restrição obtido para os fragmentos 16S rRNA amplificados de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (A) e de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (B). Os códigos das amostras se encontram na Tabela 1.



de RFLP, encontrando basicamente bactérias do filo *Firmicutes*, sugerindo a presença de *Sulfobacillus*.

A análise de PCR, utilizando *primers* específicos e dos fragmentos de restrição, confirma a presença das espécies inicialmente inoculadas nas colunas de biolixiviação, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. No entanto, como dito anteriormente, as amostras minerais não foram esterilizadas e a possibilidade de outros organismos terem sido selecionados não poderia ser descartada. Dessa forma, optou-se pela análise de PCR-DGGE utilizando *primers* universais para *Bacteria* (968F-CG/1342R) capazes de detectar todas as bactérias que representam mais de 1% do total presente nas colunas (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Como esperado, as amostras correspondentes às colunas mantidas a 30 e 50°C mostraram boa amplificação com o *primer* do grupo *Bacteria*, obtendo-se produto típico de 400 pb (RODRIGUES, 2012). Esses produtos amplificados foram submetidos à DGGE, a fim de separar os diferentes fragmentos de DNA presentes nas amostras, e o resultado é mostrado na Figura 4. Como destacado nela, o resultado



**Figura 4** - Padrões de bandas representantes das comunidades dos consórcios de bactérias obtidos a partir de eletroforese em gel com gradiente desnaturante com gradiente de desnaturação de 40 e 60% para as amostras provenientes das colunas de biolixiviação. 12 µL da reação em cadeia da polimerase com o *primer* universal 968F-CG/1392R foram aplicados no gel e, após corrida a 100 V por 16 horas, este foi corado com nitrato de prata. Os códigos das amostras se encontram na Tabela 1.

da PCR-DGGE mostrou pequeno número de bandas, o que sugere baixa diversidade entre as amostras e que o perfil de bandas é praticamente idêntico para as colunas que operam na mesma temperatura, indicando que as diferentes condições operacionais não afetaram as populações presentes nas colunas.

Os resultados obtidos neste trabalho são coerentes com a literatura. Batista (2009) estudou a diversidade de micro-organismos em colunas de biolixiviação operando a temperatura ambiente e com leito formado por minerais de níquel. A amplificação do 16S rRNA com *primer* universal para o Domínio *Bacteria* foi bem-sucedida e resultou em *fingerprints* de DGGE reproduzíveis, mas também com pequeno número de bandas, e o sequenciamento delas mostrou predominância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*. De forma similar, Demergasso *et al.* (2005) estudaram a comunidade microbiana de pilhas de biolixiviação de minério de baixo teor de cobre e os perfis de DGGE também mostraram o aparecimento de poucas bandas, sugerindo baixa riqueza de espécies. Dependendo da composição química da solução rica e da temperatura, foram identificados *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*, e o aumento da temperatura da solução levou ao predomínio de *Sulfobacillus sp.* e *Ferroplasma sp.* Por último, Halinen *et al.* (2009b) estudaram sistemas de biolixiviação em pilhas de minérios de níquel também encontrando baixa riqueza de bandas. Em baixa temperatura (7°C), houve predomínio apenas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, enquanto a 21 e 35°C essa espécie juntamente com *Leptospirillum ferrooxidans* foram as mais abundantes. A 50°C houve predomínio de *Sulfobacillus*.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste trabalho, é possível concluir que, para as colunas de biolixiviação de minérios sulfetados de cobre analisadas, independentemente do tipo de minério utilizado e das condições operacionais, a diversidade populacional é pequena e modulada pela temperatura. Na faixa de 35 a 40°C, há predomínio de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Quando a temperatura aumenta para valores em torno de 50°C, organismos do gênero *Sulfobacillus* passam a ser mais abundantes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Financiador de Inovação e Pesquisa (FINEP) e à Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), o apoio financeiro. À Vale. Ao CNPq, as bolsas de Produtividade em Pesquisa (PQ) de VA Leão e RGS Cota.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, R.D.A. (2008) *Identificação da Diversidade Microbiana em Reatores de Biolixiviação*. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- BATISTA, L.A. (2009) *Análise das Comunidades Microbianas Presentes em Depósitos de Minerais Sulfetados com Ocorrência de Drenagens Ácidas de Minas e em Sistemas de Biolixiviação*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- BOSECKER, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3-4, p. 591-604. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00340.x>
- CHENG, Y.; GUO, Z.; LIU, X.; YIN, H.; QIU, G.; PAN, F.; LIU, H. (2009) The bioleaching feasibility for Pb/Zn smelting slag and community characteristics of indigenous moderate-thermophilic bacteria. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 10, p. 2737-2740. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.038>
- DE WULF-DURAND, P.; BRYANT, L.J.; SLY, L.I. (1997) PCR-mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2944-2948.
- DEMERGASSO, C.S.; GALLEGUILLOS, P.P.A.; ESCUDERO, G.L.V.; ZEPEDA ALVAREZ, V.J.; CASTILLO, D.; CASAMAYOR, E.O. (2005) Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, v. 80, n. 4, p. 241-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2005.07.013>
- DOPSON, M.; HALINEN, A.K.; RAHUNEN, N.; BOSTRÖM, D.; SUNDKVIST, J.E.; RIEKKOLA-VANHANEN, M.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. (2008) Silicate mineral dissolution during heap bioleaching. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 99, n. 4, p. 811-820. <https://doi.org/10.1002/bit.21628>
- HALINEN, A.-K.; RAHUNEN, N.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. (2009a) Heap bioleaching of a complex sulfide ore: Part I: Effect of pH on metal extraction and microbial composition in pH controlled columns. *Hydrometallurgy*, v. 98, n. 1-2, p. 92-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.04.005>
- HALINEN, A.-K.; RAHUNEN, N.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. (2009b) Heap bioleaching of a complex sulfide ore: Part II. Effect of temperature on base metal extraction and bacterial compositions. *Hydrometallurgy*, v. 98, n. 1, p. 101-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.04.004>
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. (2004) *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall. 1076p.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 695-700.
- NIELSEN, A.T.; LIU, W.T.; FILIPE, C.; GRADY JR., L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. (1999) Identification of a Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1251-1258.
- NORRIS, P.R. (2007) *Acidophile Diversity in Mineral Sulfite Oxidation*. África do Sul: Springer.
- OLSON, G.J.; BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L. (2003) Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, v. 63, n. 3, p. 249-257. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6>
- QIU, G.; LI, Q.; YU, R.; SUN, Z.; LIU, Y.; CHEN, M.; YIN, H.; ZHANG, Y.; LIANG, Y.; XU, L.; SUN, L.; LIU, X. (2011) Column bioleaching of uranium embedded in granite porphyry by a mesophilic acidophilic consortium. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 7, p. 4697-4702. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.038>
- RAWLINGS, D.E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 56, p. 65-91. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161052>
- RODRIGUES, I.C.B. (2012) *Métodos Moleculares Aplicados a Biotecnologias Relacionadas ao Ciclo do Enxofre*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. Nova York: Cold Spring Harbor.
- VIERA, M.; POGLIANI, C.; DONATI, E. (2007) *Recovery of zinc, nickel, cobalt and other metals by bioleaching*. Dordrecht: Springer. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7\\_5](https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7_5)

