



ESTUDO DA APTIDÃO DE MICRORGANISMOS AUTÓCTONES DE AMBIENTES MINEIROS NA RECUPERAÇÃO DE METAIS CRÍTICOS

FRANCISCA BARBOSA BRÁS

Dissertação submetida para satisfação dos requisitos do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA DE MINAS E GEO-AMBIENTE

Orientador Académico: Maria Cristina da Costa Vila
(Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia de Minas)

Coorientador Académico: Olga Cristina Pastor Nunes
(Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química e Membro Integrado do
Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia)

(OUTUBRO, 2017)

MESTRADO EM ENGENHARIA DE MINAS E GEO-AMBIENTE

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Rua Dr. Roberto Frias, s/n 4200-465 Porto; Portugal

VoIP/SIP: feup@fe.up.pt

ISN: 3599*654

Telefone: +351 22 508 14 00

Fax: +351 22 508 14 40

URL: <http://www.fe.up.pt>

Correio Eletrónico: feup@fe.up.pt

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição que seja mencionado o autor e feita referência a Mestrado em Engenharia de Minas e Geo-ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2017.

As opiniões e informações incluídas neste documento representam única e exclusivamente o ponto de vista do respetivo autor, não podendo o editor aceitar qualquer responsabilidade legal ou outra em relação a erros ou omissões que possam existir.

Este documento foi produzido a partir de versão eletrónica fornecida pelo respetivo autor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais estarei sempre grata.

Em primeiro lugar queria agradecer ao Nuno. A ti, antes de a quaisquer outros, devo um profundo agradecimento pelo modo como me aturaste e apoiaste e nunca me deixaste desistir.

À minha irmã Rita que sempre me inspirou a ser melhor.

À Ana Rosa, depressa te tornaste mais que uma amiga, obrigada pela tua amizade e apoio durante todos estes anos.

À Margarida Abreu, Alexandre Vasconcelos, Alberto Barros e Inês Vida Larga, obrigada pela boa disposição e pelo companheirismo ao longo de todos estes anos.

Muito especialmente, desejo agradecer à minha orientadora Prof. Maria Cristina da Costa Vila e coorientadora Olga Cristina Pastor Nunes pela disponibilidade, atenção dispensada e dedicação ao longo de todo este processo.

À Diana Madureira por toda a ajuda que foi crucial no desenvolvimento deste projeto.

À Rita Lopes, Sara Cunha, Patrícia Reis e Carla Pinto por me terem recebido no seu grupo de trabalho, e por toda a ajuda disponibilizada.

À Célia Ferreira, Patrícia Leitão, Carla Ferreira, Sílvia Faria e Paula Pinheiro pela atenção e disponibilidade.

Deixo uma palavra de apoio ao Departamento de Minas e ao Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto por me deixarem utilizar as instalações.

À empresa Beralt Tin & Wolfram e SOMINCOR, Sociedade Mineira de Neves-Corvo, S.A. pelas amostras gentilmente cedidas para o desenvolvimento deste trabalho de investigação.

Este trabalho teve o apoio financeiro da FCT/MEC com fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelos seguintes projetos:

- UID/ECI/04028/2013-CERENA,
- UID/EQU/00511/2013-LEPABE,
- ERA-MIN/0004/2015 Recognition of microbial functional communities and assessment of the mineralizing potential (bioleaching) for high-tech critical Metals – BioCriticalMetals.

A todos os outros que de uma maneira ou de outra me apoiaram durante estes anos.

E por fim, queria agradecer à minha mãe, foste sempre um modelo de coragem para mim.

RESUMO

A presente dissertação teve como objetivo a caracterização das comunidades bacterianas existentes em ambientes mineiros na tentativa de detetar e extrair metais críticos que são recursos minerais escassos com elevada importância, a partir de escombrelas e/ou de minérios de baixo teor. Como as bactérias quimio-organo-heterotróficas e quimio-lito-autotróficas envolvidas no processo de biolixiviação não são autóctones de um dos ambientes mineiros estudado, houve a necessidade de se produzirem culturas para a inoculação da amostra. Para tal, foram recolhidas amostras provenientes da mina de Neves Corvo. O caso de estudo foi desenvolvido a partir amostras representativas da fase inicial do processo da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo (Castro Verde, Beja) e amostras originárias dos resíduos da mina da Panasqueira (Barroca Grande).

A dissertação agora apresentada pode ser dividida em três partes. A primeira, essencialmente descritiva, onde se apresenta, nos capítulos 1 e 2 o enquadramento do tema, dos locais de aquisição das amostras utilizadas neste trabalho e do fenómeno de biolixiviação. A segunda parte deste documento, capítulos 3 e 4, reservou-se à descrição da metodologia experimental adotada e à interpretação dos resultados obtidos. A parte final deste trabalho descreve as conclusões obtidas, as perspetivas futuras, os objetivos realizados e a contribuição deste trabalho para futura investigação.

Inicialmente fez-se um estudo preliminar sobre a potencial aplicabilidade do processo de biolixiviação para a recuperação de metais existentes numa amostra proveniente da mina de Neves Corvo. Numa segunda fase o processo foi repetido utilizando amostras provenientes da mina da Panasqueira. Registou-se a evolução das concentrações de metais bem como a concentração de sulfatos ao longo de 32 dias de incubação.

Esta pesquisa justifica-se pela crescente necessidade da minimização de impactos ambientais causados pelos processos praticados pelo setor industrial extrativo, bem como a redução dos custos e do consumo energético destes processos.

Como objetivos específicos, os seguintes aspetos foram abordados:

- selecionar a(s) cultura(s) e amostra(s) a ser(em) utilizada(s);
- avaliar o processo de biolixiviação em biorreator e em balão de *Erlenmeyer*, utilizando distintas condições de operação, nomeadamente, o pH, o minério lixiviado e a temperatura;
- identificar os microrganismos envolvidos no processo de biolixiviação realizando testes bioquímicos e extração de ADN, aplicação da técnica de PCR, eletroforese em gel de agarose; purificação dos produtos de PCR e sequenciação dos mesmos.

A população microbiana presente na amostra em estudo foi capaz de lixiviar Zinco (Zn), Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Arsénio (As) e compostos de Enxofre, o que significa que poderá ser usada no futuro em processos de biolixiviação.

PALAVRAS-CHAVE: BIOLIXIVIAÇÃO; METAIS CRÍTICOS; COMUNIDADES BACTERIANAS, ADN, PCR.

ABSTRACT

The main objective of this dissertation was to characterize existing bacterial communities in indigenous environments of mining operations in an attempt to detect and extract critical metals that are rare mineral resources of high importance, from heaps and/or low-grade ores.

As the chemo-organo-heterotrophic and chemo-lithotro-autotrophic bacteria involved in the bioleaching process are not autochthonous of one of the mining environments studied, so it was necessary to produce cultures for the inoculation of the sample. For this, samples were collected from the Neves Corvo mine. The case study was carried out from samples representatives of the feed and waste from the Copper treatment plant of Neves Corvo Mine (Castro Verde, Beja) and from samples that came from the heap of the Panasqueira Mine (Barroca Grande).

The presente dissertation can be divided into three parts. The first one, essentially descriptive, presents in chapters 1 and 2 the framework of the theme, the places of acquisition of the samples used in this work and the phenomenon of bioleaching. The second part of this document, chapters 3 and 4, was devoted to the description of the experimental methodology adopted and the interpretation of the results obtained. The final part of this paper describes the conclusions reached, the future perspectives, the objectives accomplished and the contribution of this work for future research.

Initially, a preliminary study was carried out on the potential applicability of the bioleaching process for the recovery of existing metals in a sample from the Neves Corvo mine. In a second phase, the process was repeated using samples from the Panasqueira mine. The evolution of metal concentrations as well as sulfates was recorded over a 32-day incubation period.

This research is justified by the increasing need to minimize the environmental impacts caused by the processes practiced by the extractive industry, as well as the reduction of costs and the energy consumption of these processes.

As specific objectives, the following aspects were addressed:

- select the sample to be used;
- evaluate the bioleaching in a bio-reactor and in a *Erlenmeyer* flask, in different operating conditions, namely, different pH, leached ore and temperature;
- evaluate the process control parameters such as the pH of this system and the oxidation-reduction potential of the leachate during the bioleaching process;
- identify the microorganisms involved in the bioleaching process performing biochemical tests and DNA extraction, application of the PCR technique, electrophoresis in agarose gel; purification of the PCR products and sequencing thereof;

The microbial population present in the study sample was able to leach Zinc (Zn), Cadmium (Cd), Copper (Cu), Lead (Pb) and Arsenic (As) and Sulfur compounds, suggesting that it can be used in the future in bioleaching processes.

KEYWORDS: BIOLEACHING; CRITICAL METALS; BACTERIAL COMUNITIES; DNA; PCR.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações iniciais.....	1
1.2. Objetivo de estudo e planificação da dissertação.....	2
1.2.1. Objetivo de estudo.....	2
1.2.2. Organização do Trabalho.....	2
1.3. Enquadramento Geológico e Geográfico.....	3
1.3.1. Mina da Panasqueira.....	3
1.3.2. Mina de Neves Corvo.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. O processo de Biolixiviação.....	8
2.2. Cinética do crescimento bacteriano.....	9
2.3. Características dos microrganismos envolvidos no processo de biolixiviação.....	10
2.4. Aplicações industriais.....	11
2.5. Mecanismos de atuação de microrganismos.....	13
i) Mecanismo Direto.....	13
ii) Mecanismo Indireto.....	14
2.6. Fatores que afetam a atividade bacteriana durante a biolixiviação.....	14
2.7. Vantagens e Inconvenientes da biolixiviação.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Metodologia Experimental.....	18
3.1.1. Tarefas desempenhadas com as amostras sujeitas a espalhamentos em placa e das amostras sujeitas a ensaios de biolixiviação.....	19
3.2. Amostras minerais.....	20
3.2.1. Preparação das amostras para análise granulométrica e química.....	20
3.3. Preparação de meios de cultura.....	21
3.4. Enumeração dos organismos cultiváveis.....	21
3.5. Isolamento dos organismos cultiváveis.....	22

3.6.	Caracterização fenotípica dos isolados	22
3.7.	Identificação dos microrganismos através da sequenciação do gene rRNA 16S.....	24
3.8.	Amostras destinadas a Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S 25	
3.9.	Quantificação de ADN.....	25
3.10.	Técnica de PCR	26
3.11.	Eletroforese em gel de agarose.....	27
3.12.	Obtenção de Culturas de Inóculo	28
3.13.	Ensaio de Biolixiviação.....	31
3.14.	Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo	32
3.15.	Determinação da concentração de Metais dissolvidos	32
3.16.	Determinação da concentração dos Sulfatos em solução	33
4.	ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	35
4.1.	Caracterização das amostras	35
4.2.	Enumeração dos microrganismos cultiváveis	38
4.3.	Ensaio de Biolixiviação	44
4.3.1.3.	Amostras destinadas a Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S 47	
4.3.1.4.	Variação Temporal da Concentração de Metais	50
4.3.1.5.	Variação Temporal na Concentração de Sulfatos	51
4.3.1.6.	Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS)	52
4.4.	Ensaio de Biolixiviação em Reator e Matraz utilizando as amostras ALC17, BG17 e BG17_2	55
4.4.1.	Enumeração dos microrganismos cultiváveis	55
4.4.2.	Variação Temporal na Concentração de Metais.....	57
4.4.3.	Variação Temporal na Concentração de Sulfatos.....	63
4.4.4.	Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS)	65
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
6.	BIBLIOGRAFIA.....	71
7.	ANEXOS.....	77
	ANEXO I - Metodologia Experimental	77
i)	Amostras utilizadas ao longo do trabalho laboratorial	77
ii)	Preparação de meios de cultura.....	77
iii)	Preparação das culturas.....	78
iv)	Meios de cultura utilizados ao longo do trabalho laboratorial.....	84
	ANEXO II - Diagrama do Processo da Mina da Panasqueira	85
		85

ANEXO III - Diagrama do Processo da Mina de Neves Corvo.....	86
ANEXO IV – Placas de Petri da Cultura W com concentração 3075 μ M.....	87
.....	87
ANEXO V - Isolados da cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator.....	87
.....	87
ANEXO VI - Resultados da coloração Gram dos isolados identificados na cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator.....	88
ANEXO VII - Extração de ADN utilizando um kit de Extração.....	89
ANEXO VIII - Extração de ADN total.....	89
ANEXO IX - Amplificação por PCR.....	91
ANEXO X - Extração de ADN por fervura.....	91
ANEXO XI - Eletroforese em gel de agarose.....	91
ANEXO XII -Preparação das amostras para a análise SEM	92
ANEXO XIII – Resultados da Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa geológico simplificado de Portugal Continental com a localização da Mina da Panasqueira (Publicação integrada nas Comemorações dos 150 anos da criação da 1ª Comissão Geológica - IGM).	4
Figura 2 - Localização das escombreiras da mina da Panasqueira (Barroca Grande e Cabeço do Pião). Fonte: Google Earth.....	4
Figura 3 - Filão de quartzo sub-horizontal composto por Volframite, Pirite e Quartzo, encaixado em Xisto (Mina da Panasqueira, 2014).	5
Figura 4 - Vista aérea do Campo Mineiro de Neves Corvo. Fonte: Mindat. Disponível em: https://www.mindat.org/loc-14752.html	6
Figura 5 - Área ocupada pela Faixa Piritosa Ibérica com destaque para a localização da mina de Neves Corvo (Adaptado de Gabriel, J. 2012).	7
Figura 6 – Curva típica de crescimento celular – evolução do número de células viáveis em função do tempo.	10
Figura 7 - Esquema da metodologia experimental adotada neste trabalho.	19
Figura 8 - Moinho de anéis.	20
Figura 9 – Ilustração do resultado da Coloração de Gram, respetivamente bactérias gram-positivas (esquerda) e gram-negativas (direita).	23
Figura 10 – Esquema exemplificativo da preparação das culturas que serviram de inóculo aos ensaios de biolixiviação em reator e matraz.	29
Figura 11 – Curva granulométrica da fração fina da amostra ALC17.	36
Figura 12 – Curva granulométrica da fração fina após nova moagem da amostra ALC17.	36
Figura 13 - Curva granulométrica da fração fina da amostra BG17_2.	37
Figura 14 – Curva granulométrica da fração fina da amostra BG17.	37
Figura 15 - Evolução de log(UFC/mL) ao longo de 30 dias de cultura com pH ácido (Cultura A).	39
Figura 16 - Evolução de log (UFC/mL) ao longo de 7 dias de incubação com concentrações de W crescentes.	40
Figura 17 - Eletroforese dos produtos de ampliação do gene rRNA 16S dos isolados da cultura CM e da Cultura W: 1) ADN ladder, 2) R17TB1, 3) R17TB2, 4) R17TB3, 5) R17TB5, 6) R17TA3, 7) W17A1, 8) Controlo positivo, 9) Controlo negativo.	42
Figura 18 – Contagem das unidades formadoras de colónias log(UFC/mL) e variação do pH ao longo do 1º ensaio de biolixiviação utilizando a amostra ALC17.	44
Figura 19 - Eletroforese dos produtos da amplificação do gene 16S rRNA das amostras provenientes da mina de Neves Corvo. Legenda: 0: branco; 1: ADN Paste de 17.03.17; 2 – ADN Feed de 17.03.17; 3: ADN controlo positivo; PM; marcador de ADN.	48
Figura 20 - Representação gráfica da distribuição por géneros obtida pelo processo de Sequenciação por Illumina da amostra ALC17.	49
Figura 21 – Evolução temporal da recuperação de Zinco (Zn) ao longo do 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.	51
Figura 22 – Amostra original proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo (ALC17), dia 0 do 1º ensaio de biolixiviação em reator. Legenda: Z1 – Galena (PbS); Z2 – Pirite (FeS ₂); Z3- Cassiterite (SnO ₂) e Quartzo (SiO ₂); Z4 – Calcopirite (CuFeS ₂); Z5 – Quartzo (SiO ₂) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z6 – Pirite (FeS ₂) e Z7 - Galena (PbS).	52
Figura 23 - Amostra retirada ao 32º dia do ensaio de biolixiviação. Legenda: Z1 – Chumbo (Pb); Z2 – Pirite (FeS ₂); Z3 - Arsenopirite (FeAsS) e Calcopirite (CuFeS ₂) e Z4 – Chumbo (Pb) e Silicatos.	53
Figura 24 - Amostra proveniente da Barroca Grande (BG17). Legenda: Z1 – Blenda (ZnS); Z2 – Silicatos de alumínio, magnésio, potássio e ferro; Z3 – Calcopirite (CuFeS ₂); Z4 – Quartzo (SiO ₂) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z5 - Quartzo (SiO ₂) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z6 - Volframite ((Fe,Mn)WO ₄).	54
Figura 25 - Evolução de log(UFC/mL) e pH ao longo do ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.	55

Figura 26 - Evolução de log(UFC/mL), pH e fungos ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.	56
Figura 27 - Evolução de UFC/ml ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz (amostra BG17_2).	57
Figura 28 – Variação na recuperação de Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.	58
Figura 29 - Variação na concentração de Arsénio (As), Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.	60
Figura 30 - Variação na concentração de Arsénio (As), Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2.	62
Figura 31 – Variação da concentração de sulfatos ao longo dos ensaios de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17, em matraz utilizando as amostras BG17 e BG17_2 e respetivos controlos abióticos.....	63
Figura 32 - Amostra retirada ao final do ensaio de biolixiviação em matraz (ao fim de 32 dias). Legenda: Z2 – Arsenopirite (FeAsS) e Volframite ((Fe,Mn)WO ₄) e Z3 – Silicatos magnésio e alumínio e Arsenopirite (FeAsS).....	65
Figura 33 - Amostra retirada no final do ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 (ao fim de 32 dias). Legenda: Z1 – Calcopirite (CuFeS ₂); Z2 – Silicatos de alumínio e Z3 – Silicatos de alumínio e magnésio.....	66
Figura 34 - Placa de Petri com meio R2A agar destacando os 2 tipos de colónias de bactérias (B1 e B2) (diluição 10 ⁻¹)......	79
Figura 35 - Cultura em meio de cultura R2A agar, ampliação 100 x, diluição 10 ⁻⁵ e Cultura em meio de cultura DSMZ_71, ampliação 60 x, diluição 10 ⁻¹	80
Figura 36 – Resultados do teste Live/Dead da cultura inicial (esquerda) e da cultura transferida (direita). Diluição 10 ⁻¹	81
Figura 37 - Diagrama de processo do tratamento da mina da Panasqueira.	85
Figura 38 – Diagrama do processo de tratamento da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo.	86
Figura 39 - Ilustração das placas de Petri com a Cultura W com concentração de 3075 µM após um tempo de incubação de sete dias no meio de cultivo R2A agar (diluições 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ e 10 ⁻⁵).	87
Figura 40 - Ilustração das placas de Petri com os isolados formados após um tempo de incubação de sete dias no meio de cultivo R2A agar provenientes da cultura que serviu de inóculo ao 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.	87
Figura 41 – Ilustração do resultado da Coloração de Gram dos isolados da cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.....	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química das amostras proveniente da mina de Neves Corvo (ALC17) e das amostras provenientes da mina da Panasqueira (BG17 e BG17_2).	38
Tabela 2 - Caracterização dos isolados identificados na cultura de W com concentração 3075 µM de W.	41
Tabela 3 - Identificação das estirpes isoladas a partir da cultura W em comparação com a base de dados EzBioCloud em EzTaxon.	43
Tabela 4 - Caracterização dos isolados identificados no primeiro ensaio de biolixiviação.	45
Tabela 5 - Identificação das estirpes isoladas a partir da cultura CM17 utilizada no primeiro ensaio de biolixiviação em comparação com a base de dados EzBioCloud em EzTaxon.	46
Tabela 6 - Resultados da extração de ADN das amostras da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo recolhidas dia 17/03/17.	47
Tabela 7 - Resultado das análises químicas do primeiro ensaio do Reator (fase líquida).	50
Tabela 8 - Variação na concentração de sulfatos no 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.	51
Tabela 9 - Resultado das análises químicas do 2º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 (mg/l).	57
Tabela 10 - Resultado das análises químicas do 2º ensaio de biolixiviação em reator (Controlo abiótico).	58
Tabela 11 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.	59
Tabela 12 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17 (Controlo abiótico).	60
Tabela 13 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz (amostra BG17_2).	61
Tabela 14 - Concentração de Sulfatos nos ensaios de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17, a amostra BG17, amostra BG17_2 e nos ensaios de controlo abióticos.	63
Tabela 15 - Amostras utilizadas ao longo do trabalho experimental	77
Tabela 16 - Preparação das culturas utilizadas ao longo do trabalho experimental.	78
Tabela 17 - Caracterização dos isolados identificados na cultura constituída por 10 ml de RL16 e 20 ml de meio DSMZ_71.	80
Tabela 18 - Descrição das culturas preparadas com amostras da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo (ALC16 e RLC16).	82
Tabela 19 - Descrição dos isolados identificados na cultura constituída por amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.	83
Tabela 20 - Descrição do tipo de bactérias presentes na primeira transferência da cultura preparada com a amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.	83
Tabela 21 - Caracterização do tipo de isolados presentes na primeira transferência da cultura preparada com a amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.	83
Tabela 22 - Novas culturas constituídas por uma amostra proveniente dos rejeitados da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo, recolhida em junho de 2006.	84
Tabela 23 - Meios de Cultura sólidos utilizados ao longo do trabalho laboratorial.	84
Tabela 24 - Quantidade de reagentes necessários para a realização da técnica de PCR.	91
Tabela 25 - Preparação do fixativo de glutaraldeído usado para preparar as amostras para a análise SEM.	92
Tabela 26 - Dados relativos ao processo de sequenciação da amostra ALC17.	94
Tabela 27 - Dados relativos ao processo de sequenciação da amostra ALC17.	95

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

ATP – Trifosfato de Adenosina

BSA - Bovine Serum Albumin

CXG – Complexo Xisto Grauváquico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDM – Empresa de Desenvolvimento Mineiro, SA.

FPI – Faixa Piritosa Ibérica

LEPABE - Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy

pb – pares de bases

PCA – Plate Count Agar

PCR - Polymerase Chain Reaction

ZCI – Zona Centro Ibérica

ZSP – Zona Sul Portuguesa

UFC – Unidade Formadora de Colónias

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

A exploração mineira tornou-se mais evidente a partir da Primeira Revolução Industrial (final do século XVIII, início do século XIX), quando a produção em massa intensificou a extração de minérios para abastecer a crescente indústria. Com o crescimento demográfico houve a necessidade de se retirar da natureza um volume cada vez maior deste tipo de recursos. Na extração mineira um elevado volume de material é extraído e o material rejeitado (ganga) é também produzido em quantidades elevadas. Este material é depositado em escombrelas e caso não seja tratado pode causar graves problemas ambientais. Por outro lado, estes resíduos podem conter teores relativamente altos de metais com grande valor económico que na altura da sua exploração foram ignorados porque não continham interesse económico, mas à luz da economia atual o seu reprocessamento pode ser uma alternativa a considerar.

A microbiologia estuda os microrganismos que existem como células únicas ou como grupos de células, e os vírus, viróides e príões (estruturas não celulares e infecciosas). Embora sem cariz taxonómico, as células microbianas são divididas em dois grandes grupos, dependendo da ausência (procariotas) ou presença (eucariotas) de um núcleo bem definido. Estes organismos são muito diversos e distribuem-se pelos três grandes domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*). Todos os organismos dos dois primeiros domínios são procariotas, enquanto os do último domínio, como o nome indica, são eucariotas. Os microrganismos eucariotas incluem os fungos, os protozoários e as algas microscópicas. Por apresentarem dimensões muito reduzidas, apenas podem ser observados por microscopia (Madigan, T., *et al.*, 2009). O objetivo da microbiologia é compreender como os microrganismos funcionam, de modo a explorar os aspetos benéficos da sua atividade e prevenir os seus aspetos negativos. A microbiologia tem fornecido muitos dos modelos biológicos e ferramentas para entender a natureza dos processos biológicos e trata de muitos problemas práticos relacionados com o Ambiente, Agricultura, Medicina, Indústria, entre outros. Os microrganismos encontram-se na natureza e existem em todo o tipo de habitats caracterizados pelas mais diversas condições.

Nas escombrelas desenvolvem-se comunidades bacterianas específicas de acordo com as condições do local onde se inserem. Através do estudo do material rejeitado é possível obter informações importantes acerca de metais existentes no local, que podem ser explorados para o seu possível aproveitamento utilizando métodos biológicos tais como a biolixiviação.

A lixiviação é o processo de extração de uma substância sólida através da sua dissolução num líquido, uma das variantes deste processo, a lixiviação bacteriana, é o tema tratado neste trabalho. A biolixiviação apareceu como um processo alternativo, mais económico e menos prejudicial ao ambiente. Esta investigação justifica-se pela necessidade de minimização de impactes ambientais causados pelo setor industrial extrativo, bem como a redução do consumo energético deste setor.

1.2. Objetivo de estudo e planificação da dissertação

1.2.1. Objetivo de estudo

A presente dissertação tem como objetivo o estudo de comunidades bacterianas autóctones provenientes de ambientes mineiros de modo a serem utilizadas em ensaios de biolixiviação. Pretende também avaliar o processo de biolixiviação como método de enriquecimento de rejeitados e/ou minérios de baixo teor provenientes de explorações mineiras.

Este trabalho foi elaborado focando-se na análise de amostras proveniente da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo, localizada no concelho de Castro Verde, distrito de Beja; e de amostras de resíduos da lavaria da mina da Panasqueira localizada no conselho de Covilhã. A caracterização destas duas minas será apresentada na secção seguinte do presente trabalho.

1.2.2. Organização do Trabalho

A metodologia adotada no presente trabalho resume-se muito sinteticamente a 5 capítulos distintos, a saber:

- Introdução, onde é apresentada a proveniência das amostras minerais que são sujeitas a ensaios de biolixiviação, com vista a recuperação de metais salientando o ambiente geológico em que as duas minas ocorrem;
- A Revisão Bibliográfica onde se apresenta um Estado da Arte tanto nos mecanismos de biolixiviação como na tecnologia associada;
- No terceiro capítulo – Materiais e Métodos, é apresentado, de uma forma sequencial, todo o trabalho laboratorial desenvolvido;
- No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos e faz-se a sua interpretação e discussão;
- O quinto capítulo – Conclusões e Desenvolvimentos Futuros, onde se apresentam as principais conclusões consequentes do trabalho desenvolvido bem como as limitações decorrentes deste trabalho apresentando-se eventuais recomendações futuras que digam respeito ao tema em investigação.

1.3. Enquadramento Geológico e Geográfico

1.3.1. Mina da Panasqueira

A Mina da Panasqueira é uma das maiores minas subterrâneas do mundo, com mais de 12 mil quilómetros de túneis e galerias. Começou a produção em 1898. O seu jazigo estende-se em profundidade de onde é extraído o tungsténio. A zona mineralizada tem dimensões de 2.500 metros de comprimento e varia em largura de 400 a 2.200 metros, atingindo a profundidade de 500 metros. Atualmente, a empresa exploradora é a Beralt Tin & Wolfram que emprega cerca de 380 pessoas (Mindat, 2017). *“Encravadas” em região serrana onde a agricultura é quase inexistente, pode-se afirmar que as Minas da Panasqueira têm contribuído em grande medida para o desenvolvimento e progresso da região, sendo que os dados estatísticos revelam que durante a II Guerra Mundial empregou 10 mil trabalhadores. Tudo leva a crer que a sua ação continuará a fazer-se sentir, contribuindo significativamente para a promoção social dos operários e famílias que ali trabalham.*” (Antunes, 2010). De acordo com a Beralt, a mina da Panasqueira possuía em dezembro de 2007 reservas de 1.4 Mt com um teor médio de 0.233% de WO_3 e reservas estimadas em 1.6 Mt com 0.224% de WO_3 (Lourenço, 2008).

“A mina da Panasqueira integra-se no Couto Mineiro da Panasqueira e localiza-se na região da Beira Baixa, a cerca de 30 km a WSW da cidade da Covilhã, entre os maciços de S. Pedro do Açor e da Gardunha, em plena Cordilheira Central (fig. 1)” (Gonçalves, 2016). O rio Zêzere passa a sul da mina, de onde é retirada a água que é utilizada na lavaria. Na fig. 2 é possível observar a localização das escombreiras da mina da Panasqueira de onde foram retiradas as amostras utilizadas no trabalho laboratorial.

Do ponto de vista geológico, a mina da Panasqueira situa-se na Zona Centro Ibérica (ZCI) nas Serras de Xisto do Centro de Portugal, do Maciço Hespérico a poente da depressão tectónica conhecida como “Cova da Beira” que corresponde a uma formação turbidítica e cuja idade é atribuída ao Pré-câmbrico superior (Gonçalves, A., 2016). Integram uma das províncias metalogenéticas estanho-volframíticas mais relevantes da Europa. Ocorrem diferenciações litológicas que caracterizam as formações xistentas, distinguindo duas variedades, nomeadamente xistos argilo-gresosos de cor cinzenta que passam frequentemente a um quartzito xistóide de cor mais clara e xistos argilosos de cor negra. *“Estas litologias variam entre arenitos lutíticos e arenitos e apresentam-se numa sequência, por vezes, constituindo lentículas alternantes (xistos listrados)”* (L. J. Ribeiro *et al.*, 2013). Estes terrenos correspondem a formações metassedimentares (xistos argilosos das Beiras) que integram o Complexo Xisto Grauváquico (CXG) da Zona Central Ibérica (ZCI), cuja idade é atribuída ao Paleozóico inferior (Gonçalves, A., 2016).

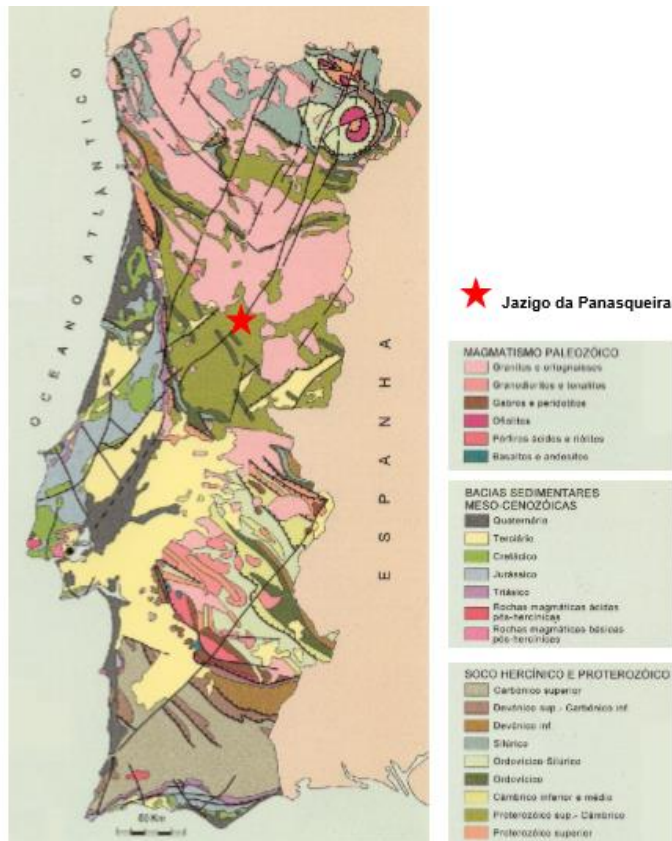


Figura 1 - Mapa geológico simplificado de Portugal Continental com a localização da Mina da Panasqueira (Publicação integrada nas Comemorações dos 150 anos da criação da 1ª Comissão Geológica - IGM).



Figura 2 - Localização das escombreiras da mina da Panasqueira (Barroca Grande e Cabeço do Pião). Fonte: Google Earth.

Na ZCI ocorrem importantes mineralizações de volfrâmio e estanho que se encontram normalmente associados ao contacto entre os granitos e metassedimentos (Gonçalves *et. al* 2016). A presença de granitos no subsolo resulta da proximidade desta zona ao Complexo Granítico Hercínico do Norte de Portugal. A Serra da Estrela constitui a principal massa granítica e que se relaciona com a instalação dos filões mineralizados na área mineira da Panasqueira. “A região é atravessada por uma série de falhas quase verticais nos sentidos N-S e NE-SW. Pensa-se que

estas falhas foram originadas por movimentos do tipo “strike-slip” durante o episódio Hercínico e reativadas durante a orogenia Alpina” (Gonçalves, 2016). Esta disposição filoniana (fig. 3) permitiu o desenvolvimento do tipo de desmonte utilizado na mina em questão, designado por *Câmaras e Pilares*. Neste tipo de desmonte o jazigo é escavado o máximo possível deixando partes do mesmo em forma de pilares de modo a suportarem o teto. A dimensão das câmaras e pilares depende de vários fatores tais como a estabilidade do teto e do jazigo, espessura do depósito e características da rocha envolvente. Normalmente os pilares são distribuídos num padrão quadrado ou circular. O minério que permanece nos pilares é considerado não recuperável apesar de se poder fazer a sua recuperação na fase final da mina, na conclusão das operações.



Figura 3 - Filão de quartzo sub-horizontal composto por Wolframite, Pirite e Quartzo, encaixado em Xisto (Mina da Panasqueira, 2014).

1.3.2. Mina de Neves Corvo

A entidade exploradora da mina de Neves Corvo é a empresa SOMINCOR (Sociedade Mineira de Neves Corvo, AS), fundada em 1980, empresa subsidiária integral do grupo Lundin Mining Corporation do Canadá. É uma mina subterrânea, de sulfuretos maciços vulcanogénicos polimetálicos. É a maior mina de Portugal sendo também considerada uma mina de classe mundial pelos seus teores anormalmente elevados em cobre, zinco e estanho. Segundo a empresa SOMINCOR (dados de 2015). Neves Corvo é atualmente o maior e mais importante projeto Português na Indústria Mineira. O jazigo mineral de sulfuretos maciços foi descoberto em 1977 através de trabalhos de pesquisa por um consórcio formado pela EDM (portuguesa/estatal), Peñarroya (espanhola) e BRGM (francesa), começando a exploração de cobre em 1984. Esta mina produziu cerca de 1 milhão de toneladas/ano de minério no ano de 1987.

Este é um dos mais gigantescos depósitos de sulfuretos maciços do mundo: “Esta mina é uma das maiores da Europa e a exploração é efetuada a um ritmo de 2.800.000 toneladas de minério por ano (dados de 2012). O crescente ritmo de produção, associado à redução dos teores de minério face aos registados no início da exploração, conduzem à constante necessidade de introdução de novos processos e tecnologias, com vista à otimização dos meios e a permitir que minérios com teores marginais possam ser explorados” (Gabriel, 2012). É constituída por 7 massas de sulfuretos polimetálicos: Neves, Corvo, Graça, Zambujal, Lombador (dividido em Norte, Sul e Este), Semblana e Monte Branco (SOMINCOR, 2017). Em 1990 inicia a produção de estanho, que termina em 2005. Em 2006 inicia a produção de zinco. Atualmente produz concentrados de cobre, zinco e chumbo (SOMINCOR, 2015).

Os métodos de desmonte utilizados baseiam-se no princípio do *Cut & Fill* (Corte e Enchimento). O suporte das paredes é feito pelo minério desmontado ou por material externo trazido para preencher os vazios (*rockfill*). É um método recomendado quando o minério e/ou estéril são pouco

competentes, o que limita a dimensão da escavação e permite pouco tempo entre a retirada do minério e a colocação do enchimento. Segundo a SOMINCOR, 2015: “*O material rochoso (rocha encaixante do jazigo) desmontado durante os trabalhos de desenvolvimento da infraestrutura da mina de Neves Corvo é designado por escombro. Uma parte do escombro produzido é extraída para a superfície, após britagem no fundo da mina, tendo uma granulometria de 0 a 200 mm. A restante é utilizada no fundo da mina para enchimento dos desmontes (rockfill). O escombro é constituído por rochas vulcânicas ácidas e alguns xistos negros, contendo sulfuretos disseminados*”. Na fig. 4 encontra-se uma imagem do Campo Mineiro de Neves Corvo.



Figura 4 - Vista aérea do Campo Mineiro de Neves Corvo. Fonte: Mindat. Disponível em: <https://www.mindat.org/loc-14752.html>.

No ano de 2014 os valores da produção da mina eram cerca de 3,6 Mton de minério extraídas e tratadas nas lavarias do Cobre e Zinco; 3,2 Mton de rejeitados produzidas no processo de concentração nas lavarias; 0,8 Mton reutilizadas para o enchimento dos desmontes; 2,4 Mton armazenadas na Instalação de Resíduos do Cerro do Lobo (total de 37,7 Mton) e 0,4 Mton de escombro extraídas (máximo anual 1,2 Mton em 2012) (Mindat, 2017). Segundo Martins, L. (2012), a viabilidade económica da mina de Neves Corvo está prevista até 2030 pelo que esta data pode-se prolongar caso sejam encontrados novos depósitos na zona.

Esta mina localiza-se na província do Baixo Alentejo, nos concelhos de Almodôvar e Castro Verde, distrito de Beja a cerca de 200 km a sul de Lisboa, situando-se na Faixa Piritosa Ibérica (FPI) (fig. 5). A Faixa Piritosa Ibérica é uma das maiores, mais estudadas e mais importantes concentrações minerais de sulfuretos maciços vulcanogénicos polimetálicos do mundo. As paragénese mais comuns encontradas na Faixa Piritosa Ibérica são: pirite, calcopirite, blenda, tetrahedrite, tenantite, galena e arsenopirite, a que se associam sulfuretos de estanho e cassiterite e pequenas percentagens de ouro, prata e Terras Raras devendo-se principalmente à atividade vulcânica submarina ocorrida nesta região. Os depósitos mais importantes são: Lousal, Aljustrel, S. Domingos e Neves Corvo. Esta mina localiza-se numa vasta área geográfica no sul da Península Ibérica na designada Zona Sul Portuguesa (ZSP) (Gabriel, J. 2012).

“Este jazigo encontra-se a uma profundidade superior a 350 metros e situa-se cerca de 40 km a SE de Aljustrel. Os trabalhos de prospeção realizados até hoje revelaram a existência de vários corpos mineralizados, sendo os mais produtivos: Neves-Corvo-Graça-Zambujal. Estes depósitos encontram-se separados uns dos outros por desligamentos sub-verticais e localizados a tecto do Complexo vulcano-silicioso suprajacentes a fácies de tufos ácidos. Os corpos com 50 - 90 metros de espessura, ocorrem no flanco normal de um antiforma deitado, inclinando 10 - 30° para NE. A mina de Neves Corvo fica próxima de um stockwork (massa de rocha densa e irregularmente fraturada, em diversas direções, por pequenas fraturas descontínuas ao longo das quais se alojou

a mineralização). Os teores médios do minério revelam 1% de Cu, 5% de Zn, 0,8% de Pb e 52 ppm. de Ag, sendo dos mais elevados da FPI. Todavia, alguns têm mais que 5% de Cu, existindo ainda cerca de 10^6 ton de minério com mais de 7% de Cu” (Pereira, E. e Rodrigues, J., 2009).

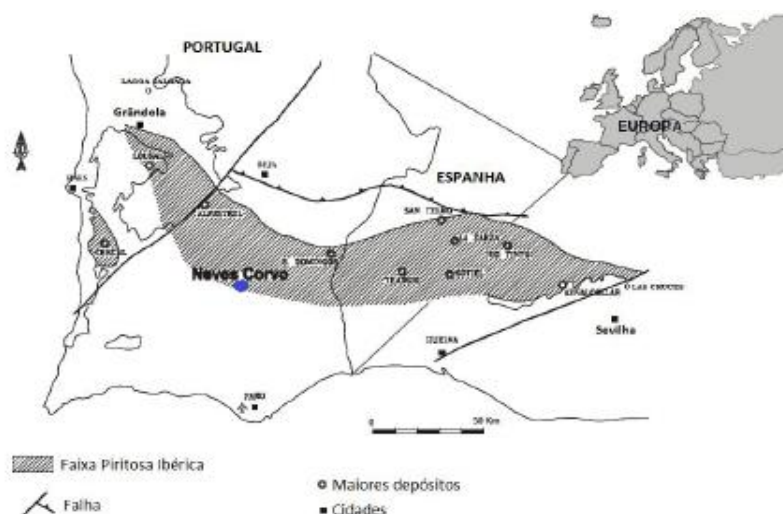


Figura 5 - Área ocupada pela Faixa Piritosa Ibérica com destaque para a localização da mina de Neves Corvo (Adaptado de Gabriel, J. 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sendo o principal objetivo do presente trabalho o estudo do processo de biolixiviação, cabe neste capítulo um enquadramento deste fenómeno como processo alternativo de tratamento e enriquecimento de resíduos e/ou minérios de baixo teor.

2.1. O processo de Biolixiviação

Os microrganismos desempenham um papel central nas atividades humanas e no planeta Terra. Embora os microrganismos sejam as formas mais pequenas de vida, coletivamente, constituem a maior massa de material vivo na Terra e realizam muitos dos processos químicos necessários para o desenvolvimento de outros organismos. Na ausência de microrganismos, outras formas de vida nunca teriam surgido e não poderiam agora ser sustentadas. De fato, o próprio oxigénio que respiramos é o resultado da atividade microbiana do passado. Os microrganismos existem na Terra há bilhões de anos, antes do aparecimento de plantas e animais (Madigan, T. *et al.*, 2009).

A lixiviação define-se como a extração de um constituinte solúvel de um sólido mediante um solvente. Uma das variantes deste processo, a biolixiviação, é o tema tratado neste trabalho. Este processo apareceu com a crescente necessidade de se descobrirem processos alternativos, mais económicos e menos poluentes para o ambiente. Este processo baseia-se na utilização de microrganismos para promover a solubilização de metais pela oxidação de sulfuretos metálicos e a maior diferença para a lixiviação química reside na tecnologia aplicada (Garcia *et al.* 2007).

A biolixiviação apresenta vantagens no tratamento de minérios de baixo teor de metais com interesse comercial proporcionando um ambiente favorável, de baixo custo e alta seletividade. No entanto, devido à sua lenta cinética de extração, a aplicação comercial deste processo na extração de metais é relativamente limitada (Song, C., *et al.*, 2008).

Para a prática do processo de biolixiviação podem ser utilizados tanques agitados ou o método de lixiviação em pilha. A lixiviação em pilha oferece vantagens operacionais e custos mais reduzidos. No entanto a utilização da técnica de lixiviação em pilha é limitada em alguns casos, como p. ex., a manutenção de temperatura adequada no interior da pilha. (Pradhan *et al.*, 2008). A lixiviação em pilha é mais utilizada como método de extração de minerais de baixa concentração, como minérios de cobre, ouro, prata e urânio. No processo de biolixiviação em pilha o minério britado é empilhado sobre uma camada impermeável de HDPE (polietileno de alta densidade) e é de seguida irrigado com uma solução lixivante que atravessa a pilha por gravidade. O licor carregado com o metal de interesse é recolhido na base da pilha e retorna ao topo desta por um sistema de irrigação até que uma concentração pré-estabelecida do metal de interesse em solução seja alcançada. Esta operação pode durar semanas e até meses em alguns casos. Muitas variáveis podem influenciar esse processo, como o pH da solução lixivante, e as características do leito mineral, nomeadamente a altura, granulometria, permeabilidade, porosidade, arejamento, impurezas, etc.

Devido ao maior contacto entre a solução oxidante e a superfície mineral, o método de biolixiviação em tanques agitados é mais eficiente que o método anterior, mas aplica-se principalmente a minérios de alto teor devido ao elevado custo de operação. Neste método, a polpa é colocada em tanques, normalmente de aço inoxidável onde fica a agitar durante algumas horas com recurso a agitadores mecânicos ou por injeção de ar comprimido. A fração sólida da polpa é separada por meios mecânicos e decantadores e é conduzida para a instalação de deposição de resíduos. A solução aquosa é depois enviada para processos de extração como p. ex. extração por solventes (Ahmadi, *et al.*, 2010).

A biolixiviação tem uma longa história, embora os primeiros mineiros não soubessem que os microrganismos estavam envolvidos. O uso de microrganismos para extrair cobre tem raízes profundas na antiguidade. Os registos históricos indicam que o processo foi explorado empiricamente desde os tempos antigos, mas sem o reconhecimento de uma contribuição biológica para o processo. Uma das primeiras referências ao processo de biolixiviação foi feita pelo escritor romano *Gaius Plinius Secundus* (23 - 79 A.D.). Existem vários registos do emprego de técnicas de biolixiviação em pilhas durante a Idade Média na Itália, Alemanha e Hungria. O primeiro registo comercial do emprego deste processo à escala industrial para a produção do cobre é o das minas de Rio Tinto, em Espanha em 1572. Foi apenas a meio do século XX que se provou que os microrganismos eram participantes ativos na lixiviação do cobre e de outros metais. Isto levou a um esforço para identificar quais e como é que estes microrganismos auxiliam neste processo, que continua até hoje (Ehrlich, 2001).

2.2. Cinética do crescimento bacteriano

Ao introduzir-se uma cultura microbiana pura num recipiente fechado (p. ex. num reator) onde existe um substrato (alimento) solúvel disponível é possível, com o decorrer no tempo, distinguir quatro fases principais. A quantidade de microrganismos adicionados é menor em comparação com o substrato e admite-se que a disponibilidade de alimento é o único fator limitativo ao desenvolvimento microbiano.

Nestas condições: inicialmente, não se nota qualquer desenvolvimento. A população microbiana permanece estável mantendo-se o número de indivíduos da cultura introduzida. É uma fase de adaptação ao meio que se designa *fase “lag”* ou *fase de adaptação fisiológica*. Após este período, verifica-se que a população microbiana começa a crescer a uma taxa exponencial ao passo que a quantidade de substrato decresce ao mesmo ritmo. Este decréscimo é resultante da utilização do substrato para constituir novo material celular e obtenção de energia através das reações de síntese e de respiração. Esta fase é chamada *fase de crescimento exponencial* e é caracterizada pelo facto do substrato não ser um fator limitativo ao crescimento. Com o decorrer do tempo, a relação entre o substrato disponível e a massa microbiana presente atinge um equilíbrio mantendo-se constante o número de indivíduos da população. Esta fase é denominada por *fase estacionária*. A utilização contínua do substrato vai implicar que ao fim de um certo período de tempo deixe de haver quantidade suficiente para manter uma velocidade positiva de crescimento, então o número de indivíduos começa a diminuir passando-se à *fase de morte ou declínio*. Ao fim de um certo tempo, o substrato disponível já não é suficiente para fornecer energia necessária que os microrganismos necessitam e as condições do meio tornam-se cada vez mais impróprias para que as células sobrevivam. Os microrganismos passam então a utilizar o seu próprio protoplasma como fonte de energia, começando a diminuir a sua biomassa. Este fenómeno chama-se respiração endógena. Esta respiração existe sempre mas é desprezável quando a disponibilidade de alimento é elevada em relação à quantidade dos microrganismos presentes. Esta última fase denomina-se *fase endógena* (Fiúza, 2010). A fig. 6 mostra a evolução do número de células viáveis (microrganismos) em função do tempo.

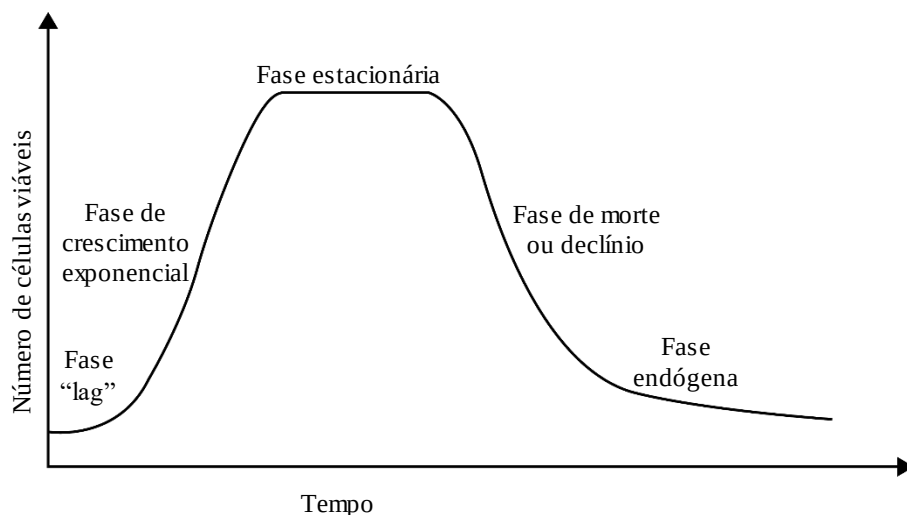


Figura 6 – Curva típica de crescimento celular – evolução do número de células viáveis em função do tempo.

Nos casos reais coexistem várias populações de microrganismos, cada uma com a sua curva de crescimento. A posição e a forma de cada curva irão depender do tipo de substratos disponíveis e de fatores ambientais, tais como, o pH, temperatura e se o sistema é aeróbio ou anaeróbio.

2.3. Características dos microrganismos envolvidos no processo de biolixiviação

Os microrganismos podem-se dividir quanto à sua fonte de energia e de carbono. Os que utilizam compostos químicos como fonte de energia denominam-se quimiotróficos. A fonte de energia pode ser orgânica (como p. ex. açúcares), neste caso os microrganismos denominam-se quimi-organotróficos. Os microrganismos que utilizam compostos inorgânicos como fonte de energia (p. ex. sulfuretos) denominam-se quimio-litotróficos (Barret *et al.*, 1992). Os microrganismos podem ser classificados em três grupos quanto à sua fonte de carbono. Os que utilizam o CO₂ como fonte de carbono são denominados por autotróficos, enquanto os heterotróficos, utilizam carbono orgânico como fonte de carbono. Os mixotróficos, são capazes de utilizar carbono provenientes de fontes orgânicas ou CO₂.

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi a primeira espécie isolada de regiões mineiras e tem sido a mais estudada, tanto em estudos genéticos quanto em experiências de biolixiviação (Johnson D., 2001). As bactérias mais competentes na solubilização de minerais metálicos a temperaturas moderadas são espécies do género *Acidithiobacillus*. Necessitam de nutrientes como azoto, fósforo e magnésio e um substrato inorgânico oxidável como fonte de energia, que pode ser o ião Fe²⁺, enxofre elementar ou sulfuretos metálicos, como a pirite (FeS₂). Este mecanismo faz com que este microrganismo seja um dos principais responsáveis pela biolixiviação de metais. Para além disso, esta bactéria é muito resistente a altas concentrações de iões metálicos e metais como alumínio, zinco, manganês, cobre, crómio, entre outros. É uma bactéria quimio-litotrófica, ou seja, obtém a sua energia pela oxidação de substratos inorgânicos, como o ião ferroso e compostos reduzidos de enxofre, tais como os sulfuretos metálicos. A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada por esta bactéria para a fixação do CO₂ atmosférico, a sua fonte de principal de carbono (Garcia *et al.*, 2007). O *A. ferrooxidans* é uma espécie mesófila e acidófila, sendo 30 °C a temperatura ótima para o seu crescimento, 2 o pH ótimo de crescimento, apresenta a forma de bastonete e é gram-negativa (Rawlings, D., 2002).

A *Acidithiobacillus thiooxidans* é também bastante importante para o fenómeno de biolixiviação devido à sua capacidade de oxidar o enxofre elementar (S⁰) a ácido sulfúrico. Esta capacidade

permite a manutenção do sistema reacional dentro da faixa de acidez de interesse. A *A. thiooxidans* possui uma grande capacidade para tolerar ambientes com elevada acidez, ou seja, ambientes com elevadas concentrações de ácido sulfúrico (Donati e Wolfgang, 2007). Esta bactéria apresenta-se na forma de bastonete e classifica-se como gram-negativa. A sua temperatura ótima de crescimento situa-se no intervalo 28 a 30 °C (bactéria mesófila) e o pH ótimo de crescimento situa-se no intervalo de 2 a 3 (Garrity, et al., 2005).

Recentemente, outra bactéria oxidante de enxofre foi encontrada em tanques de bilixiviação de fluxo contínuo a temperaturas entre 40 e 50 °C. Esta bactéria chamada *Acidithiobacillus Calvus* é uma bactéria moderadamente termófila. A *A. calvus* é também um microrganismo aeróbio, gram-negativo e autotrófico que gera energia a partir da oxidação de compostos de enxofre reduzidos (Semenza, M, et al., 2002).

Além do género *Acidithiobacillus*, existem outras bactérias eficazes na solubilização de minerais. Em biótopos quentes contendo enxofre ou compostos de enxofre oxidáveis, podem-se encontrar arqueobactérias denominadas por *Sulfolobus*. Estas bactérias classificam-se como autotróficas facultativas, possuem uma estrutura de parede celular incomum desprovida de peptidoglicano, são bactérias acidófilas e o seu pH ótimo de crescimento encontra-se no intervalo de 2 a 3, mas podem viver em ambientes com pH de 0,9 a 5,8. São bactérias termófilas com temperatura ideal de crescimento no intervalo de 70 a 75 °C. Estas, são bactérias sem parede celular rígida, de forma circular e de aproximadamente 0,8 a 1,0 µm de diâmetro, são bactérias gram-positivas (Brock, T., et al., 1972).

A *Leptospirillum ferrooxidans* apresenta uma grande capacidade de oxidação de iões ferrosos, sendo que apenas tem a capacidade para oxidar esta espécie iónica. Esta característica faz com que este microrganismo seja bastante importante para o processo de biolixiviação. Esta bactéria classifica-se como acidófila, ou seja, o seu pH de crescimento ótimo encontra-se no intervalo entre 1,5 e 3,0 e mesófila, ou seja, a sua temperatura ótima de crescimento situa-se entre 32 e 35 °C (Johnson, 2001).

Leptospirillum ferriphilum é uma bactéria oxidante do ferro. É uma das espécies responsáveis pela drenagem mineira ácida. É uma bactéria de grande importância em reatores de biolixiviação comercial de fluxo contínuo, utilizados para extrair metais, que operam a 40 °C ou menos. São microrganismos aeróbios, as células de *Leptospirillum* são gram-negativas e apresentam-se em forma de espiral. Metabolicamente, são estritamente quimio-lito-autotróficos, fixando carbono utilizando ferro ferroso como seu dador de eletrões e oxigénio como aceitador de eletrões (Coram, N. e Rawlings, D., 2001).

Nos ambientes naturais é possível encontrar frequentemente microrganismos distintos, também acidófilos, mas heterotróficos, que se encontram normalmente associados ao género *Acidithiobacillus*. No entanto, não existem muitos estudos no que diz respeito a este tipo de microrganismos, apesar de se saber que as interações entre microrganismos autotróficos e heterotróficos nos ambientes de biolixiviação é muito importante para a solubilização de metais (ITGE, 1991).

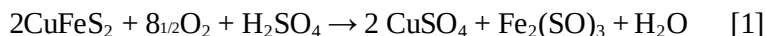
2.4. Aplicações industriais

A aplicação mais comum do processo de biolixiviação é na recuperação de cobre a partir minérios de baixos teores (p. ex. calcopirite (CuFeS_2), covelite (CuS), calcocite (Cu_2S) e bornite (Cu_5FeS_4)). Os principais fatores que afetam a eficiência deste processo são:

- Meio ácido (pH por volta de 2 a 3);
- O potencial redox deve estar abaixo de 500 mV de modo a evitar-se a precipitação do ferro;

- Uma determinada concentração ótima de nutrientes presentes no meio como $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] \approx 3 \text{ g dm}^{-3}$ e $[\text{K}_2\text{HPO}_4] \approx 0,5 \text{ g dm}^{-3}$;
- Uma boa agitação do meio é necessária para que os níveis de O_2 dissolvido e concentração de CO_2 no ar permitam o crescimento e o desenvolvimento bacteriano;
- Granulometria do minério.

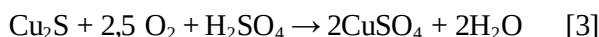
Estas condições são facilmente controladas num biorreator de lixiviação. No caso da calcopirite, as bactérias obtêm a energia necessária ao seu metabolismo pelos eletrões provenientes da oxidação de sulfuretos. Assim são libertados para a solução o sulfato de ferro e o sulfato de cobre. Inicialmente, a calcopirite (CuFeS_2) sofre oxidação bacteriana direta produzindo sulfato de cobre, sulfato de ferro e água como se pode verificar pela Reação 1 (Fiúza, A., 2010):



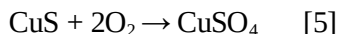
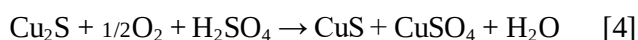
O sulfato de ferro pode, ainda, solubilizar mais cobre. Neste caso, tem-se uma reação puramente química com a formação de sulfato de ferro e enxofre (Reação 2). Estes compostos serão novamente oxidados, agora pelo ataque bacteriano.



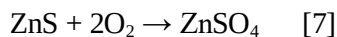
A colcocite (Cu_2S) é também solubilizada pelas bactérias (Reação 3), o mesmo acontece com a covelite (CuS) (Reação 4 e 5) e a bornite (Cu_5FeS_4) (Reação 6).



Esta reação ocorre em duas etapas (Reação 4 e 5):

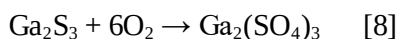


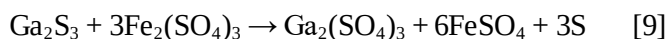
O chumbo e o zinco também podem ser lixiviados por ação bacteriana, como estudaram Garcia et al. (1995) em que a galena (PbS) e a esfarelite (ZnS), sulfuretos de chumbo e zinco, respetivamente, foram lixiviados por *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. A bactéria *A. ferrooxidans* utiliza-se para a extração do zinco a partir de sulfuretos metálicos e este processo pode ser representado pela Reação 7:



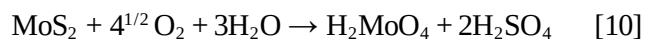
As condições ótimas de operação para a extração de zinco são: temperatura de 35 °C; pH ácido (2 a 3), percentagem de sólidos no meio de 22%; concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K_2HPO_4 de 0,75 g dm^{-3} e 0,66 g dm^{-3} , respetivamente; concentração de CO_2 no ar de 7,9% e área de superfície específica do concentrado de sulfureto de zinco de 6,9 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$.

Nos elementos de terras raras como o gálio também foi relatada a aplicação de lixiviação bacteriana. Este processo ocorre pelo ataque direto aos sulfuretos correspondentes ou pelos subprodutos da oxidação de minerais primários. A *A. ferrooxidans* acelera entre duas a oito vezes solubilização de gálio a partir da biolixiviação da esfalerite, o índio é também solubilizado. A *A. ferrooxidans* é também capaz de oxidar gálio puro e sulfureto de gálio (Ga_2S_3) associado a concentrados de calcopirite, simultaneamente pelos mecanismos direto e indireto (Reações 8 e 9). A concentração de gálio na solução de lixiviação pode alcançar 2200 mg dm^{-3} (Fiúza, A., 2010).





Um dos metais que tem vindo a ganhar um especial interesse em estudos de biolixiviação é o molibdénio, que possui múltiplas e importantes aplicações tecnológicas. Industrialmente, este elemento é obtido a partir do tratamento da molibdenite (MoS_2). Este processo consiste na queima do sulfureto formando-se trióxido de molibdénio (MoO_3) mas este processo tem custos elevados e origina a liberação de SO_2 para a atmosfera podendo causar chuva ácida. O molibdénio encontra-se na natureza em amostras com muito baixo teor por isso é necessário um processo de concentração, processo este que requer diversos passos, entre eles a calcinação e vários estágios de extração por solventes ou aquecimento até sublimação do MoO_3 que depois necessita de ser condensado. Apesar destas desvantagens o interesse na recuperação de molibdénio é cada vez maior, mas existem poucos estudos da oxidação microbiológica da molibdenite na literatura (Fiúza, A., 2010). Minerais de ferro como a pirite (FeS_2) e a pirrotite (FeS) são constituintes muito comuns em amostras naturais de sulfuretos metálicos, inclusive de molibdenite, pelo facto do ferro ser um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre (Garcia, O. *et al.*, 2007). O molibdénio pode ser lixiviado pelo *A. Ferrooxidans* que oxida a molibdenite de acordo com a Reação 10.



No entanto as bactérias termófilas como *Sulfolobus* são mais promissoras na lixiviação do molibdénio resistindo até concentrações de Mo de $2,0 \text{ g dm}^{-3}$ (Fiúza, A., 2010).

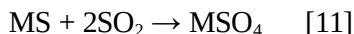
2.5. Mecanismos de atuação de microrganismos

Existem pelo menos dois papéis distintos desempenhados pelas bactérias na solubilização dos minerais, ou seja, os metais podem ser dissolvidos diretamente pelo metabolismo de certos microrganismos ou indiretamente pelos produtos do seu metabolismo. O primeiro mecanismo envolve o contacto físico do microrganismo com a superfície dos sulfuretos insolúveis. O segundo mecanismo refere-se ao ciclo ferroso-férrico (mecanismo indireto) no qual o ião férrico e os prótons em solução “atacam” o mineral. Muitos dos aspetos do ataque bacteriano direto à superfície mineral são ainda desconhecidos, existindo uma grande controvérsia em relação ao papel dos microrganismos no processo de biolixiviação (Fiúza, A., 2010).

i) Mecanismo Direto

No caso do mecanismo direto, o microrganismo adere à superfície do mineral e realiza a dissolução do mesmo recorrendo a reações envolvendo enzimas. Com recurso à microscopia eletrónica com varrimento foi possível demonstrar que muitas bactérias entram em contacto com as superfícies minerais em solução em que existam os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. A ligação preferencial das bactérias à superfície dos sulfuretos relativamente a outros minerais deve-se a que estas regiões constituem uma fonte de energia para a bactéria. A investigação mostrou que alguns microrganismos são capazes de efetuar um ataque oxidante direto dos sulfuretos metálicos. A investigação demonstrou também que as bactérias dissolvem a superfície de sulfuretos a partir de um contacto direto com a sua célula. Esta ligação preferencial à superfície dos sulfuretos relativamente a outros minerais deve-se a que estas regiões constituem uma fonte de abastecimento de energia para a bactéria. Este processo é influenciado pela natureza química da fase aquosa e da fase sólida cristalina. O contacto e a oxidação dos sulfuretos traduzem-se numa corrosão superficial cuja extensão depende da orientação do mineral. Deste processo podem também ser produzidos metabolitos que ajudam a dissolução das superfícies minerais. Estas substâncias podem atuar de 3 modos: por oxidação do ião Fe^{2+} , pela solubilização do enxofre molecular na superfície dos cristais e por ataque direto na superfície dos sulfuretos. A ligação das bactérias à superfície de sulfuretos como a pirite (FeS_2) e calcopirite (CuFeS_2) é continuada por reações biológicas (Fiúza, A., 2010). Na oxidação direta sobre sulfuretos, a

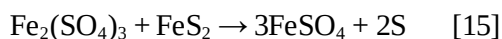
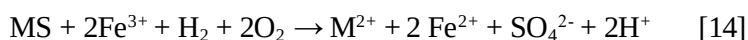
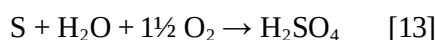
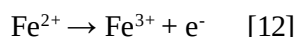
estrutura é atacada por meio de enzimas bacterianas ou devido ao contato direto entre bactéria e o sulfureto. É possível a dissolução da pirite utilizando *A. ferroxidans* em que ocorre a seguinte reação (Reação 11):



Sendo MS o sulfureto metálico.

ii) Mecanismo Indireto

O papel das bactérias no mecanismo de lixiviação indireta é o da re-oxidação do ião ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) e do enxofre (S) elementar a ácido sulfúrico (H_2SO_4) tal como se pode verificar pelas seguintes reações (Reações 12 a 15) (Fiúza, A., 2010):



Como se pode verificar pelas reações anteriores existe um processo cíclico que envolve duas etapas (sendo MS o sulfureto metálico). A primeira é a interação química do ião férrico com o sulfureto metálico e na seguinte trata-se do restabelecimento do ião férrico pelas bactérias.

2.6. Fatores que afetam a atividade bacteriana durante a biolixiviação

As atividades dos microrganismos são bastante afetadas pelo estado químico e físico do ambiente onde se inserem. Existem vários fatores físicos, químicos e biológicos responsáveis pela cinética das reações de origem biológica. A monitorização destes fatores é indispensável para uma lixiviação bacteriana bem-sucedida. Estes fatores estão associados à velocidade de crescimento bacteriano e são os seguintes: temperatura, pH, Eh, pressão osmótica, disponibilidade de nutrientes, oxigénio e dióxido de carbono, composição mineral, química e cristalina, granulometria das partículas, metais tóxicos que podem afetar o crescimento bacteriano, interações galvânicas dos minérios, presença de agentes químicos estranhos ao processo como solventes orgânicos e a eficiência das bactérias no processo cinético de biolixiviação. Outros fatores que podem influenciar o processo são: a presença de inibidores, porosidade, forma ou geometria da pilha, distribuição preferencial de microrganismos e uma grande diversidade biológica. O máximo rendimento da extração de metais ocorre apenas quando as condições ideais para o crescimento bacteriano são encontradas (Colling, 2014). Nesta secção referem-se os fatores mais importantes que influenciam a atuação das bactérias.

- **Temperatura:** A temperatura é provavelmente o fator ambiental mais importante que afeta o crescimento e sobrevivência dos microrganismos, visto que os processos de crescimento dependem de reações químicas e que a velocidade destas reações é influenciada pela temperatura. A temperatura muito elevada ou muito baixa, os microrganismos não se conseguem desenvolver e podem até morrer. A temperatura mínima e máxima para o crescimento microbiano varia bastante entre diferentes microrganismos e normalmente reflete a faixa de temperatura e a temperatura média dos seus habitats. Utilizam-se três termos para descrever o efeito da temperatura sobre o crescimento dos microrganismos. A temperatura ótima, onde o crescimento e a reprodução são máximos; a temperatura mínima, que é a mais baixa à qual é possível que uma cultura cresça e a temperatura máxima que é aquela à qual existe uma inibição do

crescimento de microrganismos devido a interações não doseadas com o metabolismo do organismo (Madigan, T., *et al.*, 2009). Quanto à temperatura ótima de crescimento, os microrganismos dividem-se em quatro grupos: psicrófilos, em que a temperatura ótima de crescimento é inferior a 20 °C; mesófilos, em que a temperatura ótima se situa no intervalo de 20 a 35 °C; termófilos moderados, em que a temperatura ótima de crescimento é por volta de 50 °C e termófilos extremos em que a temperatura ótima de crescimento é superior a 65 °C (Barret *et al.*, 1992). Os processos que se baseiam na transformação de microrganismos estão limitados a intervalos de temperatura entre -18 e 105 °C. Aumentando a temperatura a velocidade das reações químicas e o metabolismo celular das bactérias também aumenta. A temperatura ótima de lixiviação de minérios de sulfuretos metálicos ocorre no intervalo de 25 a 45 °C. As bactérias capazes de lixiviar minerais sulfuretados encontram-se normalmente na faixa de temperatura das bactérias mesófilas, termófilas moderadas e termófilas extremas (Colling, 2014);

- **Tolerância a metais:** as bactérias oxidantes do ferro, como a *A. ferrooxidans*, têm uma tolerância relativamente alta aos metais em comparação com a maioria dos outros microrganismos. A *A. ferrooxidans* tolera concentrações da seguinte ordem: 0,37 M de Al, 0,15 M de Zn, 0,17 M de Co, 0,17 M de Ni, 0,18 M de Mn e 0,16 M (10 g/l) de Cu. No entanto, a prata e aniões de metais como Se, Te e As são inibidores a concentrações entre 50 e 100 mg/l (Fiúza, 2010);
- **pH e Potencial Redox:** todos os microrganismos têm uma faixa de pH dentro da qual o crescimento é possível, normalmente têm um valor ótimo de pH bem definido. Os valores ótimos de pH dependem da fonte de energia, por ex., o pH ideal para o crescimento das bactérias litotróficas é pH ácido (2 a 5) (Colling, 2014). A maioria das bactérias que participam nos processos de biolixiviação classificam-se como acidófilas, ou seja, são capazes de viver a valores de pH bastante abaixo dos referidos anteriormente (Madigan, T., *et al.*, 2009). Quanto ao meio em que se desenvolvem, dividem-se em três grupos: acidófilos extremos, crescem a pH inferior a 1,5, acidófilos, crescem a pH entre 1,5 e 4,5 e alcalinófilos, crescem a pH alcalino (entre 8 e 14) (Fiúza, A., 2010). A grande maioria das bactérias envolvidas no processo de biolixiviação são acidófilas, mas toleram ambientes com pH entre 4 e 8. As bactérias oxidantes do ferro, como *A. ferrooxidans*, não se desenvolvem a pH superior a 3. Alguns autores sugerem que valores mais altos podem afetar a fixação da bactéria ao sólido por alteração superficial da célula. Considerando a variável pH, a bactéria *A. thiooxidans* é mais resistente que a *A. ferrooxidans* podendo viver a pH de apenas 0,5. O potencial redox (Eh) é uma medida da tendência dum composto para aceitar ou libertar eletrões. A oxidação indireta que resulta da solubilização de minerais pelo ião férrico é bastante dependente deste fator. Durante a oxidação os valores de Eh variam entre +220 V e +515 mV, na lixiviação quer de sulfuretos metálicos, quer do urânio por bactérias oxidantes do ferro (Fiúza, 2010);
- **Pressão Osmótica:** a pressão osmótica é a força com a qual se move através da membrana citoplasmática uma solução contendo uma baixa concentração de substâncias dissolvidas (solutos) para outra contendo uma alta concentração de solutos. Quando os microrganismos se encontram em meio aquoso, não existem grandes diferenças na concentração da solução dentro e fora da célula, pois caso isto se verificasse, as células poderiam desidratar ou romper, levando à morte celular. Numa solução isotónica, o fluxo de água encontra-se em equilíbrio e a célula cresce normalmente. Entretanto, quando o meio externo é hipertónico, com uma concentração de solutos mais alta do que a que se encontra no citoplasma da célula, esta perde água e seu crescimento é inibido. O contrário também pode ocorrer, ou seja, em meio hipotónico, com uma concentração de solutos muito mais inferior do que na célula, a água flui para o interior da célula rompendo-a, inviabilizando o crescimento bacteriano. A presença de sais numa solução, com consequente aumento da pressão osmótica pode ser indício de morte bacteriana. Altas concentrações de sais podem inibir o crescimento das bactérias (Colling, 2014);

- **Disponibilidade de oxigénio e dióxido de carbono:** os microrganismos variam na sua necessidade ou tolerância ao oxigénio. Os microrganismos podem ser agrupados de acordo com a forma como o oxigénio os afeta, ou seja, os aeróbios necessitam de captar o oxigénio, enquanto que os anaeróbios crescem apenas quando o oxigénio atmosférico tenha sido eliminado do meio e os facultativos podem crescer tanto em condições aeróbias, como anaeróbias (Madigan, T. *et al.*, 2009). Outra classificação refere-se à capacidade de os microrganismos utilizarem o oxigénio nas reações de produção de energia. Tem-se assim: aeróbios os que utilizam oxigénio molecular podendo viver na sua presença, anaeróbios os que só conseguem viver na ausência de oxigénio obtendo a energia necessária à custa de reações de fermentação e facultativos os que podem viver em ambientes com ou sem oxigénio (Fiúza, A., 2010). Os organismos quimio-heterotróficos obtêm a maior parte do carbono a partir de gás carbónico ou através de materiais orgânicos como proteínas, carboidratos e lípidos que são fontes de energia para a célula. Os microrganismos capazes de lixiviar metais fixam o dióxido de carbono pelo Ciclo de Calvin (Madigan, T. *et al.*, 2009). A disponibilidade de oxigénio é um fator que controla a extração bacteriana dos metais. Dependendo do tipo de bactérias (aeróbias ou anaeróbias) a disponibilidade de oxigénio varia (Colling, 2014). A não disponibilidade de dióxido de carbono poderá afetar o processo de biolixiviação visto que os microrganismos o utilizam como fonte de carbono, e caso este não exista poderá inibir o crescimento bacteriano (Fiúza, A., 2010).
- **Composição do meio lixiviante:** o meio deve conter os nutrientes necessários como a amónia/nitrato, fosfato e magnésio para a realização da síntese de proteínas como a ATP, ADN, RNA e enzimas responsáveis pelas atividades metabólicas estruturais das células. Junto com os elementos (N, P e Mg), o microrganismo necessita de outros elementos minoritários, como o potássio, cálcio e enxofre que são vitais para o seu crescimento (Colling, 2014). O azoto amoniacal, o fósforo, o enxofre e o magnésio são essenciais para o crescimento de *A. ferrooxidans*. O magnésio é necessário para que ocorra a fixação de CO₂ e o fósforo é necessário para o metabolismo energético e para as primeiras etapas da oxidação do ferro. O enxofre na forma de sulfato é importante ao ser um componente de alguns aminoácidos necessários para estas bactérias (Fiúza, A., 2010);
- **Granulometria das partículas:** a extração aumenta com o aumento da superfície específica das partículas. Isto acontece porque a redução do calibre (aumento da superfície específica) aumenta a disponibilidade do substrato. A redução do calibre para além de uma certa dimensão crítica pode aumentar a superfície específica da ganga relativamente ao substrato, o que equivale à diluição do substrato. Partículas com tamanho superior a 10 mm podem diminuir a velocidade do ataque bacteriano (Garcia, 2001; Colling, 2014).

2.7. Vantagens e Inconvenientes da biolixiviação

A biolixiviação ou lixiviação bacteriana apresenta vantagens quando comparada com técnicas convencionais de tratamento, para além de ser de fácil aplicação para minérios de baixo teor. É uma tecnologia segura, simples e eficiente, não emite gases poluentes, o investimento inicial de capital e custos operacionais é reduzido devido à simplicidade das instalações, necessita de pouca energia comparado com outros processos, o consumo de reagentes é reduzido e os custos de operação são assim diminuídos. Uma das desvantagens comparando com outros processos industriais é a cinética do processo ser mais lenta (Garcia, 1989; Lynn, N. S., 1997).

Os custos de operação deste tipo de processos são reduzidos pois os microrganismos são capazes de produzir a matéria-prima necessária para o processo, o que faz com que exista uma economia em relação a custos operacionais. Outra das vantagens deste processo é que as instalações necessárias são flexíveis o que faz com que mesmo as instalações mais reduzidas se tornem facilmente rentáveis.

A biolixiviação permite o tratamento de minerais e produtos residuais pobres como já foi referido anteriormente, assim, é possível recuperar metais a partir de minérios cujo tratamento por processos hidromineralúrgicos convencionais é técnica e economicamente inviável.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios realizados ao longo da dissertação foram executados no Laboratório de Preparação de Minérios no Departamento de Engenharia de Minas e no LEPABE - Laboratory for Process Engineering, Environmental, Biotechnology and Energy no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. As amostras utilizadas para o desenvolvimento deste projeto, foram cedidas pelas empresas Sociedade Mineira de Neves-Corvo, S.A. (SOMINCOR) e Beral Tin & Wolfram.

3.1. Metodologia Experimental

Para uma melhor compreensão do texto pode considerar-se que a parte experimental associada a esta dissertação encontra-se dividida em 2 partes:

- Numa primeira fase procedeu-se à recolha de amostras representativas da fase inicial do processo da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo de modo a preparar culturas para a inoculação das amostras a lixiviar. Destas, apenas se conseguiu uma cultura viável para se utilizar nos ensaios de biolixiviação. A preparação e análise dos resultados das restantes culturas utilizadas ao longo desta dissertação encontram-se descritas no Anexo I visto que não apresentaram resultados bem-sucedidos para o trabalho realizado. Após a obtenção de uma cultura viável iniciaram-se os ensaios de biolixiviação. Como o inóculo foi obtido a partir da Alimentação da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo (amostra que se designou por ALC17), o minério escolhido para o primeiro ensaio de biolixiviação nos ensaios em biorreator foi o minério proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo.
- Numa segunda fase, para além de um segundo ensaio em biorreator utilizando a amostra ALC17, foram realizados ensaios de biolixiviação em matraz (balão de Erlenmeyer) utilizando como minério resíduos provenientes da escombreira da mina da Panasqueira (Barroca Grande) que se chamou de BG17 e BG17_2 na tentativa de detetar e extrair metais críticos com elevada importância que não existiam na amostra lixiviada anteriormente.

As amostras utilizadas na parte laboratorial deste trabalho foram submetidas a diversos estudos e ensaios necessários de modo a quantificar e identificar a comunidade bacteriana presente com o objetivo final de realizar ensaios de biolixiviação, como se encontra esquematizado na fig. 7.

Os ensaios iniciais foram realizados com o objetivo de enumerar a população quimio-organo-heterotrófica e quimio-lito-autotrófica presente. Inicialmente utilizou-se o método de espalhamento em placa de *Petri* utilizando três meios sólidos de cultura diferentes (R2A agar, DSMZ_71 com agar e PCA) mas após se verificar que se obtiveram melhores resultados utilizando o meio de cultura R2A apenas se utilizou este meio de cultura até ao final do trabalho laboratorial. Este meio foi utilizado de modo a isolar os microrganismos obtendo assim culturas puras. Em simultâneo com este trabalho, fez-se a extração de ADN dos isolados identificados a partir de uma cultura utilizada nos ensaios de biolixiviação e de uma cultura em que se colocaram crescentes concentrações de tungsténio finalmente fez-se a extração do ADN presente nas amostras provenientes da mina de Neves Corvo de modo a identificar a comunidade bacteriana total presente.

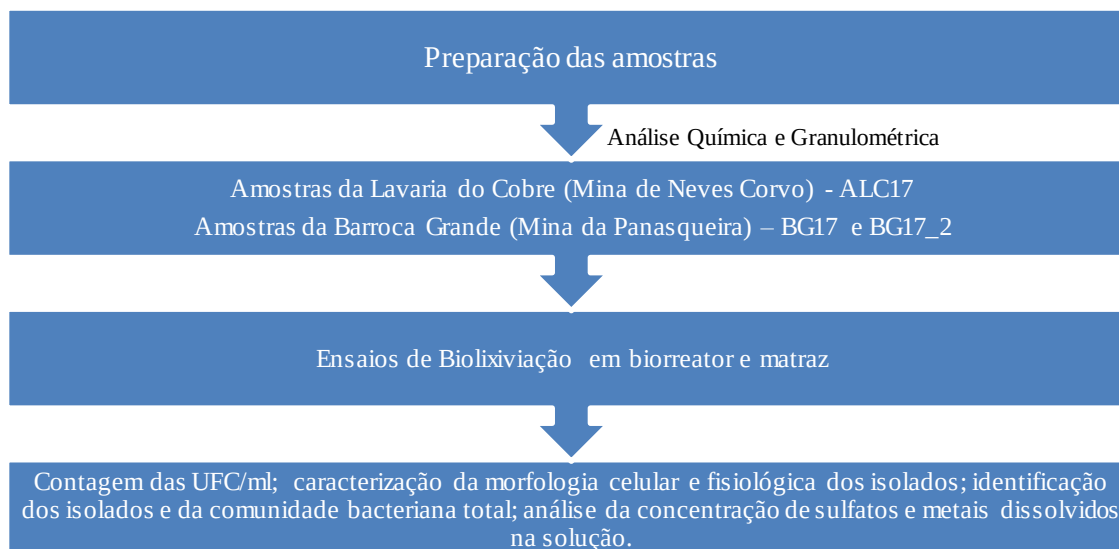


Figura 7 - Esquema da metodologia experimental adotada neste trabalho.

3.1.1. Tarefas desempenhadas com as amostras sujeitas a espalhamentos em placa e das amostras sujeitas a ensaios de biolixiviação

De acordo com o que foi proposto no início deste trabalho foi seguida uma listagem de tarefas a desempenhar para o correto desenvolvimento do trabalho que vão ser descritas neste capítulo. Para tal, foram cumpridas as seguintes tarefas:

- Preparação das amostras (análise granulométrica e química);
- Escolha de um meio de cultura apropriado;
- Preparação das culturas e incubação;
- Preparação de meios de cultivo sólidos (agarizados) para espalhamentos em placas de Petri;
- Preparação de soluções salinas necessárias para as diluições efetuadas na amostra inicial;
- Espalhamentos das amostras e/ou das suas diluições em meio sólido e incubação;
- Contagem das unidades formadoras de colónias e registo da morfologia colonial após 7 dias de incubação;
- Isolamento dos diferentes tipos de colónias que se observaram nas culturas em meio sólido e registo das suas características principais;
- Realização de testes bioquímicos nas culturas purificadas;
- Extração de ADN genómico bacteriano (utilizando um kit de extração e o método de extração de ADN por fervura);
- Extração de ADN total das amostras (comunidade bacteriana);
- Realização das técnicas de PCR, amplificação do gene 16S rRNA e confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose;
- Purificação dos produtos resultantes da técnica de PCR;
- Sequenciação Sanger dos produtos de PCR e sequenciação Illumina (metagenómica) do gene rRNA 16S (técnicas efetuadas em laboratórios externos);
- Comparação das sequências Sanger obtidas com as existentes em bases de dados, tais como a *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* e *EzBioCloud em EzTaxon*;
- Análise das amostras sólidas utilizando a técnica de microscopia eletrónica de varrimento em alto vácuo (SEM/EDS);
- Análise das amostras líquidas: determinação da concentração de metais dissolvidos e determinação da concentração dos sulfatos em solução.

3.2. Amostras minerais

O caso de estudo foi desenvolvido a partir de amostras representativas da Alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo (ALC17) (Diagrama de processo – Anexo III) e numa segunda fase, de amostras provenientes dos resíduos da escombreira da Mina da Panasqueira (Barroca Grande) a que se chamou de BG17 e BG17_2 (Diagrama de processo – Anexo II).

3.2.1. Preparação das amostras para análise granulométrica e química

A preparação das amostras ALC17 e BG17 foi efetuada no Laboratório de Preparação de Minérios no Departamento de Engenharia de Minas. Estas amostras foram colocadas no moinho de anéis da marca Siebtechnik (fig. 8) e o tempo de residência do material no moinho foi de 60 segundos para ambas as amostras. Numa fase posterior do trabalho, a amostra ALC17 foi sujeita a uma segunda moagem no moinho de anéis, utilizando um tempo de residência no moinho de 45 segundos. Esta moagem foi feita com o objetivo de libertar as espécies minerais presentes na amostra aumentando ao mesmo tempo a área superficial das partículas. Este processo facilita o ataque bacteriano porque a diminuição do tamanho das partículas aumenta o rendimento da extração dos metais úteis, visto que a velocidade de reação é proporcional à área superficial das partículas. No entanto, uma exceção a esta regra pode ocorrer quando se verifica a tendência de agregação de partículas reduzindo imenso o rendimento do processo.



Figura 8 - Moinho de anéis.

i) Análise granulométrica

Para se efetuar a análise granulométrica das amostras em estudo (duas provenientes da escombreira Barroca Grande da mina da Panasqueira - BG17 e BG17_2 e uma proveniente da alimentação da lavaria do cobre da mina de Neves Corvo ALC17), foram utilizados dois métodos instrumentais: a Separação Granulométrica da fração arenosa por via seca em peneiros em série de ASTM (American Society for Testing Material) segundo as especificações da Norma E196-1966 e a Análise Granulométrica da fração fina utilizando um Granulómetro de raios laser.

A separação da fração grosseira foi executada no Laboratório de Preparação de Minérios no Departamento de Engenharia de Minas, recorrendo a 2 crivos de abertura 140 e 200 mesh com a ajuda de um peneirador mecânico utilizando cerca de 100 gramas de cada amostra. O peneirador mecânico atuou durante 20 minutos para cada amostra. A análise granulométrica da fração fina das amostras foi realizada utilizando um Granulómetro de Raios Laser da marca Malvern HYDRO 2000G no Departamento de Engenharia de Minas recorrendo a apenas uma pequena fração de cada amostra, cerca de 2 a 3 gramas. O equipamento usado possui uma amplitude de

0,01 a 10.000 μm e o meio de suspensão usado foi a água. O resultado é obtido sob a forma de uma curva de distribuição granulométrica.

ii) **Análise química**

A análise química das amostras BG17, BG17_2 e ALC17 foi realizada utilizando o Analisador de Metais Pesados por Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva da Oxford Instruments no Departamento de Engenharia de Minas. Analisou-se cerca de 30 g de cada amostra, depois de esterilizadas e secas antes dos respetivos ensaios de biolixiviação.

A técnica de fluorescência de raios-x permite a identificação e quantificação dos elementos constituintes de uma amostra. O princípio elementar desta técnica baseia-se na irradiação de raios-x. Quando uma amostra é irradiada por um feixe de raios-x, os átomos na amostra geram raios-x característicos que são emitidos da amostra. Estes raios possuem um comprimento de onda e uma energia específicos que são característicos de cada elemento e que são detetados pelo aparelho permitindo assim a quantificação de cada elemento presente na amostra analisada.

3.3. Preparação de meios de cultura

Inicialmente foram preparados diferentes meios líquidos de cultura com o objetivo de selecionar o(s) mais adequado(s) para o crescimento/desenvolvimento da comunidade bacteriana autóctone presente nas amostras em estudo para serem utilizadas como inóculo das amostras a lixiviar. Neste subcapítulo apenas se refere o meio de cultura selecionado para a preparação das culturas utilizadas nos ensaios de biolixiviação. Os restantes meios de cultura utilizados encontram-se descritos no Anexo I visto que os resultados obtidos não continham resultados válidos para o trabalho desenvolvido.

Estima-se que apenas 1 – 10% dos microrganismos funcionais presentes nos ambientes naturais (p. ex. solo, água, etc.) são cultiváveis em meios de cultura laboratoriais conhecidos. Estas células são viáveis, mas não cultiváveis. A composição de um dado meio de cultura depende da espécie que se pretende cultivar. Os meios de cultura podem ser usados na seleção e crescimento de um determinado microrganismo ou na identificação de uma espécie em particular. Os meios seletivos suprimem o crescimento de determinados microrganismos em benefício de outros. Os meios diferenciais permitem distinguir diferentes grupos de microrganismos com base na sua capacidade de metabolizar componentes específicos presentes no meio de cultura e/ou na morfologia das colónias. Este tipo de meios permite, por vezes, a identificação de microrganismos com base nas suas características fisiológicas (Madigan, T., *et al.*, 2009).

O meio TB foi o meio selecionado para a preparação das culturas a utilizar nos ensaios de biolixiviação. Este meio foi adaptado de Sievert, S., *et al.* (2000). Para a preparação de 1000 mL de meio são necessários os seguintes reagentes: NaCl (10 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g); KCl (0,7 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,42 g); Vitamina B12 (0,0001 g). Juntou-se um indicador (10 mL de Azul de Bromotimol) e ajustou-se o pH a 7 com recurso a NaOH 0,1 M e colocou-se no autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Depois de se retirar o meio do autoclave juntou-se K_2HPO_4 (0,5 g) previamente esterilizado em autoclave em separado.

3.4. Enumeração dos organismos cultiváveis

A enumeração dos organismos cultiváveis foi realizada pelo método de espalhamento em placa. Este método pode ser utilizado para a contagem de grandes grupos de microrganismos, bolores e leveduras podendo-se variar o meio, a temperatura e o tempo de incubação. De acordo com este método as amostras são homogeneizadas, diluídas em série e espalhadas sobre um meio de agar apropriado e incubadas. Após um determinado tempo de incubação pré-estabelecido todas as

colónias visíveis são contadas. O procedimento baseia-se na premissa de que cada célula microbiana presente numa amostra irá formar uma colónia separada e visível quando fixada num meio que lhe permita crescer. Como as células microbianas podem ocorrer em agrupamentos, tais como: cachos, pares, cadeias, tétrades, entre outros, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de unidades formadoras de colónias (UCF), que podem ser células individuais ou agrupamentos de microrganismos, por mililitro ou grama de amostra (Silva *et al.*, 1997).

Realizaram-se diluições seriadas de 10 mL de cada cultura a estudar (cultura A, cultura W e culturas que serviram de inóculo aos ensaios de biolixiviação e os respetivos controlos abióticos) com solução salina (1 mL de amostra ou da sua diluição e 9 mL de salina por tubo de ensaio). Estas culturas vão ser descritas nas próximas secções. Foram efetuados espalhamentos de todas as culturas utilizadas ao longo deste trabalho experimental e fez-se sucessivas diluições nos meios de cultura selecionados através da adição de 100 µL na superfície do meio de cultura (R2A). Depois de efetuados os espalhamentos, as placas foram colocadas a temperatura constante (26 °C). O tempo de incubação foi controlado pela visualização das placas decorrido intervalos de tempo específicos.

3.5. Isolamento dos organismos cultiváveis

Depois de se verificar que as colónias estavam desenvolvidas e que o crescimento destas e a formação de novas colónias estabilizou (normalmente após um tempo de incubação de 7 dias), foi possível distinguir a morfologia das colónias e a sua purificação. Este processo é denominado de isolamento. Neste método, com recurso a uma ansa recolheu-se uma colónia e repicou-se numa nova placa com um meio de cultivo adequado (R2A). As placas foram colocadas numa incubadora a 26 °C (a mesma utilizada para o crescimento das colónias nas culturas mistas) para o seu crescimento até à sua posterior utilização. Foram isoladas as colónias identificadas na cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator e da cultura W.

Os nomes atribuídos aos isolados identificados na cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator devem-se ao aspeto físico da colónia, nomeadamente, a atribuição da letra R deve-se a que estes isolados foram identificados no ensaio de biolixiviação em reator, as letras R (rosa), B (bege) e A (amarela) devem-se à cor das colónias, a letra T (devido ao meio de cultura utilizado, meio TB), o número 17 pois a amostra foi recolhida em 2017, os restantes números relacionam-se com o número diferente de colónias com cor semelhante. Os nomes atribuídos aos isolados identificados na cultura W devem-se ao aspeto físico da colónia, nomeadamente, a atribuição da letra W deve-se à cultura de onde provieram, a cultura W, as letras B (bege) e A (amarela) devem-se à cor das colónias identificadas, o número 17 pois a amostra foi recolhida em 2017, os restantes números relacionam-se com o número diferente de colónias com cor semelhante.

3.6. Caracterização fenotípica dos isolados

Com o objetivo de identificar os microrganismos isolados, cada estirpe foi caracterizada fenotipicamente. Registou-se a sua morfologia colonial e celular, a presença de catalase e de citocromo c oxidase.

a) Coloração de Gram

A coloração de Gram é método de coloração que se utiliza para identificar bactérias de acordo com a coloração que adquirem, de acordo com a constituição físico-química das suas paredes celulares. As bactérias são coradas recorrendo a reagentes químicos e a intervalos de tempo específicos em que cada um está em contacto com o esfregão da bactéria. O procedimento de coloração foi adaptado de Pelczar, Jr., *et al.*, (1996). O teste inicia-se retirando, com o auxílio de uma ansa metálica, uma amostra da colónia de bactérias que se pretende estudar e esfregá-la numa

gota de água destilada, numa lâmina de vidro e fixa-se à chama. Para o processo de coloração, inicia-se colocando algumas gotas do primeiro corante (violeta de cristal) durante aproximadamente 30 segundos e posteriormente é retirado com água. O segundo corante a ser utilizado é a iodina. Este reagente permanece 30 segundos e após este tempo é removido com uma solução descolorante, normalmente constituída por etanol e acetona. O último reagente a ser colocado é a safranina que permanece 1 minuto no esfregaço e após este tempo é retirado com água. Depois de seco o esfregaço pode ser visualizado ao microscópio ótico. O que acontece no fim deste teste é que algumas bactérias possuem paredes celulares mais impermeáveis e por isso a adição da acetona após a coloração não remove a cor e no fim do teste apresentarão cor roxa, estas bactérias consideram-se gram-positivas. As outras bactérias, possuem paredes celulares mais permeáveis o que possibilita a remoção do primeiro corante pela acetona, o segundo corante, de cor rosa não é removido e as bactérias apresentarão uma cor rosa avermelhada, estas serão bactérias gram-negativas. As amostras foram observadas com recurso a um microscópio *Leica DMLB* da marca *Lebo Controle* a ampliação 1000 ×.

A imagem seguinte (fig. 9) mostra a diferença de coloração de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estas imagens são meramente ilustrativas não contendo resultados válidos para o trabalho desenvolvido.

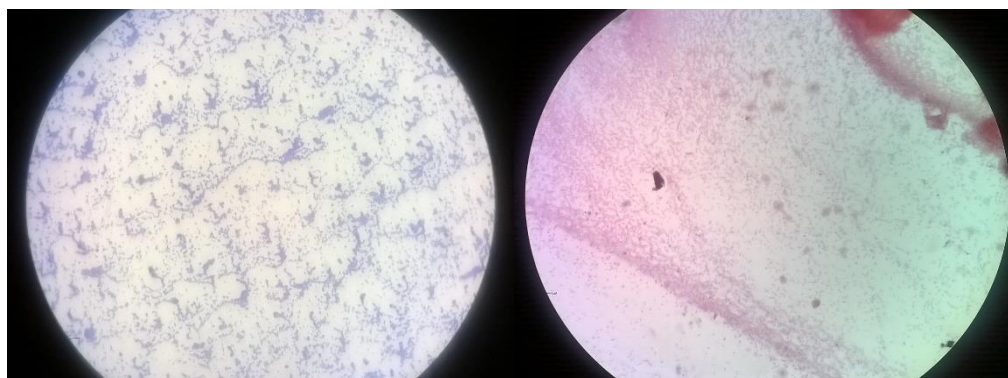


Figura 9 – Ilustração do resultado da Coloração de Gram, respetivamente bactérias gram-positivas (esquerda) e gram-negativas (direita).

b) Teste da Catalase

O teste da catalase permite distinguir bactérias entre estafilococos e estreptococos. A catalase (presente nos microrganismos produtores de catalase, os estafilococos) é uma enzima que catalisa a conversão de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água e oxigénio, e que se encontra na maioria das bactérias. O peróxido de hidrogénio forma-se durante o metabolismo aeróbio. Uma vez que este composto é tóxico para a célula, normalmente os organismos aeróbios possuem esta enzima, enquanto os anaeróbios são catalase negativos. O teste inicia-se retirando com o auxílio de uma ansa, uma pequena porção de material bacteriano e colocar em contacto com uma gota de peróxido de hidrogénio a 3%. A libertação de oxigénio faz com que exista o aparecimento de bolhas (efeito de efervescência). A colónia de bactérias é considerada catalase positivo se existir a formação de bolhas e catalase negativa se não ocorrer nenhuma reação quando se adiciona um pouco de material bacteriano ao peróxido de hidrogénio (Madigan, T. *et al.*, 2009).

c) Teste da Oxidase

O teste da oxidase possibilita a distinção de bactérias não fermentadoras (oxidase positiva) das enterobactérias (oxidase negativa). A composição em citocromos pode ser usada como ferramenta de identificação de microrganismos. Usando o ácido tetra-metil-*p*-fenildiamina dihidroclorídrico como agente redutor, o citocromo *c* e a sua oxireductase (enzima que catalisa a transferência do eletrão do citocromo *c* para o oxigénio) é facilmente detetado. Se a oxidase for positiva,

desenvolve-se uma coloração roxa-azulada, pelo contrário se a oxidase for negativa, não há desenvolvimento de coloração ou verifica-se apenas uma coloração amarelada (Pelczar, Jr. *et al.*, 1996). Para a realização do teste da oxidase é necessário o reagente TMPD (solução de 1% de ácido tetra-metil-*p*-fenildiamina dihidroclorídrico). O teste inicia-se esfregando um pouco da colónia que se pretende estudar com a ajuda de um palito de madeira estéril num papel de filtro previamente embebido com o reagente TMPD. O teste considera-se positivo se em poucos segundos o papel de filtro adquirir uma cor roxa-azulada no local onde foi esfregada a colónia de bactérias.

3.7. Identificação dos microrganismos através da sequenciação do gene rRNA 16S

A comparação da sequência do gene rRNA 16S de um dado organismo procariota com as sequências depositadas em bases de dados mundiais permite a sua identificação. Este método pode ser utilizado para identificar organismos isolados (culturas puras) ou para identificar a totalidade de organismos presentes numa amostra (comunidade microbiana).

De modo a identificar os microrganismos em estudo por este método, é necessário extrair o ADN, amplificar o gene rRNA 16S através da técnica de PCR, confirmar a amplificação por eletroforese em gel de agarose e finalmente a purificação dos produtos de PCR e sequenciação dos mesmos. Estes testes foram realizados no LEPABE no Departamento de Engenharia Química.

a) Extração de ADN por fervura e utilizando um Kit de extração (isolados)

Após o processo de espalhamento e respetivo período de incubação das placas de *Petri*, as diferentes colónias devem ser isoladas para que na mesma placa apenas seja possível encontrar-se visualmente e/ou através de testes (Oxidase, Catalase e Gram), apenas uma espécie de colónia.

O método de extração de ADN utilizado para as colónias puras de bactérias foi a extração de ADN por fervura (Anexo X). Neste método o material é submetido a um choque térmico para que ocorra a lise celular e há libertação de material genético (Sambrook *et al.*, 1989). Consiste em retirar, em condições estéreis, uma quantidade de biomassa das placas de *Petri* sujeitas anteriormente a isolamento e suspender em 100 µL de água ultrapura estéril (UP). Esta suspensão deve ser agitada e colocada durante 15 minutos num termobloco (FALC da Reagentes) a 100 °C. Terminados os 15 minutos, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo por um período mínimo de 5 minutos e posteriormente foram colocadas a centrifugar numa centrifugadora da Thermo Scientific a 10.000 rpm durante 2 minutos. Após se retirar os tubos de microcentrífuga (marca *ependorf*) da centrifugadora foi necessário coletar 100 µL do sobrenadante resultante da centrifugação e colocar num novo tubo de microcentrífuga. Estes tubos foram armazenados a uma temperatura de aproximadamente - 20 °C necessária para a manutenção e preservação do ADN.

Para a extração de ADN dos isolados em que não foi viável a utilização do método de extração por fervura, utilizou-se o *kit* de extração *DNA extraction kit* do laboratório *GRISP Research Solution*. Seguiu-se o protocolo do fabricante que se encontra descrito no Anexo VII.

b) Extração de ADN total das amostras (comunidade bacteriana)

As amostras a enviar para análise, foram extraídas recorrendo a um *kit* de extração (extração de DNA de solo), seguindo o protocolo otimizado no LEPABE. Foram analisadas amostras da alimentação à Lavaría do Cobre que se designou por *feed*, amostras retiradas da saída do hidrociclone do espessado antes da deposição em pasta que se designou por *paste* e amostras dos rejeitados desta lavaría que se designou por *tailings*. Para a extração de ADN utilizou-se o *kit* de extração *PowerSoil® DNA Isolation Kit* de acordo com o procedimento do fabricante para a extração do ADN da amostra pura (sem qualquer tipo de tratamento), foi necessário proceder à

centrifugação da amostra e sujeitá-la a uma série de passos descritos no Anexo VIII. Estas amostras provenientes de águas e sedimentos da mina de Neves Corvo, poderiam conter inibidores de PCR por isso decidiu-se usar BSA (Bovine Serum Albumin) na reação. O BSA é normalmente utilizado como padrão para a concentração de proteínas.

3.8. Amostras destinadas a Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S

As amostras anteriores (*feed*, *paste* e *tailings*) foram enviadas para um laboratório externo em condições apropriadas para a sua análise. Para isso o ADN foi extraído das mesmas tal como descrito no ponto anterior. As amostras foram preparadas para o sequenciamento de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana na empresa Genoinseq. O ADN foi amplificado para a região hipervariável V3-V4 com marcadores específicos e foi ainda re-amplificado numa reação limite de PCR de modo a adicionar adaptadores e índices duplos na sequenciação.

Foram realizadas as primeiras reações de PCR para cada amostra utilizando 2 x KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 0,2 µM de cada *primer* de PCR (*primer* direto: Bakt_341F 5' - CCTACGGGNGGCWGCAG - 3' e *primer* inverso Bakt_805R 5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3' (Herlemann *et al.*, 2011 e Klindworth *et al.*, 2013) e 12,5 ng de modelo de ADN num volume total de 25 µl. As condições de PCR envolveram 3 min de desnaturação a 95 °C seguido de 25 ciclos a 98 °C durante 20 s, 55 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. Foram incluídos controlos negativos em todas as reações de amplificação. A eletroforese dos produtos de PCR foi realizada em 1% (w/v) de gel de agarose e os fragmentos amplificados de 490 pb foram purificados utilizando contas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Na segunda reação de PCR adicionaram-se índices e adaptadores de sequenciamento para ambas as extremidades da região de destino amplificada utilizando 2 x KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 2,5 µl de cada índice (i7 e i5) (Nextera XT Index Kit, Illumina, San Diego, CA) e 2,5 µl do primeiro produto de PCR num volume total de 25 µl. As condições de PCR envolveram uma desnaturação de 3 min a 95 °C seguido de 8 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. A eletroforese dos produtos de PCR foi realizada em 1% (w/v) de gel de agarose e os fragmentos amplificados de 550 pb foram purificados utilizando contas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os *amplicons* foram quantificados por fluorimetria com o kit de quantificação dsDNA de PicoGreen (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), agrupados em concentrações equimolares e foram sequenciados com MiSeq® V3 chemistry, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA) em Genoinseq (Cantanhede, Portugal).

As leituras sequenciadas foram demultiplexadas automaticamente pelo sequenciador Illumina® MiSeq® utilizando o kit CASAVA (Illumina, San Diego, CA, EUA) e filtradas utilizando o Software PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011) utilizando os seguintes parâmetros: as bases com qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases foram cortadas e as leituras com menos de 150 bases foram descartadas. As leituras diretas e inversa foram combinadas pela sobreposição de leituras usando o AdapterRemoval v2.1.5 (Schubert *et al.*, 2016) com parâmetros padrão.

3.9. Quantificação de ADN

A quantificação do ADN, foi feita utilizando um aparelho denominado de fluorímetro (*Qubit™ Fluorometer Quantitation*), no programa *DNA HS* utilizando-se o kit de quantificação da

Invitrogen. Este *kit* tem uma solução tampão para adicionar nas amostras e duas soluções distintas, uma com ADN e outra sem ADN.

De modo a fazer-se a quantificação do ADN foram utilizados os seguintes reagentes: 99,5 µL de solução tampão (DNA Buffer), 5 µL de fluorocromo (DNA Hs reagente concentrate), padrão 1 (standard 1, 10 ng/µL) e padrão 2 (standard 2). Seguiu-se o protocolo normal de acordo com o fabricante em que são feitas 3 leituras distintas, a primeira com 190 µL da solução tampão e 10 µL da solução padrão com ADN, a segunda com 190 µL da solução tampão e 10 µL da solução sem ADN e a terceira em que se adiciona 199 µL da solução padrão à amostra com ADN em estudo (1 µL de ADN). A calibração é feita com as primeiras duas soluções e a leitura da amostra apresenta a concentração em µg/ml da amostra em estudo.

3.10. Técnica de PCR

A técnica de PCR baseia-se na reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica permite a amplificação de regiões do genoma em milhões de cópias, partindo de quantidades mínimas de ADN original. O PCR é bastante utilizado em vários campos da ciência devido à alta especificidade e aplicabilidade desta técnica. Devido à importância do aumento exponencial de cópias de ADN a partir de pouca quantidade deste, esta técnica permite o estudo da diversidade genética de populações e garante a quantidade de material suficiente para seguirem para o processo de sequenciação, ou seja, gera a amplificação de um grupo particular de microrganismos depois da extração de ADN. Esta técnica foi realizada no LEPABE no Departamento de Engenharia Química.

De modo a fazer-se a amplificação por PCR do gene 16S rRNA foram utilizados os seguintes reagentes: água ultrapura (UP), tampão de PCR diluído $10 \times$ (*Buffer*) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cloreto de magnésio (MgCl_2) 50 mM, dNTP's (mistura com dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs, constituintes necessários para a composição das novas bandas de ADN) 1 mM, *Primer* 27 F 100 uM, *Primer* 1492 R 100 µM, enzima ADN polimerase (Taq-DNA-polimerase) 5U/µL e ADN. Para a preparação da *master mix* utilizada na técnica de PCR em cada reação é necessária uma quantidade diferente de reagentes. As quantidades de reagentes utilizados constam no Anexo IX.

Para que a amplificação de ADN ocorra é necessário utilizar um termociclador (Personal Thermal Cycler da marca Bio Rad) que permite a combinação de diferentes intervalos de temperatura e tempo e inclui programas específicos para que ocorra a amplificação de ADN. Este programa pode igualmente ser recriado para melhoria da técnica, assim como o número de repetições por ciclo. Depois de um ciclo terminar, o processo é repetido um determinado número de vezes de acordo com o programa utilizado. Cada ciclo do termociclador apresenta três etapas distintas: a desnaturação térmica, hibridização ou *annealing* e extensão (Madigan, T., *et al.*, 2009). Durante esta técnica estas etapas ocorreram com as seguintes características: desnaturação térmica (94 °C durante 1 minuto), hibridização (55 °C durante 1 minuto) e extensão (72 °C durante 1,5 minutos). Estes ciclos foram repetidos 30 vezes.

a) Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi executada previamente ao seu envio para sequenciação. Este processo foi realizado com o auxílio do *kit* de purificação *PCR & Gel Brand Purification kit* do laboratório *GRISP Research Solution*.

Para a sua realização, seguiu-se o protocolo presente no *kit*, com algumas alterações (o método foi adaptado às condições de cada ensaio). Colocaram-se os tubos de microcentrifuga necessários à quantidade de amostras a purificar num suporte e identificaram-se corretamente. Adicionou-se 5 volumes da solução *Gel Solubilization solution* (solução presente no *kit*), de acordo com o volume de cada amostra no PCR, no caso em que foram utilizados 25 µL as reações de PCR,

foram adicionados 125 µL desta solução no filtro previamente colocado no tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 20 µL de cada amostra dos produtos de PCR e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 30 segundos. Após este tempo, descartou-se o fluido. Colocou-se o filtro num novo tubo, e adicionou-se 600 µL da solução *Wash Buffer 2x* (solução presente no *kit*) e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto. Centrifugou-se novamente entre a 14.000 rpm e durante 30 segundos e descartou-se o fluido novamente. Colocou-se o filtro de novo no tubo de microcentrífuga e centrifugou-se novamente a 14.000 rpm durante 3 minutos. Colocou-se o filtro num novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se 50 µL da solução *Elution Buffer* diretamente no filtro sem tocar na membrana, deixou-se incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Para concluir o processo, centrifugou-se a 14.000 rpm durante 2 minutos para a eluição do ADN. Descartou-se posteriormente o filtro. As amostras foram armazenadas a 4 °C até ao seu envio.

b) Sequenciação dos produtos de PCR

A sequenciação dos produtos resultantes da técnica de PCR permite a determinação da ordem dos nucleótidos (adenina, guanina, citosina e timina) presente nestes. Esta técnica não é realizada nas instalações da faculdade, sendo que as amostras, foram enviadas para as empresas Nzytech e Stabvida, onde foram sequenciadas.

As sequências enviadas pelas empresas vêm num formato digital e para o abrir é necessária uma ferramenta de edição. O programa *BioEditor (Biological Sequence Alignment Editor)* é o editor de alinhamento de sequências biológicas utilizado para este efeito. As sequências foram visualizadas e foi selecionada uma parte (com um número nucleótidos necessários para uma boa identificação) para comparação com a ferramenta *online BLAST (Blast Local Alignment Search Tool)*. Nesta ferramenta, apenas é necessário inserir a sequência selecionada no *BioEdit* e esta procede à pesquisa das sequências existentes na literatura, comparando-as, e indicando todos os artigos existentes com sequências iguais ou semelhantes, assim como a percentagem de similaridade relativamente a estas. Esta literatura indica o microrganismo em estudo, assim como todas as suas categorias taxonómicas e a pessoa responsável pela sua descrição. Posteriormente foi utilizada a ferramenta *EzBioCloud* para a comparação das sequências obtidas com as sequências-tipo do banco de dados da *Ez Taxon*.

3.11. Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose é uma técnica em que fragmentos de ADN são “empurrados” por uma corrente elétrica através de uma matriz de gel, que separa os fragmentos de ADN de acordo com o seu tamanho. Um padrão, é normalmente incluído para que o tamanho dos fragmentos nas amostras da PCR possa ser determinado. O princípio desta técnica baseia-se em que cadeias maiores demoram mais tempo para passar pelos poros no gel e cadeias menores viajam mais rapidamente através dele. A distância que o fragmento percorre a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. A eletroforese permite a separação de RNA, DNA, proteínas e enzimas, pela migração destas num gel (gel de agarose) durante a aplicação de um potencial elétrico. A distância que o fragmento percorre é comparada com um padrão de peso molecular que tem fragmentos de tamanhos conhecidos (Grumann, 2017).

Os resultados da reação de PCR são normalmente visualizados através da utilização da eletroforese em gel de agarose. A agarose é um polissacarídeo em forma de pó e quando suspenso em solução aquosa e aquecido dissolve-se completamente enquanto a temperatura vai diminuindo. Quando ainda se encontra na fase líquida é colocado num molde que lhe dará a forma de um bloco e ao mesmo tempo são feitos pequenos furos (poços) numa das suas extremidades, perpendicularmente ao seu comprimento utilizando um “pente”. Estes poços recebem o produto

do PCR. Para a execução da eletroforese é necessário colocar numa tina o meio de suporte (gel de agarose), a solução-tampão onde vai ser imerso o gel e elétrodos na extremidade da tina.

Para a preparação do gel de agarose foi necessário preparar uma solução com os seguintes constituintes (Anexo XI): 1,8 g de agarose (1,5% agarose em TAE) e 120 mL de solução TAE (Tris, Acetato, EDTA) 1×. Esta solução foi colocada a aquecer numa placa térmica com agitador até atingir o estado de ebulição. Quando esta solução solidificou, com o auxílio de utensílios próprios (pentes) criaram-se pequenas aberturas no gel (poços) onde vão ser introduzidos os produtos da técnica de PCR. Para fazer correr a eletroforese é necessário a utilização de dois reagentes: o gel *loading buffer* e o *ladder*. O *ladder* é um reagente que funciona como marcador. O *loading buffer* é um gel que contém glicerol na sua composição e que vai aumentar a densidade das amostras, fazendo com que estas não saiam dos poços, além de dar coloração que serve como indicador do progresso do gel na tina de eletroforese. Este reagente vai ser adicionado ao produto da PCR antes de ser colocado no poço. Para além das amostras de ADN deve ser colocado no gel um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo positivo deve ser uma amostra conhecida em que se sabe que ocorre a formação de banda e o controlo negativo, pelo contrário, não deve aparecer a banda no gel. Para este controlo pode ser utilizada água ultrapura para o efeito. Se um destes controlos não ocorrer, a técnica de PCR deve ser repetida novamente visto poder tratar-se de uma contaminação.

As condições da eletroforese utilizadas foram as seguintes: agarose (1,5%), 90 V (40 minutos), volume de marcador (2,5 µL) e volume da amostra (5 µL + 3 µL de *Loading dye*). Depois de terminado este processo o gel pode ser retirado da tina e colocado em brometo de etídio durante 15 minutos. Este reagente é utilizado para a coloração de géis, identificando fragmentos de ácidos nucleicos gerando complexos fluorescentes. Terminados os 15 minutos, o gel pode ser colocado no transiluminador sob luz ultravioleta. A imagem do gel pode ser observada utilizando o software para a visualização das imagens (Quantity One 4.6.9.). Depois da visualização da imagem pode-se verificar quais as amostras que tiveram arrastamento e em que bandas.

3.12. Obtenção de Culturas de Inóculo

Ao longo do trabalho laboratorial foram preparadas diferentes culturas com o propósito de analisar a sua capacidade para a biolixiviação de metais. Estas culturas vão ser descritas nesta secção (fig. 10). Tendo em consideração que as culturas preparadas inicialmente não possuíam um número de microrganismos suficiente para realizar o processo de biolixiviação foram excluídas sendo que os resultados referentes às culturas preparadas utilizando estas amostras se apresentam no Anexo I.

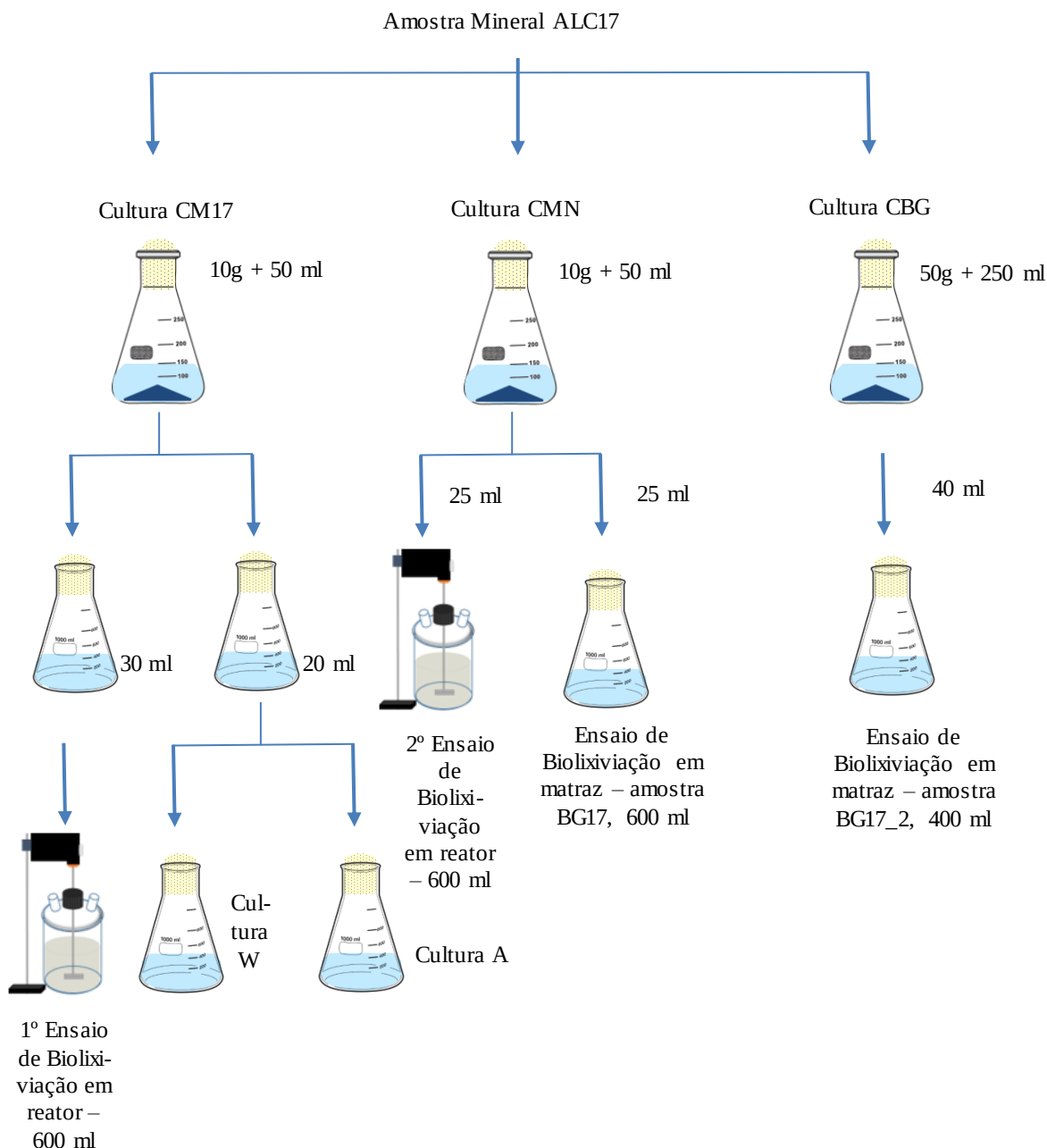


Figura 10 – Esquema exemplificativo da preparação das culturas que serviram de inóculo aos ensaios de biolixiviação em reator e matraz.

i) Cultura CM17

Como inóculo do ensaio inicial de biolixiviação em reator utilizou-se uma cultura constituída por 50 mL de meio TB e 10 g de amostra ALC17, a esta cultura chamou-se de cultura CM17 (cultura mãe). Esta cultura foi colocada a incubar durante 7 dias a 26 °C e a 140 rpm, o pH foi ajustado inicialmente a 7. De modo a promover o crescimento das colónias bacterianas, fez-se transferências periódicas de inóculo para meio mineral fresco. Desta forma garante-se a alimentação dos microrganismos com nutrientes frescos e faz-se simultaneamente uma seleção dos microrganismos que melhor se adaptam ao meio mineral. Esta cultura, para além de servir de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação, permitiu preparar duas culturas tal como esquematizado na fig. 10. A cultura CM17 foi dividida por dois matrizes, um contendo 20 mL e

outro contendo 30 mL. À cultura constituída por 30 mL da cultura CM17 foi acrescentado meio mineral TB até esta ficar com um volume final de 600 mL. Esta cultura serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação. Os restantes 20 mL que constituíam a cultura CM17 serviram para a preparação de duas novas culturas: a cultura A e a cultura W, cada uma constituída inicialmente por 10 mL.

ii) Cultura A

Nesta cultura diminuiu-se o pH a 4,7 (pH ácido), e designou-se de cultura A (Ácido). Esta cultura foi preparada de modo a verificar se os microrganismos seriam resistentes a ambientes ácidos. A cultura foi preparada e deixada em incubação a 140 rpm e a 26 °C. Após 7 dias de incubação procedeu-se a espalhamentos em placas de *Petri*. A enumeração dos microrganismos cultiváveis nestas culturas foi feita após 7 dias de incubação das placas.

iii) Cultura W

A cultura a que se chamou de Cultura W foi preparada com o propósito de verificar se os microrganismos presentes na cultura original seriam resistentes a ambientes com altas concentrações de tungsténio. Fez-se esta experiência porque as amostras provenientes da mina da Panasqueira (amostras BG17 e BG17_2) possuíam uma elevada concentração de tungsténio que poderia ser tóxica para as bactérias autóctones provenientes da mina de Neves Corvo, o que poderia inviabilizar os ensaios de biolixiviação. Nesta cultura foram colocadas diluições de uma solução padrão com concentrações crescentes de W. A cultura foi preparada e deixada em incubação a 140 rpm e a 26 °C, o pH foi ajustado inicialmente a 7.

Inicialmente fez-se espalhamentos em placas de *Petri* da cultura original (cultura W), sem se colocar a solução padrão de W (após 7 dias de incubação da cultura). Após este tempo colocou-se nesta cultura 0,084 µL de solução padrão de W de modo a que a cultura ficasse com 15 µM de concentração de tungsténio no meio. Após 7 dias de incubação da cultura, fez-se novos espalhamentos em placas de *Petri* e após este tempo transferiu-se 10% da cultura para um novo balão de *Erlenmeyer* contendo meio fresco, ou seja, transferiu-se 3 mL de cultura para 27 mL de meio mineral TB. Aumentou-se nesta cultura a concentração em tungsténio, ficando esta cultura com 75 µM de concentração de W. Ao longo do tempo repetiu-se o processo aumentando sucessivamente a concentração de W nas transferências seguintes da cultura até uma concentração final de 3075 µM de concentração de W.

iv) Cultura CMN

Foi preparada uma nova cultura de modo a servir de inóculo aos ensaios de biolixiviação em reator e matraz. Esta cultura foi preparada utilizando 10 g da amostra ALC17 e 50 mL de meio mineral TB, a que se chamou de NCM (nova cultura mãe). A cultura foi preparada e deixada em incubação a 140 rpm e a 26 °C e o pH foi ajustado inicialmente a 7.

Esta cultura foi dividida em duas culturas de 25 mL, a cultura M (utilizada no ensaio de biolixiviação em Matraz) e cultura R (utilizada no ensaio de biolixiviação em Reator). A estas culturas juntou-se meio mineral fresco até ficarem com um volume final de 600 mL. A cultura M serviu de inóculo ao ensaio de biolixiviação em matraz contendo 30 g de uma amostra sólida dos rejeitados da Mina da Panasqueira (BG17). A cultura R serviu de inóculo ao ensaio de biolixiviação em reator contendo 30 g de uma amostra sólida da alimentação da lavaria do cobre da mina de Neves Corvo (ALC17).

v) Cultura CBG

A cultura que serviu de inóculo ao segundo ensaio de biolixiviação em matraz era constituída por 50 g de amostra ALC17 e 250 mL de meio de cultura TB, após uma semana de incubação transferiu-se 40 mL desta cultura e perpez-se com meio TB fresco de modo a ficar com 400 mL de volume final. A cultura foi preparada e deixada em incubação a 140 rpm e a 26 °C, o pH foi ajustado inicialmente a 7.

3.13. Ensaaios de Biolixiviação

3.13.1. Ensaio inicial de Biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17

De modo a familiarizar com os procedimentos necessários aos ensaios de biolixiviação em reator fez-se um ensaio inicial utilizando a cultura CM como inóculo, preparada anteriormente. O objetivo deste ensaio foi quantificar o potencial lixiviante desta cultura bem como a quantificação dos metais de interesse na amostra e a identificação dos microrganismos envolvidos no processo de biolixiviação. Este ensaio focou-se no estudo da evolução da concentração dos metais de interesse na amostra ALC17. Antes de se poder lixiviar esta amostra foi necessário esterilizá-la recorrendo ao método de tindalização. O método de tindalização consiste numa esterilização fracionada em que durante três dias consecutivos o meio é submetido a três aquecimentos à temperatura de 121°C durante 15 minutos de modo a destruir qualquer forma vegetativa bacteriana que evoluem de esporos (Penn, C, 1991).

As características deste ensaio foram as seguintes:

- A relação sólido-líquido utilizada neste ensaio foi de 1:5, ou seja, 30 g de minério (amostra ALC17) para 600 mL de solução (meio mineral TB);
- Inicialmente o pH foi ajustado a 7 com uma solução estéril de NaOH (1 M);
- A temperatura foi mantida constante (26 °C) com recurso a um banho que circulava água dentro da camisa do reator;
- O tempo de residência desde ensaio foi de 32 dias.

3.13.2. Ensaio de Biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 e ensaio de Biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17

As características destes ensaios de biolixiviação foram semelhantes ao primeiro, apenas variando a temperatura e o pH. As culturas que serviram de inóculo a estes ensaios foram a cultura R e a cultura M preparadas anteriormente. As características destes ensaios foram as seguintes:

- O tempo de residência dos dois ensaios foi de 32 dias;
- Os ensaios mantiveram-se a temperatura ambiente;
- A relação sólido-líquido utilizada foi de 1:5, ou seja, 30 g de minério (amostra ALC17 e amostra BG17) para 600 mL de solução (meio mineral TB);
- Inicialmente o pH foi ajustado a 4,7 utilizando uma solução estéril de H₂SO₄ (1M) em ambos os ensaios.

3.13.3. Ensaios de controlo abióticos utilizando as amostras ALC17 e BG17

Estas culturas eram constituídas por 600 mL de meio mineral líquido TB e 30 g de amostra, a amostra ALC17 no caso do ensaio de controlo abiótico para o ensaio de biolixiviação em reator e a amostra BG17 no caso do ensaio de biolixiviação em matraz. As amostras foram esterilizadas recorrendo ao método de tindalização.

Estas soluções foram desenvolvidas com o objetivo de servir como controlo na quantificação de metais e sulfatos em solução no processo de biolixiviação e para verificar a ausência de crescimento de comunidades bacterianas em meio de cultivo, de forma a ser possível descartar a existência de possíveis contaminações. As características destes ensaios foram as mesmas dos ensaios bióticos correspondentes, ou seja, os ensaios mantiveram-se a temperatura ambiente, a relação sólido-líquido utilizada foi de 1:5 e inicialmente o pH foi ajustado a 4,7. Para ambas as culturas foram efetuados dois espalhamentos, para a o primeiro foi usada a amostra pura (sem diluição), no segundo o fator de diluição utilizado foi 1:10. Estes espalhamentos foram efetuados para o dia 0 e dia 32 de incubação.

3.13.4. Ensaio de Biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2

O segundo ensaio de biolixiviação em matraz foi preparado utilizando como minério a amostra BG17_2 e a cultura que serviu de inóculo a este ensaio foi a cultura CBG descrita anteriormente. As características deste ensaio foram as seguintes:

- O tempo de residência do ensaio foi de 32 dias;
- O ensaio manteve-se a temperatura ambiente;
- A relação sólido-líquido utilizada foi de 1:5, ou seja, 20 g de minério (amostra BG17_2) para 400 mL de solução (meio mineral TB);
- Não foi feito um ajuste inicial de pH. O pH inicial da cultura que serviu de inóculo a este ensaio de biolixiviação foi ajustado a 7.

3.14. Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo

A análise microscópica das amostras sólidas utilizadas nos ensaios de biolixiviação (ALC17 e BG17) foi realizada recorrendo à técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS) (Scanning electron microscopy) no Centro de Materiais na Universidade do Porto (CEMUP). O exame SEM/EDS foi realizado utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com Microanálise por Raios-X e Análise de Padrões de Difração de Eletrões Retrodifundidos (Quanta 400FEG ESEM/EDAX Genesis X4M). Esta microanálise melhora a observação das estruturas superficiais e a sua interpretação permitindo a quantificação de elementos da composição da superfície.

Previamente a esta análise foi necessário preparar as amostras seguindo o protocolo descrito no Anexo XII. Foram analisadas amostras retiradas nos dias 0, 7, 21 e 32 de incubação resultantes do primeiro ensaio de biolixiviação (amostra ALC17) e as amostras retiradas nos ensaios de biolixiviação seguintes nos dias 0 e 32 (amostra ALC17 e BG17). As amostras foram revestidas com um filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (*sputtering*), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater. As amostras foram revestidas durante 100 segundos e com uma corrente de 15 mA.

3.15. Determinação da concentração de Metais dissolvidos

A concentração de metais dissolvidos nas amostras da fase líquida dos ensaios de biolixiviação foi determinada recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (EAA por chama) e EAA em câmara de grafite no LSRE - Laboratory of Separation and Reaction Engineering.

A EAA é uma técnica analítica de deteção qualitativa e determinação quantitativa de determinados elementos, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. A sua elevada sensibilidade, torna este método adequado para a análise de microelementos ou elementos vestigiais, presentes como impurezas ou como componentes normais de amostras. Esta

técnica baseia-se na medição da quantidade de radiação absorvida o que permite determinar quantitativamente o elemento presente. Quando a radiação, com um comprimento de onda adequado, incide num grupo de átomos livres, no seu estado fundamental, os átomos podem absorver esta radiação, passando para um estado excitado (absorção atómica).

A espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite designa-se deste modo porque o dispositivo onde ocorre a atomização é normalmente um pequeno tubo de grafite. A amostra no estado líquido, suspensão ou no estado sólido, é introduzida num forno ou câmara de grafite, a qual é sujeita a um aquecimento progressivo previamente programado. O programa de temperaturas aplicado à câmara depende do elemento a analisar e da matriz da amostra. A precisão e exatidão dos resultados obtidos por esta técnica relacionam-se com o tempo e temperatura programados.

Para se proceder à quantificação dos metais dissolvidos foi necessário retirar amostras de 40 – 50 ml e ajustar o pH das mesmas a 4 – 4,5 com recurso a ácido nítrico (HNO_3) [0,2 M]. Antes de serem enviadas, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14.000 rpm. As amostras foram colocadas em tubos Falcon estéreis de 50 ml. Os tubos Falcon foram centrifugados na centrífuga refrigerada *Eppendorf 5804 R*. Depois da centrifugação colocou-se o líquido num novo tubo Falcon estéril. Esta amostragem foi feita nos dias 0, 7, 21 e 32 de incubação dos ensaios de biolixiviação para a quantificação dos metais em solução e nos dias 0 e 32 para os respetivos controlos (cultura abiótica).

3.16. Determinação da concentração dos Sulfatos em solução

Para a determinação da concentração de sulfatos nas amostras, foi utilizado o método turbidimétrico. Este método baseia-se no facto do ião sulfato precipitar em ácido acético médio, com cloreto de bário, de forma a originar cristais de sulfato de bário de tamanho uniforme. A luz de absorvância da suspensão de SO_4^{2-} determina-se comparando a leitura efetuada com a curva padrão. Para a realização deste método foi necessário a utilização de um Espectrofotómetro (Genesys 10UV scanning) da marca *Thermo Scientific* em que se utilizou um comprimento de onda de 420 nm. Esta análise foi efetuada no laboratório LCA – Laboratório de Ciências do Ambiente.

O procedimento utilizado para a determinação de sulfato foi o seguinte: filtrou-se 25 ml da amostra com um filtro de fibra de vidro e adicionou-se 10 ml da solução *buffer* A (dissolveu-se 30 g de cloreto de magnésio hexahidratado, 5 g de acetato de sódio, 1,0 g de nitrato de potássio, e 20 ml de ácido acético em 500 ml de água destilada a posteriormente perfez-se até 1000 ml) e agitou-se esta solução. Posteriormente, em agitação constante, adicionou-se 0,1 g de cloreto de bário e agitou-se durante 60 segundos e leu-se as respetivas absorvâncias (Clesceri, et al., 1999).

A concentração de sulfatos foi obtida a partir da seguinte curva de calibração (e respetivo erro):

$$y = 9.49 \times 10^{-3}x - 3.58 \times 10^{-3} \quad [16]$$

$$R^2 = 0.999$$

Na equação anterior, o termo y representa a absorvância e o termo x representa a concentração de SO_4^{2-} em mg/l. Ao termo x deve ser multiplicado o fator de diluição caso as amostras em análise se encontrassem fora da curva de calibração. Esta medição foi efetuada para os dias 0, 7, 21 e 32 de incubação dos ensaios de biolixiviação (utilizando as amostras ALC17, BG17 e BG17_2) e nos dias 0 e 32 para os respetivos controlos (culturas abióticas) e para o ensaio inicial de biolixiviação em reator (utilizando a amostra ALC17) para quantificação dos sulfatos em solução.

4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após os procedimentos descritos no Capítulo 3, foi possível alcançar resultados sobre os microrganismos autóctones cultiváveis presentes nas amostras representativas do processo inicial da lavaria do cobre da Mina de Neves Corvo cedidas pela empresa SOMINCOR (Sociedade Mineira de Neves Corvos, S.A.) e das amostras provenientes dos resíduos da mina da Panasqueira cedidas pela empresa Beral Tin & Wolfram. Os resultados obtidos, assim como a sua análise e discussão serão apresentados nesta secção.

4.1. Caracterização das amostras

Relativamente à amostra ALC17, foram efetuados trabalhos referentes à enumeração e isolamento de microrganismos cultiváveis para a posterior extração de ADN, aplicaram-se as técnicas necessárias para obtenção das sequências de nucleótidos fundamentais para a identificação dos mesmos, fez-se também a análise química e granulométrica desta amostra. No caso das amostras BG17 e BG17_2, foram caracterizadas química e granulometricamente tal como a amostra ALC17.

i) Análise Granulométrica

As curvas granulométricas representadas nas fig. 11 a 14 apresentam a leitura da fração fina das amostras analisadas no Granulómetro de raios laser (ALC17, BG17 e BG17_2). Quando se representam dados resultantes da análise granulométrica, obtém-se habitualmente uma curva na forma de um S, que pode ser mais vertical ou suavizada, de acordo com a amostra, ou seja, se a amostra é bem ou mal equilibrada.

A fig. 11 representa a curva granulométrica da amostra utilizada no primeiro ensaio de biolixiviação (ALC17). Em termos de granulometria, 40% da amostra tem granulometria inferior a 150 μm . Destes 40%, a amostra caracteriza-se por um $d(10) = 318,167 \mu\text{m}$, ou seja, 10% do material tem diâmetro inferior a 318,167 μm , $d(50) = 901,758 \mu\text{m}$, isto é, 50% do material tem calibre inferior a 901,758 μm e $d(90) = 1481,685 \mu\text{m}$, o que significa que 90% do material tem calibre inferior a 1481,685 μm .

De forma a testar o efeito da granulometria na eficiência do ensaio de biolixiviação a amostra ALC17 foi sujeita a uma segunda moagem no moinho de anéis durante 45 segundos e a fração fina foi analisada recorrendo ao Granulómetro de raios laser. O resultado desta análise encontra-se na fig.12.

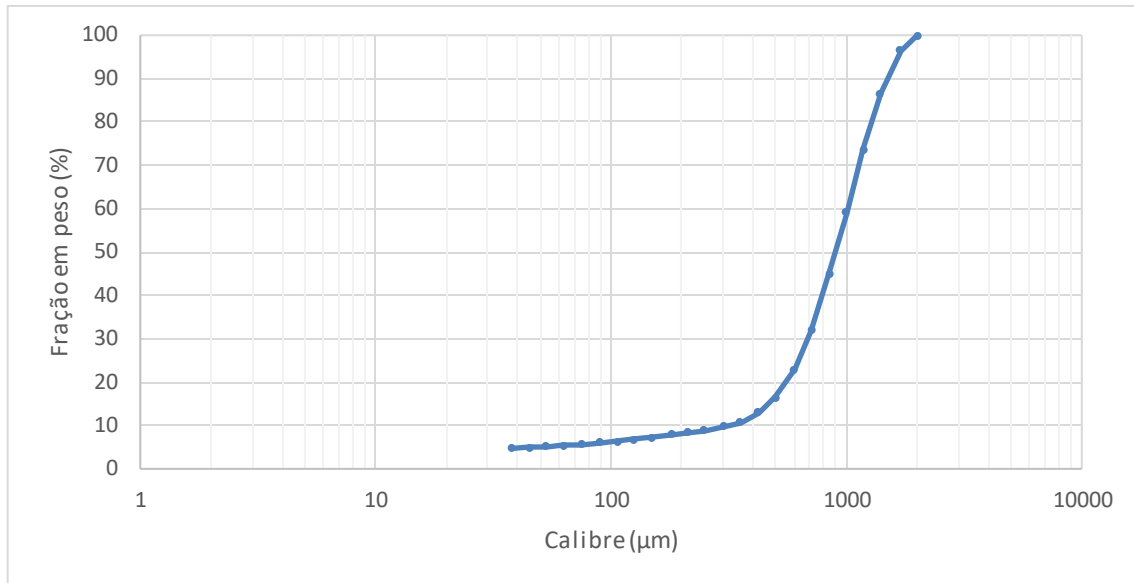


Figura 11 – Curva granulométrica da fração fina da amostra ALC17.

Em termos de granulometria, 40% da amostra tem granulometria inferior a 150 μm. Pelo aspeto do gráfico (fig. 12) pode-se concluir que a curva não é perfeita, ou seja, a amostra apresenta dois tipos de partículas, umas de granulometria maior ou eventuais aglomerados de partículas finas e outras de granulometria menor. Em termos de granulometria, a amostra caracteriza-se por um $d(10) = 2,465 \mu\text{m}$, $d(50) = 29,007 \mu\text{m}$ e $d(90) = 267,211 \mu\text{m}$.

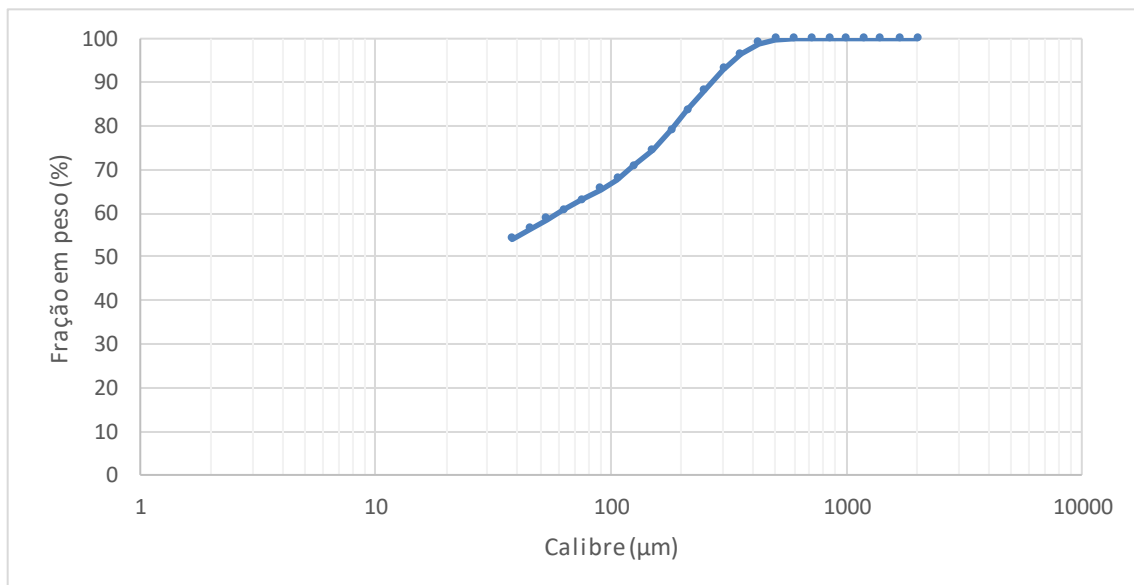


Figura 12 – Curva granulométrica da fração fina após nova moagem da amostra ALC17.

É possível observar a análise granulométrica da amostra BG17 (fração fina) na fig. 13, tal como na amostra anterior, a curva não é perfeita. A amostra BG17 possui cerca de 43% de partículas com granulometria inferior a 150 μm . A amostra caracteriza-se por um $d(10) = 3,356 \mu\text{m}$, $d(50) = 64,74 \mu\text{m}$ e $d(90) = 370,301 \mu\text{m}$.

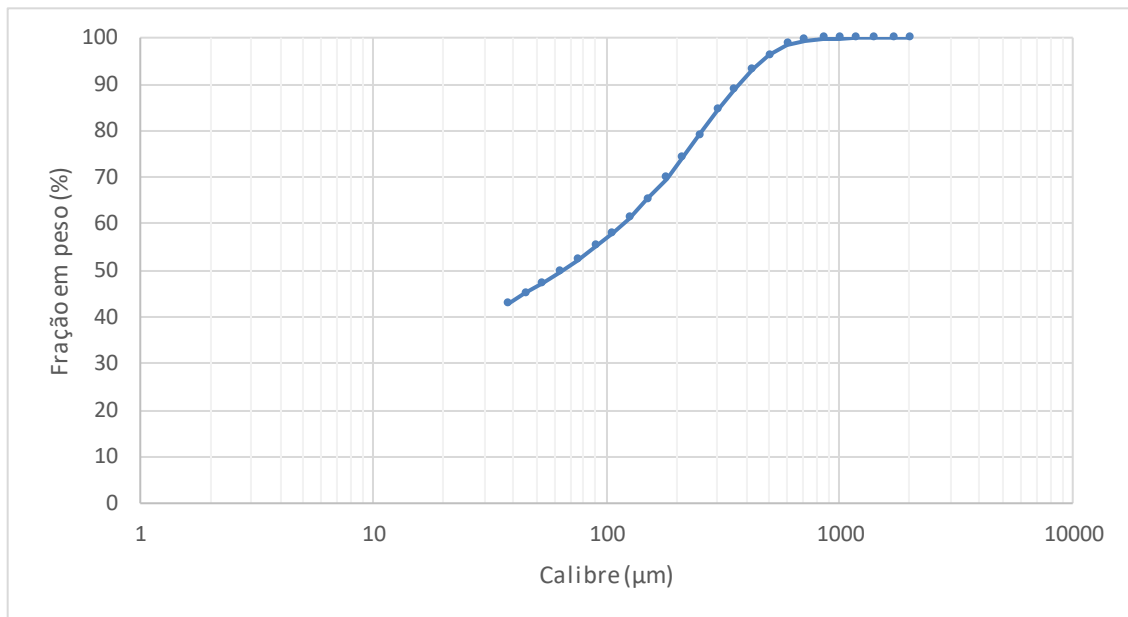


Figura 13 - Curva granulométrica da fração fina da amostra BG17_2.

A curva granulométrica da fração fina da amostra BG17_2 encontra-se na fig. 14. Em termos de granulometria, a amostra caracteriza-se por um $d(10) = 37,022 \mu\text{m}$, $d(50) = 511,664 \mu\text{m}$ e $d(90) = 1032,276 \mu\text{m}$.

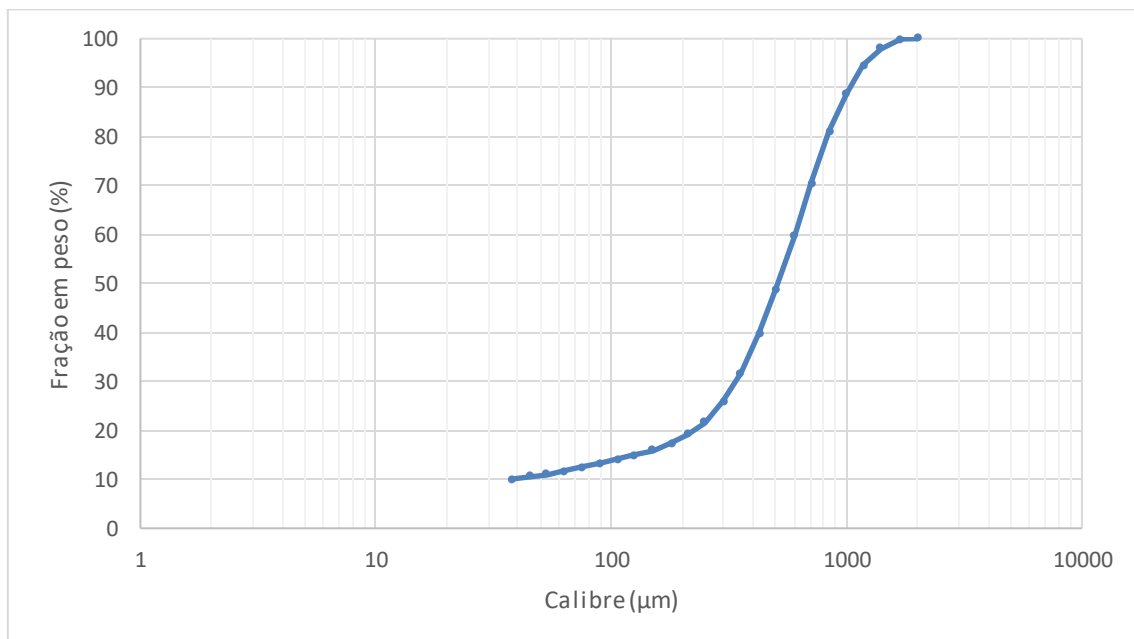


Figura 14 – Curva granulométrica da fração fina da amostra BG17.

ii) Análise Química

Na tabela seguinte (Tabela 1) apresentam-se a composição química das amostras sólidas utilizadas nos ensaios de biolixiviação (amostra ALC17, BG17 e BG17_2) utilizando o Analisador de Metais Pesados por Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva.

Tabela 1 - Composição química das amostras proveniente da mina de Neves Corvo (ALC17) e das amostras provenientes da mina da Panasqueira (BG17 e BG17_2).

Elemento – Concentração (ppm)								
Amostra	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Co	Cu	Zn
ALC17	13941	10260	3712	1242	287058	375	2721	12469
BG17	14544	461	2662	1117	258015	-	7081	16203
BG17_2	27049	4339	4729	1106	90908	-	2479	6135
Elemento – Concentração (ppm)								
Amostra	As	Se	Rb	Sr	Zr	Nb	Cd	Sn
ALC17	5637	72	64	67	129	26	116	1569
BG17	171099	88	171	-	108	20	205	711
BG17_2	20458	-	473	71	25	1,8	112	305
Elemento – Concentração (ppm)								
Amostra	Sb	Pb	Mo	Ba	Cr	W	Hg	Bi
ALC17	411	4346	26	1261	-	-	-	-
BG17	78	-	-	-	62	5006	625	129
BG17_2	-	-	-	-	-	1438	40	-

Da Tabela 1 destaca-se o ferro (Fe) como o constituinte mineral em maior percentagem na amostra ALC17. O zinco (Zn), cálcio (Ca) e potássio (K) também se encontram em elevada percentagem nesta amostra. Desta tabela conclui-se que existem dois constituintes minerais em maior percentagem na amostra BG17, o ferro (Fe) e o arsénio (As) encontrando-se também altas percentagens de potássio (K) e zinco (Zn). Os constituintes principais da amostra BG17_2 são o ferro (Fe), arsénio (As) e potássio (K), mas também se encontram em grande percentagem o zinco (Zn) e o titânio (Ti).

4.2. Enumeração dos microrganismos cultiváveis

Neste subcapítulo apresentam-se os resultados obtidos relativamente à enumeração dos organismos cultiváveis nas culturas utilizadas nos ensaios de biolixiviação. Não foram contabilizados os valores de todas as contagens efetuadas, mas apenas das quais se consideram que as contagens das unidades formadoras de colónias de bactérias eram fiáveis, nomeadamente, as placas que continham entre trinta e trezentas UFC.

i) Cultura A

Foi possível verificar que a diminuição do pH do meio a 4,7 não influenciou o crescimento das unidades formadoras de colónias que se mantiveram relativamente constantes ao longo do ensaio, diminuindo apenas a partir de 23 dias de incubação da cultura tal como se pode verificar na fig. 15.

Relativamente à evolução da comunidade bacteriana no meio de cultivo R2A agar, verificou-se, a partir da observação das placas de *Petri* em diferentes períodos de incubação, que o tamanho das unidades formadoras de colónias (UFC) praticamente duplicou após 7 dias de incubação. As UFC, visualmente, evidenciavam o aparecimento de uma tonalidade mais amarelada do que em apenas dois dias de incubação. Foi igualmente observado que algumas colónias adquiriram uma

forma irregular nas extremidades. A partir dos sete dias de incubação não foi observada a formação de novas colónias.

As unidades formadoras de colónias da cultura A mantiveram a mesma morfologia colonial das bactérias identificadas no ensaio inicial de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 (Anexo V). Estes isolados encontram-se descritos no subcapítulo 4.3.1.2.

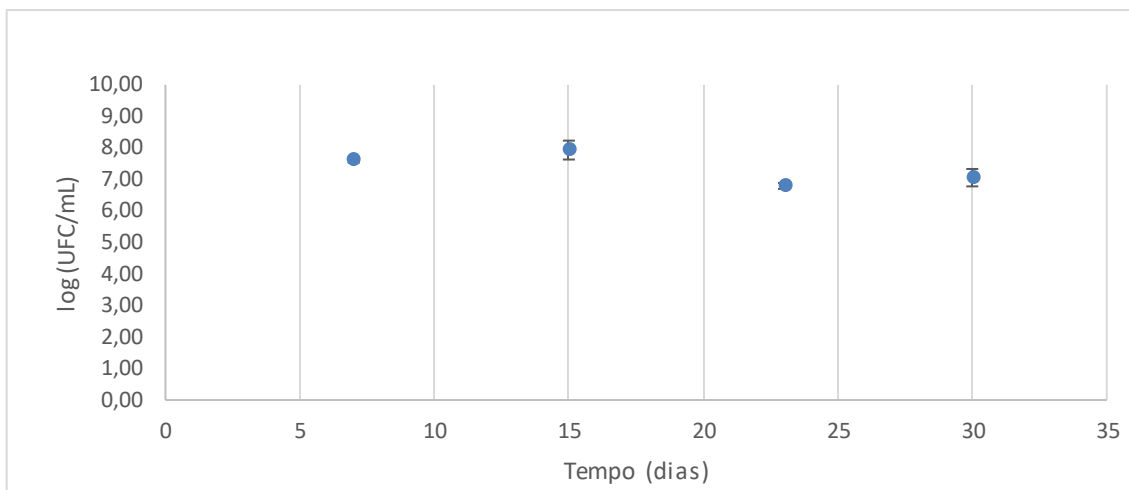


Figura 15 - Evolução de log(UFC/mL) ao longo de 30 dias de cultura com pH ácido (Cultura A).

ii) Cultura W

Desta experiência foi possível concluir que as bactérias presentes na cultura CM17 eram resistentes a ambientes com elevadas concentrações de tungsténio pois o número das unidades formadoras de colónias manteve-se sensivelmente constante até ao final do ensaio, utilizando concentrações de tungsténio cada vez mais elevadas (fig. 16). Estas bactérias toleravam ambientes com concentração em W até 3075 μM . Após o primeiro incremento da concentração de W na cultura inicial, observou-se o aparecimento de quatro tipos diferentes de unidades formadoras de colónias.

Foi igualmente observado que algumas unidades formadoras de colónias adquiriram uma forma irregular nas extremidades ao fim de 7 dias de incubação. A partir dos sete dias de incubação não foi observada a formação de novas colónias. A caracterização destes isolados encontra-se descrita na Tabela 2.

No Anexo IV é possível observar uma ilustração das placas de *Petri* com os diferentes tipos de colónias formadas após um tempo de incubação de sete dias em meio de cultivo R2A agar da cultura com concentração 3075 μM de W.

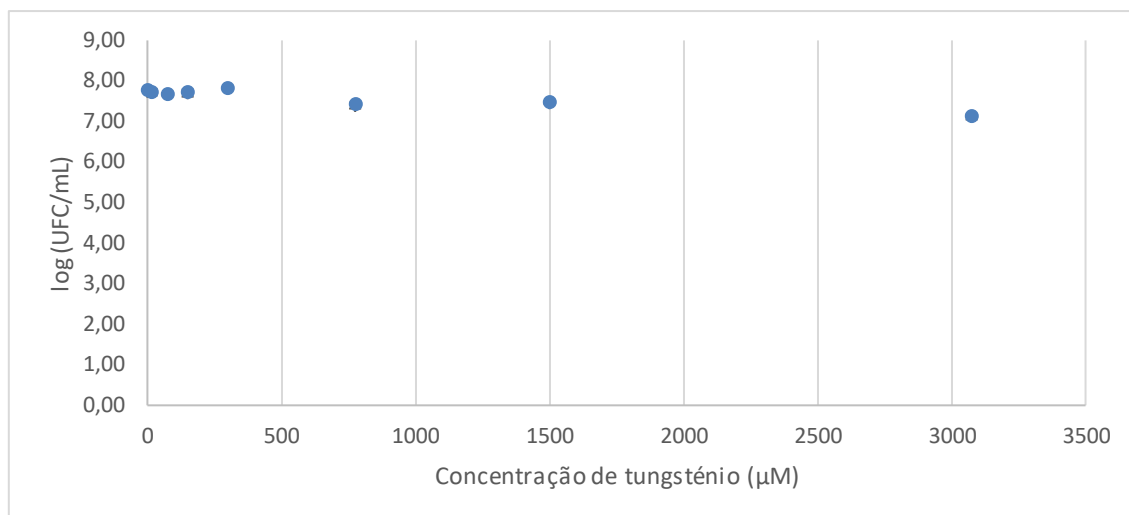


Figura 16 - Evolução de log (UFC/mL) ao longo de 7 dias de incubação com concentrações de W crescentes.

Tabela 2 - Caracterização dos isolados identificados na cultura de W com concentração 3075 µM de W.

Nome	Cor	Margem	Tamanho (mm)	Forma	Elevação	Brilho	Opacidade	Morfologia	Coloração de Gram	Teste de Oxidase	Teste de Catalase
W17A1	Amarela	Inteira	1,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	-	+	+
W17A2	Amarela	Inteira	0,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Cocos	+	-	+
W17B1	Beges	Ondulada	6	Circular	Crateriforme	Brilhante	Transparente	Bacilos	+	+	+
W17B2	Bege	Inteira	3	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	-	+	+

Após o isolamento das colónias identificadas na cultura W, foi possível executar a técnica de extração de ADN de acordo com os procedimentos anteriormente descritos (Extração de ADN por fervura e *Kit* de extração de ADN). Embora se tenha tentado amplificar o gene rRNA 16S de cada uma das estirpes isoladas, foram precisas várias tentativas para que se conseguisse obter amplificação do ADN. O fato de não ter ocorrido amplificação pode estar relacionado com vários motivos, tais como: fatores relacionados com a qualidade do ADN extraído; fatores relacionados com a técnica de PCR ou algum erro na manipulação dos reagentes utilizados; fatores relacionados com a concentração de agarose, que pode influenciar a porosidade do gel que por sua vez tem influência na capacidade de migração do ADN; fatores relacionados com o tempo de corrida e a voltagem aplicada, como tal foi necessário repetir este procedimento até que fosse possível obter a amplificação do gene rRNA 16S de todos os isolados identificados.

A análise da imagem da eletroforese em agarose (fig. 17) permitiu concluir que houve amplificação do ADN em todos os poços exceto no poço 9 como seria de esperar (controlo negativo).

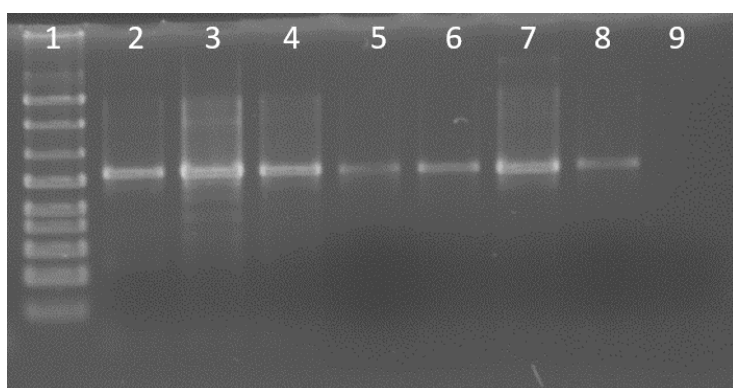


Figura 17 - Eletroforese dos produtos de ampliação do gene rRNA 16S dos isolados da cultura CM e da Cultura W: 1) ADN ladder, 2) R17TB1, 3) R17TB2, 4) R17TB3, 5) R17TB5, 6) R17TA3, 7) W17A1, 8) Controlo positivo, 9) Controlo negativo.

Após a amplificação do gene rRNA 16S procedeu-se à sequenciação dos isolados. As sequências foram analisadas utilizando o *BioEdit* (editor de alinhamento de sequências biológicas) e cortadas as sequências de nucleótidos com maior qualidade, com picos agudos e regularmente separados. Posteriormente procedeu-se à análise das sequências obtidas, comparando-as com outras disponíveis em bases de dados mundiais através da ferramenta *online BLAST* (*Blast Local Alignment Search Tool*) e na base de dados *online EzBioCloud* em *EzTaxon*. A utilização desta última base de dados permitiu calcular a percentagem de similaridade entre a sequência de cada um dos isolados com a sequência das estirpes tipo das espécies mais próximas.

Na tabela seguinte (Tabela 3) é possível observar os resultados da comparação das sequenciações obtidas com bases de dados resultantes da identificação dos isolados identificados na Cultura W.

Tabela 3 - Identificação das estirpes isoladas a partir da cultura W em comparação com a base de dados EzBioCloud em EzTaxon.

Identificação da amostra	Posições do fragmento analisado (pb)	Nome Científico	Filo	% Similaridade sequencia gene 16S rRNA	Type strain
W17A1	64,1	<i>Sphingopyxis terrae</i>	Proteobacteria	64,1	NBRC 15098 ^T
W17A2	992	<i>Agrococcus carbonis</i>	Actinobacteria	68,7	G4 ^T
W17B1	904	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	99,0	ATCC 17588 ^T
W17B2	1014	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	Proteobacteria	71,9	S37 ^T

Após a identificação dos isolados fez-se uma breve descrição de cada um dos isolados identificados na cultura W.

- *Sphingopyxis terrae*, este tipo de bactérias foi isolado a partir de lama ativada. Este tipo de bactérias classifica-se como gram-negativas, catalase positivas e oxidase positivas (Ohtsubo, Y., *et al.*, 2016).
- *Agrococcus carbonis*, este tipo de bactérias foi isolado a partir de uma mina de carvão. Classificam-se como gram-positivas, catalase positivas e oxidase negativas não móveis e aeróbias. As colónias são circulares e de cor amarela (Dhanjal, S. *et al.*, 2011).
- *Sphingopyxis chilensis*, estas bactérias classificam-se como gram-negativas, móveis, catalase e oxidase positivas. As colónias são circulares e convexas com margens inteiras, de cor amarela e com 2 mm de diâmetro após 3 dias de incubação. Este tipo de bactérias foi isolado de sedimentos superficiais de um rio contaminado com compostos clorofenólicos em Concepción, Chile (F. Godoy, *et al.*, 2003).
- *Pseudomonas stutzeri*, classificam-se como bactérias gram-negativas, catalase e oxidase positivas, inicialmente isoladas a partir do líquido da coluna vertebral humana (Lalucat, J. *et al.*, 2006).

4.3. Ensaios de Biolixiviação

Nos próximos subcapítulos descrevem-se os resultados obtidos a partir dos ensaios de biolixiviação efetuados com as amostras ALC17, BG17 e BG17_2.

4.3.1. Ensaio inicial de Biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17

4.3.1.1. Enumeração dos microrganismos Cultiváveis

Os resultados obtidos relativamente à enumeração dos organismos cultiváveis e a variação do pH ao longo do primeiro ensaio de biolixiviação são os apresentados na fig. 18. A contagem das unidades formadoras de colónias fez-se ao fim de 7 dias de incubação das placas de *Petri* sendo os resultados apresentados em log (UFC/mL). Desta figura conclui-se que o número de microrganismos manteve-se aproximadamente constante ao longo do ensaio.

É possível visualizar que o número de unidades formadoras de colónias acompanha a variação de pH, ou seja, à medida que o pH diminui ao longo do ensaio de biolixiviação, o número de unidades formadoras de colónias acompanha esta tendência diminuindo também.

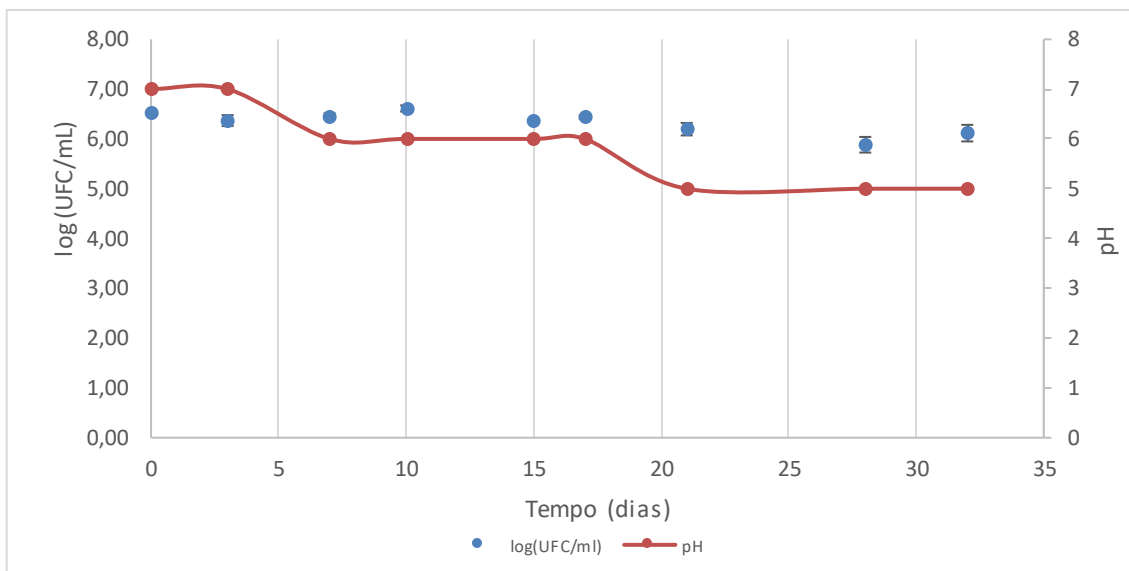


Figura 18 – Contagem das unidades formadoras de colónias log(UFC/mL) e variação do pH ao longo do 1º ensaio de biolixiviação utilizando a amostra ALC17.

4.3.1.2. Isolamento e Quantificação dos Microrganismos Cultiváveis

Para iniciar o processo de isolamento foi necessário anotar todas as características de cada tipo de unidade formadora de colónias. Estas colónias encontram-se descritos na Tabela 4. Ao fim de 7 dias de incubação das placas de *Petri* identificaram-se 13 diferentes tipos de bactérias. De cada tipo de morfologia purificou-se um isolado no mesmo meio de cultura (R2A) e procedeu-se à sua caracterização fenotípica preliminar. Deste modo fez-se a caracterização fenotípica e a caracterização da morfologia colonial dos isolados. No Anexo VI encontram-se fotografias dos resultados dos testes de Gram dos diferentes tipos de isolados identificados.

Tabela 4 – Caracterização dos isolados identificadas no primeiro ensaio de biolixiviação.

Nome	Cor	Margem	Tamanho (mm)	Forma	Elevação	Brilho	Opacidade	Morfologia	Coloração de Gram	Teste de Catalase	Teste de Oxidase
R17TR1	Cor-de-rosa	Inteira	4	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	-	+	+
R17TR2	Cor-de-rosa claro	Inteira	6	Circular	Convexa	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+
R17TA1	Amarela	Inteira	3	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	+	+	+
R17TA2	Amarela claro	Inteira	2,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	+	+	-
R17TA3	Amarelo claro	Ondulada	4	Irregular	Plana	Brilhante	Opaca	Cocos	+	+	+
R17TA4	Alaranjada	Inteira	3	Circular	Convexa	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+
R17TB1	Bege	Ondulada	6	Circular	Plana	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+
R17TB2	Bege	Filamentosa/ lobulada	9	Rizóide	Plana	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+
R17TB3	Bege	Lobulada	8	Irregular	Elevada	Brilhante	Translúcida	Cocos	-	+	+
R17TB4	Bege	Inteira	1	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca	Cocos	-	+	+
R17TB5	Bege	Inteira	2,5	Circular	Plana	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+
R17TB6	Bege	Lobulada	6,5	Irregular	Convexa	Brilhante	Opaca	Bacilos	-	+	-
17TB7	Bege	Inteira	7	Circular	Convexa	Brilhante	Translúcida	Bacilos	-	+	+

Após a amplificação do gene rRNA 16S procedeu-se à sequenciação dos isolados. Na tabela seguinte (Tabela 5) é possível observar os resultados da comparação das sequenciações obtidas com bases de dados resultantes da identificação dos isolados obtidos a partir da cultura que serviu de inóculo ao 1º ensaio de biolixiviação utilizando a amostra ALC17.

Tabela 5 - Identificação das estirpes isoladas a partir da cultura CM17 utilizada no primeiro ensaio de biolixiviação em comparação com a base de dados EzBioCloud em EzTaxon.

Identificação da amostra	Posições do fragmento analisado (pb)	Nome Científico	Filo	% Similaridade sequencia gene 16S rRNA	Type strain
R17TR1	886	<i>Pedobacter composti</i>	Bacteroidetes	98,6	TR6-06 ^T
R17TR2	659	<i>Algoriphagus olei</i>	Bacteroidetes	99,7	CC-Hsuan-617 ^T
R17TA1	1201	<i>Shingopyxis bauzanensis</i>	Proteobacteria	84,7	BZ30 ^T
R17TA2	284	<i>Microbacterium profundum</i>	Actinobacteria	100,0	Shh49 ^T
R17TA3	1031	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Actinobacteria	99,7	DSM 8609 ^T
R17TA4	418	<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	Proteobacteria	99,0	DSM 9434 ^T
R17TB1	1121	<i>Lysobacter caeni</i>	Proteobacteria	99,0	BUT-8 ^T
R17TB2	937	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	Proteobacteria	99,4	HL22-2 ^T
R17TB3	964	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	99,0	ATCC 17588 ^T
R17TB4	1097	<i>Paracoccus oceanense</i>	Proteobacteria	99,6	JLT1679 ^T
R17TB5	949	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	99,1	ATCC 17588 ^T
R17TB6	952	<i>Acinetobacter junii</i>	Proteobacteria	99,5	CIP 64.5 ^T
R17TB7	781	<i>Algoriphagus olei</i>	Bacteroidetes	99,5	CC-Hsuan-617 ^T

Após a identificação dos isolados fez-se uma breve descrição de cada um dos isolados identificados tal como se fez na cultura W para os isolados identificados na cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator.

- *Porphyrobacter neustonensis*, segundo John A. Fuerst *et al.*, (1993), identificaram-se estirpes de bactérias de cor laranja ou vermelha isoladas de superfícies de água doce. Este tipo de bactérias classifica-se como gram-negativos, catalase positivos e oxidase negativos, são microrganismos aeróbios e quimio-autotróficos.
- *Pedobacter composti*, uma estirpe bacteriana deste tipo classifica-se como gram-negativa, catalase e oxidase positiva, aeróbia, não móvel e não formadora de esporos. Foi isolada a partir de uma amostra de composto na Coreia do Sul (Lee H., *et al.*, 2009).
- *Algoriphagus olei*, classifica-se como uma bactéria aeróbia, não móvel, gram-negativa, catalase e oxidase positiva, rosada a vermelhada, convexa, plana e brilhante e foi isolada

a partir de um solo contaminado com óleo perto de uma refinaria de petróleo localizada no condado de Kaohsiung, Taiwan (Young, C., *et al.*, 2009).

- *Microbacterium profundum*, classifica-se como uma bactéria gram-positiva, catalase positiva e oxidase negativa, aeróbia e foi isolada a partir de uma amostra de sedimentos recolhida em profundidade na região do Pacífico Oriental (Yue-Hong Wu, *et al.*, 2008).
- *Paracoccus oceanense*, esta bactéria classifica-se como gram-negativa, catalase e oxidase positiva, aeróbia, móvel, não formadora de esporos e foi isolada no oceano Oeste Pacífico (Yingnan Fu, *et al.*, 2011).
- *Microbacterium esteraromaticum*, classificam-se como gram-positivas, catalase positiva e oxidase positiva, esta estirpe foi isolada a partir de terras agrícolas poluídas (Fitriyah, D. *et al.*, 2013).
- *Lysobacter caeni*, classifica-se como uma bactéria aeróbia gram-negativa, catalase e oxidase positiva, não móvel e foi isolada a partir da lama ativada de uma instalação de tratamento de águas residuais de uma fábrica de herbicidas (Xiao-Mei Ye, *et al.*, 2015).
- *Pseudomonas kunmingensis*, esta estirpe foi isolada a partir de uma mina de fosfatos situada num subúrbio de Kunming na província de Yunnan, no sudoeste da China. É uma bactéria gram-negativa, catalase positiva e oxidase negativa (Fuhong Xie *et al.*, 2014).
- *Acinetobacter junii*, são um género de bactérias gram-negativas, não-móveis, oxidase negativas e catalase positivas. São importantes organismos no solo, onde contribuem na mineralização de, por exemplo, compostos aromáticos (Bouvet P. & Grimont, 1986).
- *Sphingopyxis bauzanensis*, este tipo de bactérias foi isolado a partir de solo contaminado com hidrocarbonetos. São bactérias aeróbias, móveis, classificam-se como gram-negativas, oxidase e catalase positivas, de cor amarela, de forma circular, convexa e com margem inteira (De-Chao Zhang, *et al.*, 2010).

4.3.1.3. Amostras destinadas a Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S

Depois de concluída a extração e quantificação de ADN a amostra dos rejeitados (*Taillings*) foi eliminada porque continha menos de 100 ng de ADN, o mínimo requerido para que a amostra pudesse seguir para sequenciação. Depois deste procedimento verificou-se que o ADN presente era muito escasso e este facto poderia inviabilizar a sequenciação pelo que apenas foram enviadas para sequenciação amostras correspondentes ao *Paste* e *Feed* (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da extração de ADN das amostras da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo recolhidas dia 17/03/17.

Amostra	Nome amostra	ng/ μ L	Vol (μ L)	Total ADN (ng)
1	Paste 24.03.17	0,5	400	198,4
2	Feed 24.03.17	0,405	400	162

As condições da eletroforese utilizadas foram as seguintes: agarose (1,5%), 90 V (40 minutos) e volume da amostra (5 µl + 3 µl de Loading dye). A análise da imagem resultante da técnica de eletroforese em gel de agarose (fig. 19) permitiu concluir que, para as duas amostras (*Feed* e *Paste*) houve de facto amplificação de ADN. Os fragmentos de ADN com o mesmo comprimento formaram uma "banda" no gel de agarose que podem ser identificadas como pequenas faixas fluorescentes.

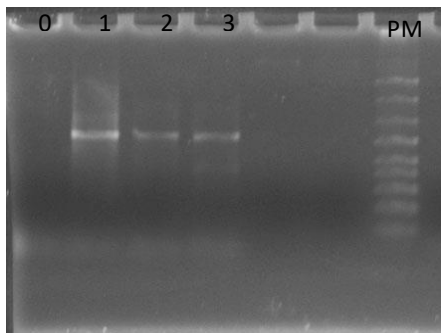


Figura 19 - Eletroforese dos produtos da amplificação do gene 16S rRNA das amostras provenientes da mina de Neves Corvo. Legenda: 0: branco; 1: ADN Paste de 17.03.17; 2 – ADN Feed de 17.03.17; 3: ADN controlo positivo; PM; marcador de ADN.

Como apenas se utilizou nos ensaios de biolixiviação em reator uma amostra proveniente da alimentação da lavaria do cobre da mina de Neves Corvo (ALC17), apenas se apresenta a sequenciação por Illumina do gene 16S rRNA do seu ADN total da amostra *Feed* (alimentação).

Com o objetivo de identificar a comunidade bacteriana presente na amostra ALC17, procedeu-se à sequenciação por Illumina do gene 16S rRNA do seu ADN total (ANWXXO XIII). A análise das sequências identificadas por esta técnica revelou que 95,1% das sequências correspondiam ao filo *Proteobacteria* constituído por bactérias gram-negativas, 4,6% pertenciam ao filo *Actinobacteria*, 0,03% ao filo *Firmicutes*, 0,1% ao filo *Bacteroidetes* e 0,01% pertenciam ao filo *Chloroflexi*, 0,02% e 0,1% pertenciam ao filo *Parcubacteria*, OD1 e TM7 respetivamente.

Dentro do filo *Proteobacteria*, a classe mais abundante foi a classe *Betaproteobacteria* (57,7%) seguida das classes *Gammaproteobacteria* (38,7%) e *Alphaproteobacteria* (3,5%). A classe *Epsilonproteobacteria* apresentou uma abundância muito menor de apenas 0,01% de sequências identificadas.

Dentro da classe *Betaproteobacteria* a família mais abundante foi a *Comamonadaceae* (88,63%) seguida das famílias *Hydrogenophilaceae* (10,65%), *Alcaligenaceae* (0,49%) e *Rhodocyclaceae* (0,04%). Não foi possível classificar 0,2% das famílias associadas a esta classe.

As famílias mais abundantes associadas à classe *Gammaproteobacteria* foram: *Piscirickettsiaceae* (55,3%) e *Acidithiobacillaceae* (38,93%), seguida de *Pseudomonadaceae* (3,89%), *Halothiobacillaceae* (0,89%), *Alteromonadaceae* (0,53%), *Oceanospirillaceae* (0,19%), *Chromatiaceae* (0,13%), *Moraxellaceae* (0,02%), *Halomonadaceae* (0,02%), *Xanthomonadaceae* (0,01%), 0,05% das famílias são não classificadas.

Os géneros mais abundantes na amostra ALC17 (feed) (fig. 20) foram: *Limnobacter* (48,5%), *Thermithiobacillus* (14,29%), *Thiobacillus* (5,85%), *Paracoccus* (2,75%), *Pseudomonas* (0,80%), *Erythrobacter* (0,25%), *Marinobacter* (0,19%), *Halothiobacillus* (0,17%), *Thiovirga* (0,15%), *Methylophaga* (0,11%); não foi possível classificar 26,94% dos géneros. A tabela com os dados integrais deste procedimento encontra-se no ANEXO XIII.

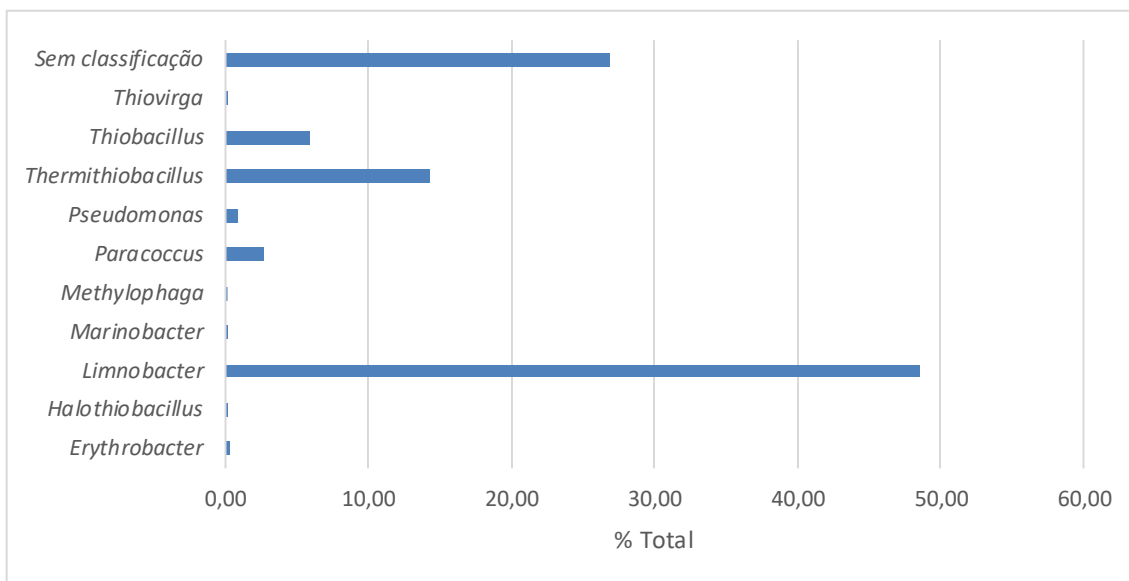


Figura 20 - Representação gráfica da distribuição por gêneros obtida pelo processo de Sequenciação por Illumina da amostra ALC17.

De acordo com estes resultados, foi possível verificar que o gênero maioritário era *Limnobacter* pertencente à classe *Betaproteobacteria*. São bactérias aeróbias, quimio-lito-heterotróficas que podem utilizar o tiosulfato como fonte de energia para o seu crescimento. Dentro deste gênero existem espécies que podem potencialmente ser utilizadas em processos de biolixiviação (Nguyen *et. al.*, 2017).

Depois do gênero *Limnobacter*, o gênero *Thermithiobacillus* era o que se encontrava em maior percentagem, classifica-se como aeróbio, moderadamente termófilo e quimiolito-autotrófico; cresce em ambientes inorgânicos com compostos de enxofre reduzidos e é incapaz de oxidar o ião ferroso (Kelly D, & Wood A., 2000).

O gênero *Halothiobacillus*, bem como o gênero *Thiobacillus* têm um papel importante nos ciclos de carbono e enxofre globais (Johnson, D., 2001). O gênero *Halothiobacillus* tolera altas concentrações de solutos (p. ex. NaCl 4 M; 0,25 M tiosulfato de sódio), são incapazes de oxidar o ferro ferroso; a sua temperatura ideal de crescimento é de 30 a 40 °C e o pH ótimo de crescimento situa-se no intervalo 6,5 a 8 (Kelly D, & Wood A., 2000). Ambos os gêneros são bactérias quimiolito-autotróficas, capazes a viver exclusivamente dos compostos inorgânicos (CO₂ e enxofre) para equilibrar as suas necessidades de energia e de carbono. Estes microrganismos possuem a capacidade de acidificar os resíduos provenientes de explorações mineiras e promover o processo de biolixiviação.

Dentro dos gêneros minoritários encontrados, o gênero *Halothiobacillus* é o único que tem influência direta nos processos de biolixiviação. Os gêneros *Paracoccus* e *Pseudomonas* que também se encontram em percentagem significativas não influenciam diretamente no processo de biolixiviação mas a interação deste tipo de microrganismos no processo de biolixiviação com os restantes é de extrema importância para a solubilização de metais.

Com exceção dos organismos afiliados aos gêneros *Pseudomonas* e *Paracoccus*, os organismos cultiváveis em meio R2A agar não foram identificados pelo método independente de cultura. Pode-se assim considerar que esses isolados estavam numa percentagem minoritária uma vez que não foram identificados nas sequências resultantes do processo de sequenciação por Illumina do gene 16S rRNA.

4.3.1.4. Variação Temporal da Concentração de Metais

Para a determinação da concentração dos metais na fase líquida, foi utilizada a técnica da absorção atómica referida na secção anterior. No final do ensaio foi possível calcular a percentagem de metal lixiviado neste ensaio.

Como se pode verificar pela Tabela 7 é evidente que não ocorreu lixiviação em todos os metais analisados no primeiro ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

Foi possível calcular a percentagem de lixiviação dos seguintes metais: cobre (Cu), zinco (Zn) e molibdénio (Mo) sendo que apenas no zinco é que este fenómeno se pode considerar significativo. Como os restantes metais, gálio (Ga), índio (In) e telúrio (Te) não foram identificados durante a análise química da amostra utilizando a técnica de Fluorescência de Raios-x de Energia Dispersiva, porque se encontravam abaixo do limite de deteção do aparelho, não foi possível calcular a percentagem lixiviada destes metais.

Tabela 7 - Resultado das análises químicas do primeiro ensaio do Reator (fase líquida).

Amostra	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)	Mo (mg/L)	Ga (mg/L)	In (mg/L)	Te (mg/L)
Dia 0	0,44	3,0	0,75	3,0	0,08	0,15	0,24	0,01
Dia 7	0,02	0,2	0,40	3,0	0,08	0,13	0,27	0,02
Dia 21	< 0,1	7,7	0,09	15,1	0,08	0,49	0,21	0,02
Dia 32	< 0,1	4,6	0,08	24	0,11	0,13	0,32	0,03

*Fe, Cu, Pb, Zn - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Mo, Ga, In, Te - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

Na fig. 21 apenas é visível a variação temporal da concentração de zinco (Zn) ao longo do 1º ensaio de biolixiviação em reator, o único metal em que se verificou uma percentagem de biolixiviação significativa. É visível um aumento significativo da evolução temporal da concentração de zinco, para a amostra ALC17. A percentagem de zinco lixiviada ao fim de 32 dias de ensaio foi de 2,34%. Esta percentagem pode ser explicada por fenómenos de lixiviação deste metal, presente no resíduo que se transferiu da fase sólida para a fase líquida, encontrando-se desta forma dissolvido na solução.

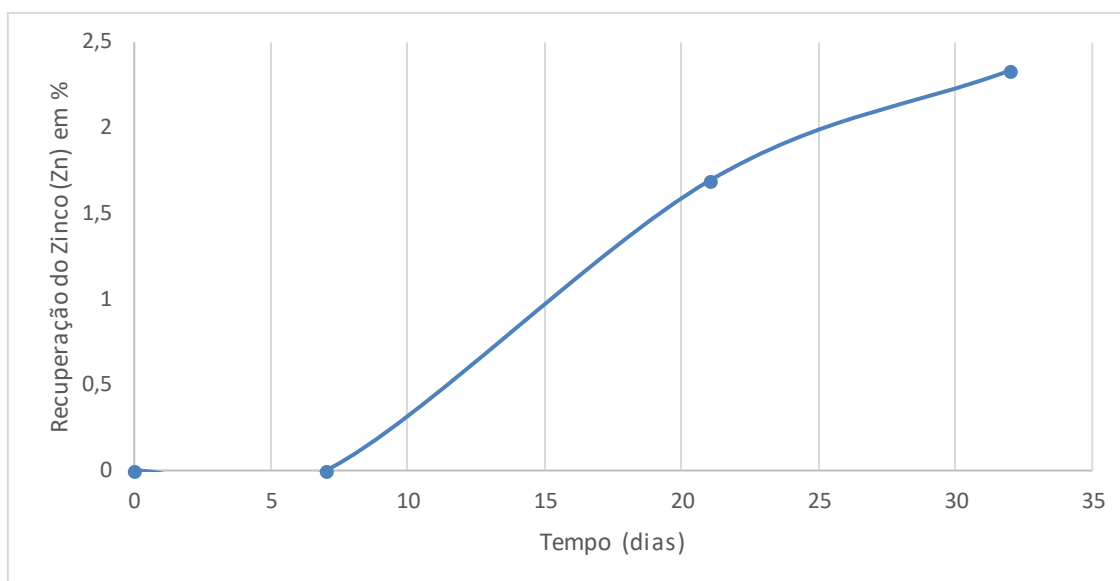


Figura 21 – Evolução temporal da recuperação de Zinco (Zn) ao longo do 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

4.3.1.5. Variação Temporal na Concentração de Sulfatos

Para a determinação da concentração de sulfatos, foi aplicado o método do turbidimétrico referido no capítulo anterior. Neste ensaio mediu-se a concentração inicial e final de sulfatos no 1º ensaio de biolixiviação utilizando a amostra ALC17. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Variação na concentração de sulfatos no 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

Ensaio de Biolixiviação em Reator	
Dias de incubação	Concentração (mg/L)
0	1282,132
32	1830,151

Como é possível observar pela tabela anterior, para 0 dias de incubação, a cultura apresentava uma concentração de sulfatos de 1282,132 mg/L e verificou-se que no final do ensaio de biolixiviação, com um tempo de incubação de 32 dias, esta concentração aumentou até 1830,151 mg/L, este facto poderia ser explicado pela atividade microbiana, ou seja, os microrganismos quimio-lito-autotróficos oxidaram os elementos presentes nesta amostra para a utilizarem como fonte de energia, neste caso os componentes de enxofre.

4.3.1.6. Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS)

A análise da amostra sólida utilizada no primeiro ensaio de biolixiviação (ALC17) fez-se recorrendo à Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS) no Centro de Materiais na Universidade do Porto (CEMUP) tal como foi referido no Capítulo anterior. Esta análise fez-se em diferentes períodos do ensaio de biolixiviação nomeadamente, no dia 0 (amostra original) e dia 32 (dia em que terminou o ensaio de biolixiviação). Na fig. 22 é possível visualizar a composição da amostra original proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo (ALC17) e na figura seguinte (fig. 23), a amostra retirada no final do ensaio de biolixiviação com o respetivo espectro. A figura 24 diz respeito à amostra original BG17 utilizada no ensaio de biolixiviação em matraz.

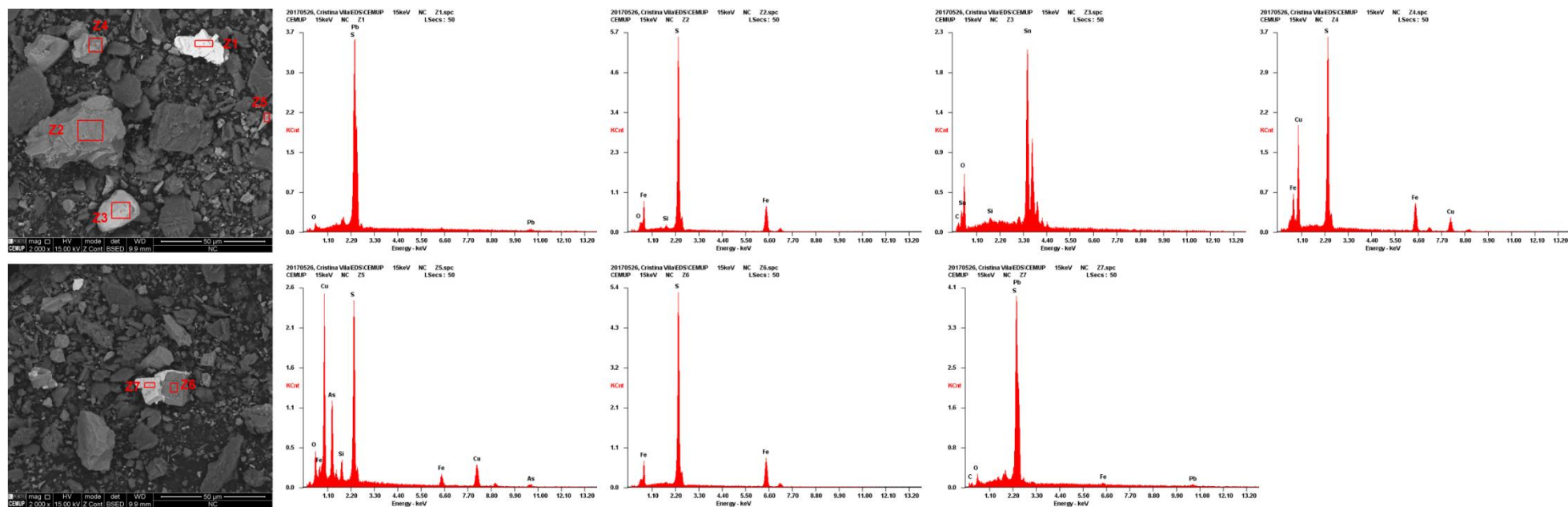


Figura 22 – Amostra original proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo (ALC17), dia 0 do 1º ensaio de biolixiviação em reator. Legenda: Z1 – Galena (PbS); Z2 – Pirite (FeS₂); Z3- Cassiterite (SnO₂) e Quartzo (SiO₂); Z4 – Calcopirite (CuFeS₂); Z5 – Quartzo (SiO₂) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z6 – Pirite (FeS₂) e Z7 - Galena (PbS).

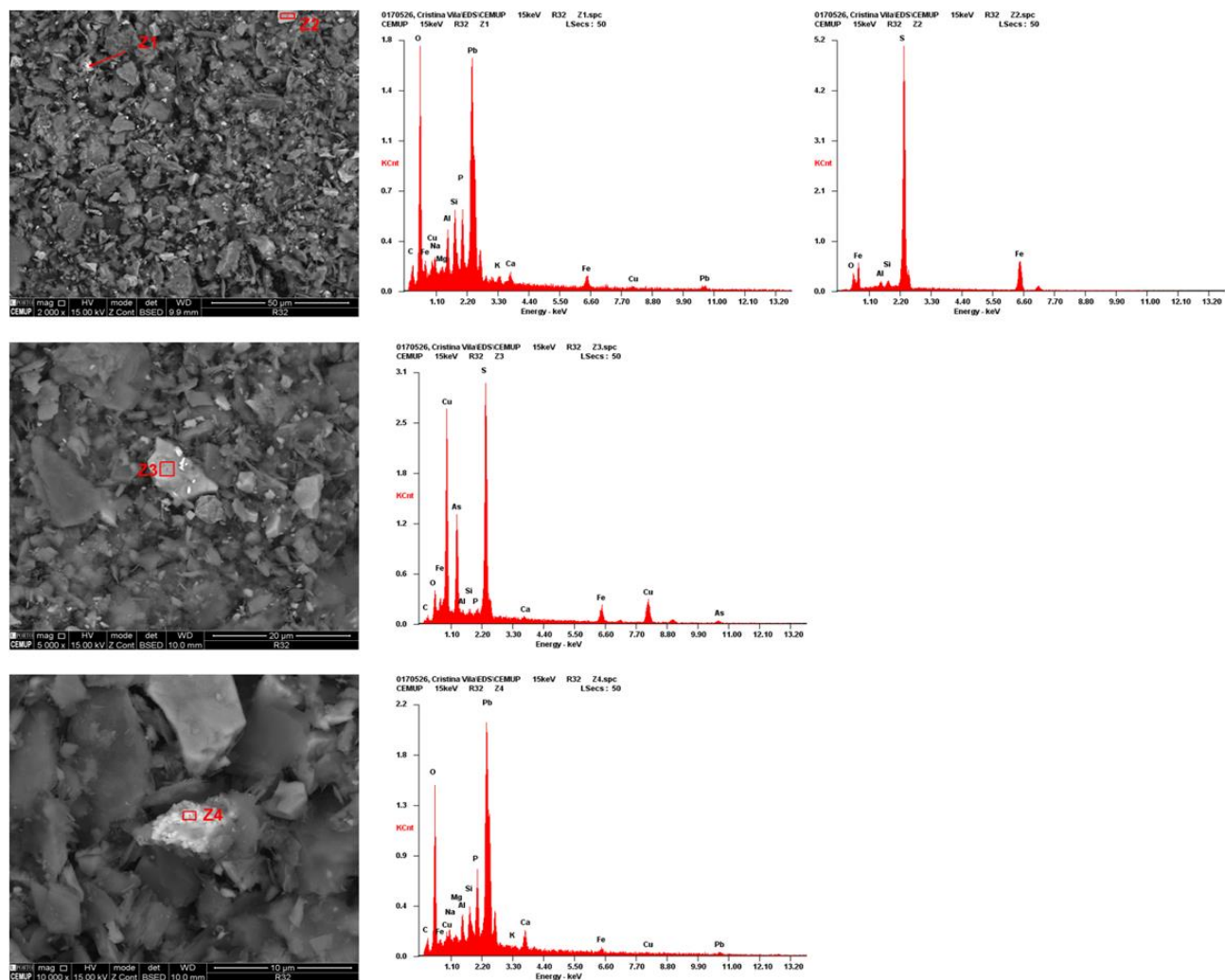


Figura 23 - Amostra retirada ao 32º dia do ensaio de biolixiviação. Legenda: Z1 – Chumbo (Pb); Z2 – Pirite (FeS₂); Z3 - Arsenopirite (FeAsS) e Calcopirite (CuFeS₂) e Z4 – Chumbo (Pb) e Silicatos.

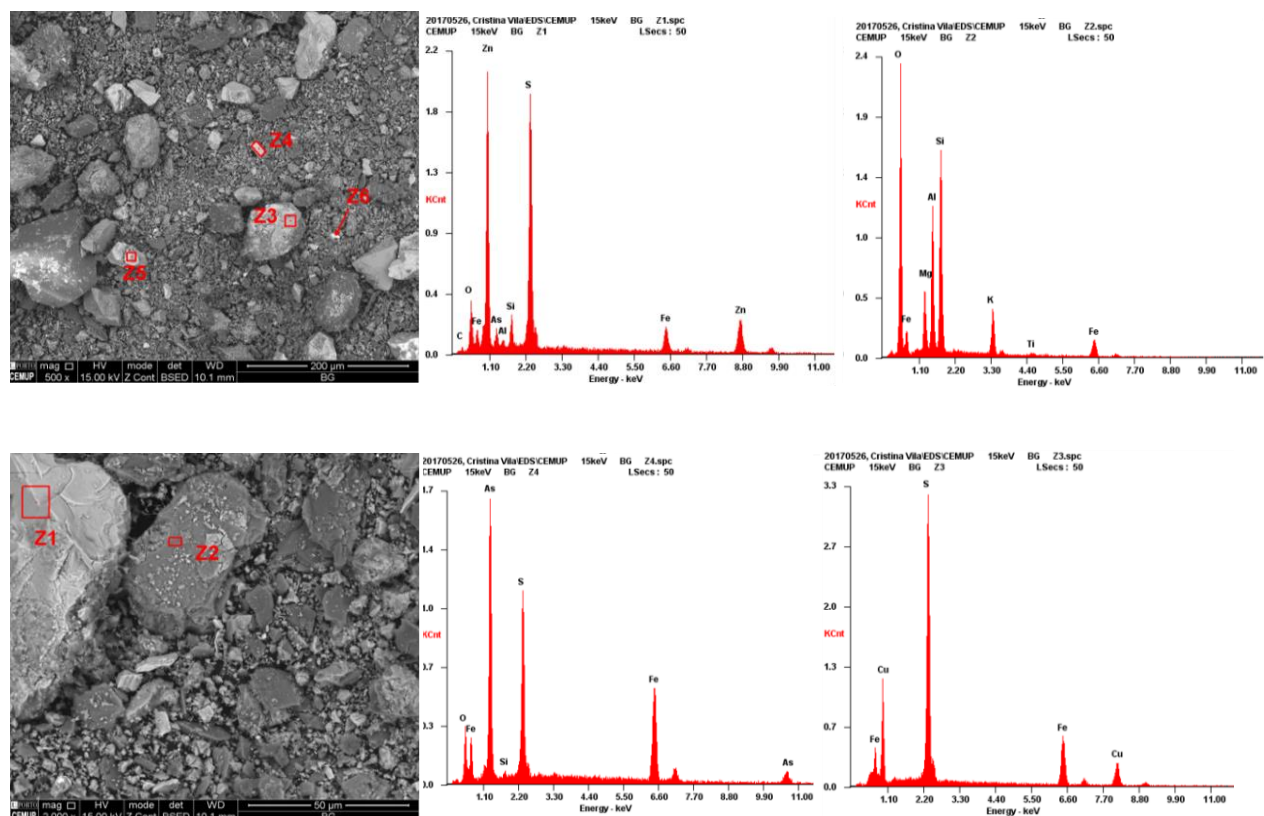


Figura 24 - Amostra proveniente da Barroca Grande (BG17). Legenda: Z1 – Blenda (ZnS); Z2 – Silicatos de alumínio, magnésio, potássio e ferro; Z3 – Calcopirite (CuFeS_2); Z4 – Quartzo (SiO_2) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z5 - Quartzo (SiO_2) com Arsenopirite (FeAsS) à superfície; Z6 - Wolframite ($(\text{Fe,Mn})\text{WO}_4$).

Das figuras 22 e 23 pode-se retirar as seguintes conclusões: a amostra, ALC17, utilizada no ensaio inicial de biolixiviação em reator é constituída principalmente por enxofre (S), chumbo (Pb), ferro (Fe), estanho (Sn), silício (Si), cobre (Cu) e silicatos o que consiste com as principais espécies minerais existentes na mina de Neves Corvo. Estes elementos mantiveram-se aproximadamente constantes ao longo do ensaio de biolixiviação o que pode ser confirmado pelos resultados das análises à variação de metais em que apenas se verificou uma pequena variação na concentração de zinco nesta amostra.

No que diz respeito à amostra BG17 proveniente dos rejeitados da Mina da Panasqueira (Barroca Grande) nesta fase apenas foi analisada a amostra inicial, antes de ser utilizada no ensaio de biolixiviação. Desta análise pode-se concluir que esta amostra é constituída principalmente por: enxofre (S), silício (Si), cobre (Cu), arsénio (As), tungsténio (W), zinco (Zn), ferro (Fe) e silicatos como se pode verificar na fig. 24. Esta observação consiste com as principais espécies minerais encontradas na mina da Panasqueira.

4.4. Ensaios de Biolixiviação em Reator e Matraz utilizando as amostras ALC17, BG17 e BG17_2

Os resultados obtidos no final dos dois ensaios de biolixiviação utilizando como inóculo a cultura R (ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17), a cultura M (ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17) e a cultura CBG (ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2) apresentam-se nas secções seguintes.

4.4.1. Enumeração dos microrganismos cultiváveis

i) Ensaio de Biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17

Os resultados obtidos relativamente à enumeração dos organismos cultiváveis são os apresentados na fig. 25 para o ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

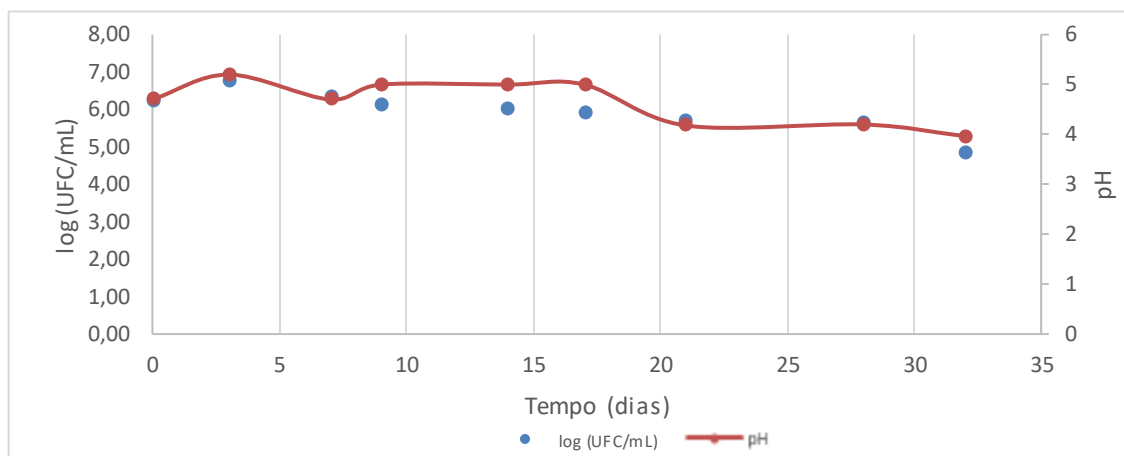


Figura 25 - Evolução de log(UFC/mL) e pH ao longo do ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

Da fig. 25 pode-se concluir que ao fim de 3 dias de ensaio o número de UFC começou a diminuir. Este número oscilou até ao 21º dia onde se verificou um pequeno aumento do número das UFC que estabilizou próximo ao 28º dia, mas a partir deste dia o número de UFC diminuiu até ao final do ensaio (fase de declínio). Desta figura também se pode concluir que a variação de pH acompanhou a evolução do número de UFC, ou seja, aumentando o pH o número de UFC aumentava também. Inicialmente o pH foi ajustado a 4,7 e ao fim de 32 dias de ensaio verificou-se que este valor tinha decrescido para 3,9.

ii) Ensaio de Biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17

Os resultados obtidos relativamente à enumeração dos organismos cultiváveis são os apresentados na fig. 26 para o ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.

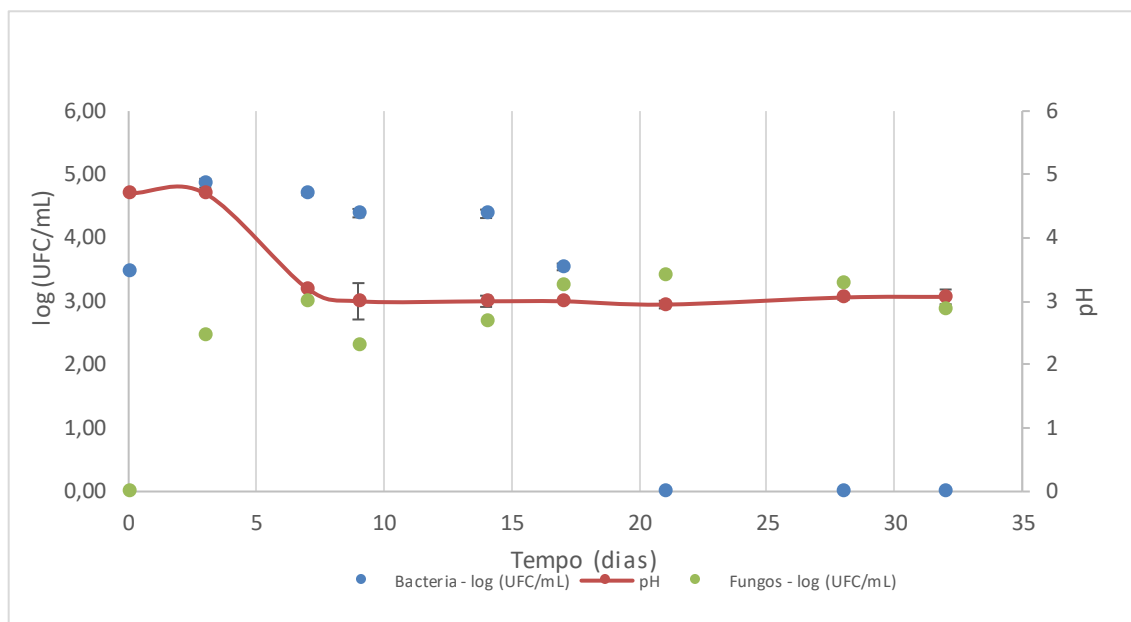


Figura 26 - Evolução de log(UFC/mL), pH e fungos ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.

Deste ensaio foi possível concluir que as bactérias organotróficas/mixotróficas cultiváveis aumentaram nos primeiros três dias de ensaio e após este dia começaram a diminuir. Após três dias de ensaio, foram detetados fungos cultiváveis. Ao fim de 21 dias de ensaio evidenciou-se que os fungos cultiváveis se sobrepuseram às bactérias existentes anteriormente e como tal a partir deste dia até ao final do ensaio deixou de ser possível fazer a contagem de UFC nas placas de *Petri*, sendo esta contagem nula como se pode verificar na fig. 26. Relativamente ao pH, este foi inicialmente ajustado para uma faixa de pH de 4,5 - 5. Verificou-se que o pH baixou de 5 a 3 durante o ensaio de biolixiviação.

iii) Ensaios abióticos (controlo) utilizando as amostras ALC17 e BG17

Terminado o período de incubação de 32 dias, verificou-se que não existiu atividade nem crescimento bacteriano em nenhuma das placas sujeitas a espalhamento da cultura de controlo abiótico utilizando a amostra ALC17. Este processo foi efetuado no dia 0 e 32 de incubação e em ambos os dias os resultados foram os mesmos para a cultura abiótica utilizando a amostra ALC17. No caso da cultura abiótica utilizando a amostra BG17, quando se fez os espalhamentos no dia 32 do ensaio verificou-se o aparecimento de fungos cultiváveis, os mesmos que apareceram na cultura biótica.

iv) Ensaio de Biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2

Os resultados obtidos relativamente à enumeração dos organismos cultiváveis são os apresentados na fig. 27 para o ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2.

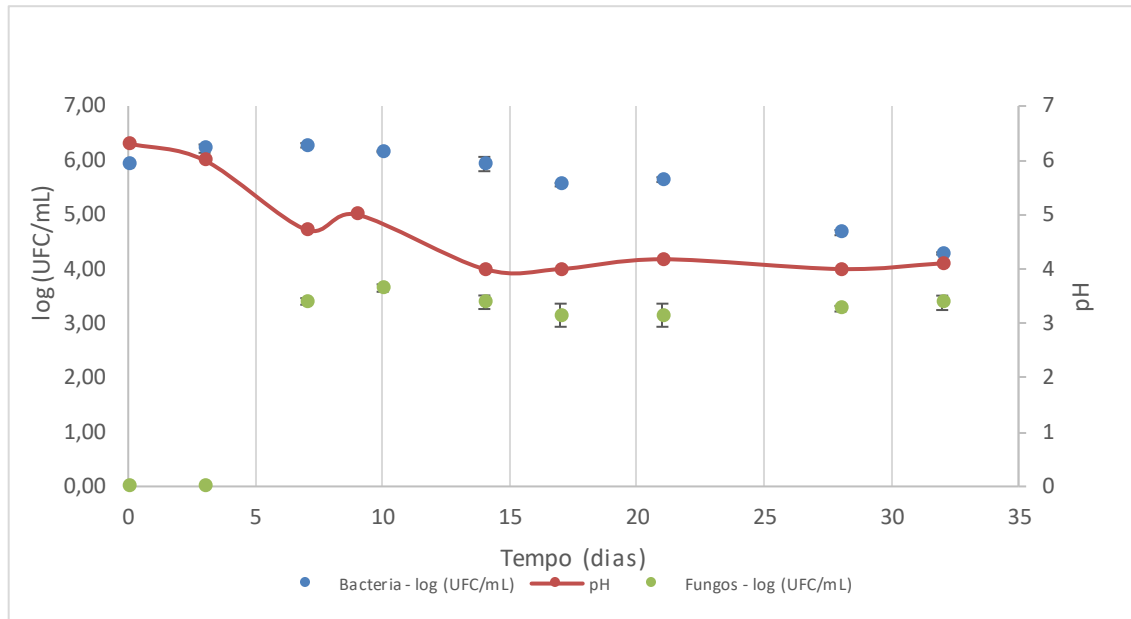


Figura 27 - Evolução de UFC/ml ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz (amostra BG17_2).

Deste ensaio foi possível concluir que as bactérias organotróficas/mixotróficas cultiváveis aumentaram nos primeiros 7 dias de ensaio e após este dia começaram a diminuir ao longo do período de incubação. Após 7 dias de ensaio foram detetados fungos cultiváveis que se mantiveram cima de 10^3 UFC/ml durante o resto do ensaio. O pH diminuiu de 6 para 4 ao longo do ensaio de biolixiviação.

4.4.2. Variação Temporal na Concentração de Metais

Tal como no 1º ensaio biolixiviação calculou-se a percentagem de metal lixiviado no final de ambos os ensaios de biolixiviação (ensaio em reator e ensaios em matraz). Os resultados destas análises encontram-se nas tabelas seguintes para as três amostras utilizadas (amostra ALC17, BG17 e BG17_2) e para os controlos abióticos.

i) Ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17

Na tabela 9 é possível verificar a variação da concentração de metais ao longo do ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

Tabela 9 – Resultado das análises químicas do 2º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 (mg/l).

Dias	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)	Mo (mg/L)	Ga (mg/L)	In (mg/L)	Te (mg/L)
Dia 0	0,12	1,2	0,18	6,0	0,12	0,07	0,25	0,02
Dia 7	0,1	6,3	0,30	20,0	0,11	0,07	0,3	0,02
Dia 21	0,1	17,2	0,5	55	0,07	0,07	0,26	<0,01
Dia 32	0,41	21,2	1,6	75	0,06	0,05	0,19	0,02

*Fe, Cu, Pb, Zn - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Mo, Ga, In, Te - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

Na fig. 28 é possível verificar a evolução dos 3 metais (Cu, Pb e Zn) em que se verificou um aumento da percentagem de biolixiviação ao longo do ensaio em reator utilizando a amostra ALC17.

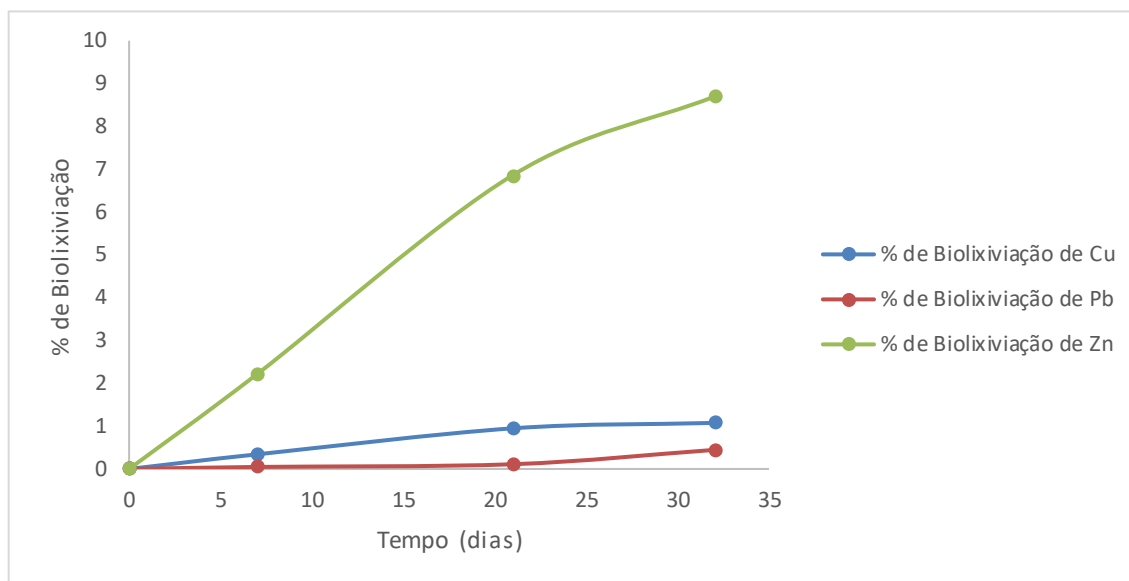


Figura 28 – Variação na recuperação de Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

O aumento da concentração de cobre (Cu), chumbo (Pb) e zinco (Zn) na amostra ALC17, nomeadamente aumentos de 18, 9 e 13 vezes, respetivamente, relativamente ao valor inicial, poderá ser explicado devido à ocorrência de fenómenos de lixiviação destes metais, presentes na amostra utilizada, que se transferiu da fase sólida para a fase líquida, encontrando-se dissolvido na solução.

ii) Ensaio de controlo abiótico utilizando amostra ALC17

Em relação ao ensaio de controlo abiótico, constituído por 600 mL de meio mineral TB e 30 g da amostra ALC17 a variação da concentração de metais na fase líquida ao fim de 32 dias de ensaio encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultado das análises químicas do 2º ensaio de biolixiviação em reator (Controlo abiótico).

Dias	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)	Mo (mg/L)	Ga (mg/L)	In (mg/L)	Te (mg/L)
Dia 0	0,46	0,5	0,18	6,0	0,05	0,04	0,17	<0,01
Dia 32	0,23	4,9	0,17	45,0	0,06	0,05	0,23	0,03

*Fe, Cu, Pb, Zn - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Mo, Ga, In, Te - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

Tal como esperado a percentagem de biolixiviação obtida na cultura biótica (ensaio de biolixiviação em reator utilizando a cultura ALC17) foi maior que na cultura abiótica (controlo). Da tabela 10 verificou-se que para a maioria dos metais não ocorreu variação da concentração na fase líquida, mas para o caso do cobre (Cu) e zinco (Zn) verificou-se um aumento da concentração destes metais na fase líquida.

Como conclusões tem-se:

- A percentagem de biolixiviação do ferro (Fe) foi insignificante para ambos os ensaios (ensaio biótico e abiótico);
- Ao final de 32 dias foi possível verificar a ocorrência do processo de biolixiviação para alguns dos metais analisados, ou seja, ao fim deste período foi possível lixiviar 1,08% de cobre (Cu), 0,45% de chumbo (Pb) e 8,69% de zinco (Zn) na cultura biótica;
- Tal como esperado, no ensaio abiótico (controlo) verificou-se que a % de biolixiviação do zinco e cobre foram menores que no ensaio biótico, 6,08% e 0,29%, respetivamente;
- Para ambos os ensaios (biótico e abiótico) não foi possível calcular a percentagem de biolixiviação de alguns dos metais analisados (Mo, Ga, In e Te) pois não foram detetados durante a análise química utilizando a técnica de fluorescência de raios-x.

iii) Ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17

Na tabela 11 é possível verificar a variação da concentração de metais ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.

Tabela 11 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.

Dias	As (mg/L)	Bi (mg/L)	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Hg (mg/L)	W (mg/L)	Zn (mg/L)
Dia 0	4,9	<0,5	0,06	2,2	7,7	21	<20	6,0
Dia 7	22,8	<0,5	0,15	1,9	4,4	23	<20	12
Dia 21	99	<0,5	0,43	4,9	0,3	20	<20	26
Dia 32	128	0,5	1,1	7,8	17	20	<20	55

*Fe, Cu, Zn, W - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Bi, As, Cd, Hg - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

O aumento da concentração de arsénio, cádmio, cobre e zinco na amostra BG17, nomeadamente aumentos de 26, 18, 4 e 9 vezes, respetivamente, relativamente ao valor inicial, poderá ser explicado devido à ocorrência de fenómenos de lixiviação destes metais, presentes na amostra utilizada, que se transferiu da fase sólida para a fase líquida, encontrando-se dissolvidos na solução.

Na figura seguinte (fig. 29) é possível verificar a evolução dos metais em que se verificou um aumento da percentagem de biolixiviação ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz.

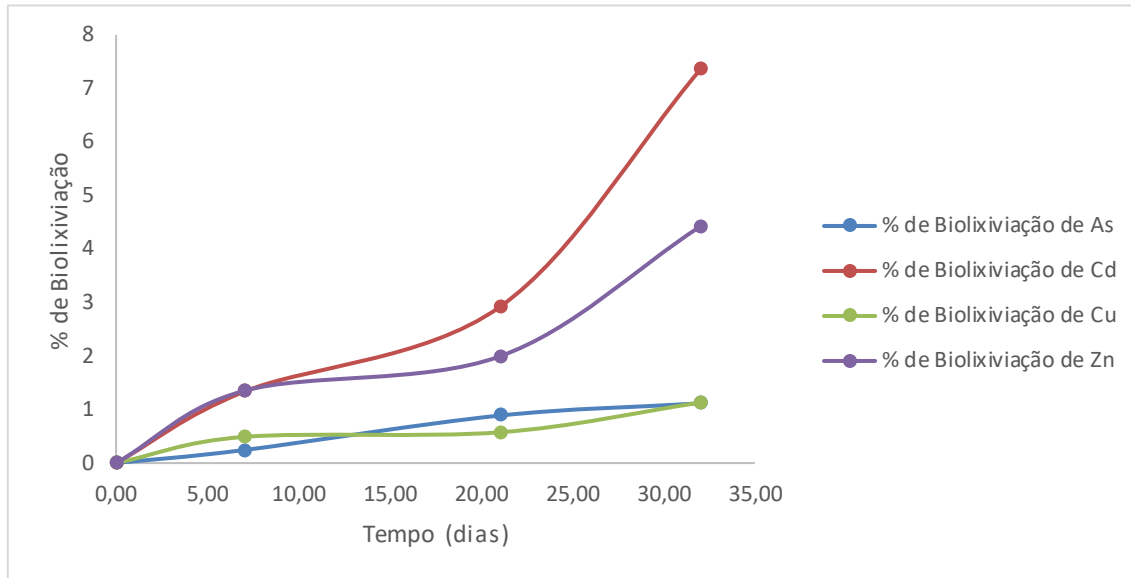


Figura 29 - Variação na concentração de Arsénio (As), Cádmio (Cd), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17.

iv) Ensaio de controlo abiótico utilizando a amostra BG17

Em relação ao ensaio de controlo abiótico, constituído por 600 ml de meio mineral TB e 30 g da amostra BG17 a variação da concentração de metais na fase líquida ao fim de 32 dias de ensaio encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17 (Controlo abiótico).

Dias	As (mg/L)	Bi (mg/L)	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Hg (mg/L)	W (mg/L)	Zn (mg/L)
Dia 0	5,4	<0,5	0,04	0,1	6,4	20	<20	4,0
Dia 7	70	<0,5	2,70	0,2	6,8	17	<20	12,5

*Fe, Cu, Zn, W - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Bi, As, Cd, Hg - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

Desta tabela foi possível concluir que ao fim de 32 dias de ensaio a concentração de metais na fase líquida aumentou para o arsénio (As), cádmio (Cd) e zinco (Zn) enquanto que para os outros metais a sua concentração manteve-se relativamente constante. Este aumento na concentração de metais na fase líquida apenas pode ser explicado pelo aparecimento de fungos cultiváveis que ocorreu nesta cultura.

Como conclusões tem-se:

- Tal como esperado, na cultura biótica verificou-se que a % de biolixiviação foi maior para o arsénio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn). A % de biolixiviação destes metais foi, 1,12%, 7,35%, 1,13% e 4,42%, respetivamente e para o controlo abiótico, obtiveram-se percentagens de 0,67%, 1,98%, 0,02% e 0,92%, respetivamente;
- A % de biolixiviação do ferro (Fe) foi insignificante para ambos os ensaios (0,04 % para o ensaio biótico e 0,002 % no ensaio abiótico);

- Para ambos os ensaios (biótico e abiótico) não foi possível calcular a percentagem de biolixiviação para alguns dos metais (Mo, Ga, In e Te) pois não foram detetados durante a análise química utilizando a técnica de fluorescência de raios-x;
- Verificou-se que houve um aumento da massa (mg) de bismuto (Bi) na cultura biótica;
- Houve remoção de W da fonte mineral (amostra BG17), ou seja 31,37 mg na cultura biótica e 18,85 mg no controlo;
- Verificou-se que existia mais mercúrio (Hg) em solução do que a massa (mg) de Hg removida da fonte mineral. Como a amostra BG17 era proveniente de resíduos da mina da Panasqueira que foram previamente submetidos a tratamento pode-se concluir que este aumento de massa poderia ser explicado por outra fonte de Hg proveniente do tratamento a que estes resíduos foram sujeitos.

v) Ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2

Na tabela 13 é possível verificar a variação da concentração de metais ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2. No final deste ensaio foi possível verificar que existiu a ocorrência do processo de biolixiviação apenas para alguns dos metais analisados tal como nos ensaios de biolixiviação anteriores.

Tabela 13 - Resultado das análises químicas do ensaio de biolixiviação em matraz (amostra BG17_2).

Dias	As (mg/L)	Bi (mg/L)	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Hg (mg/L)	W (mg/L)	Zn (mg/L)
Dia 0	3,3	<0,5	0,01	0,6	0,8	22	<20	1,5
Dia 7	5,2	<0,5	0,13	19,6	0,5	23	<20	18
Dia 21	6,8	<0,5	0,41	80	0,94	21	<20	50
Dia 32	126	<0,5	0,51	89	6,6	22	<20	60

*Fe, Cu, Zn, W - Analisados recorrendo a espectrofotometria de absorção atómica (chama).

Bi, As, Cd, Hg - Espectrofotometria de absorção atómica (Câmara de Grafite).

Na figura seguinte (fig. 30) é possível verificar a evolução dos metais em que se verificou um aumento da % de biolixiviação ao longo do ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2.

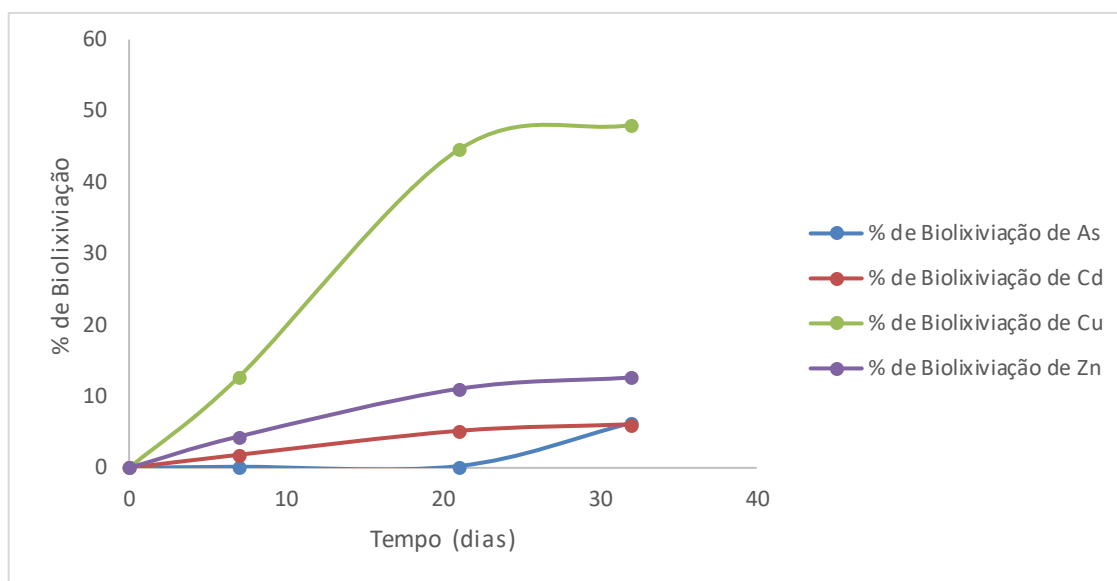


Figura 30 - Variação na concentração de Arsénio (As), Cádmiio (Cd), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) ao fim de 32 dias de ensaio de biolixiviação em matraz utilizando a amostra BG17_2.

O aumento da concentração de arsénio, cádmio, cobre e zinco na amostra BG17_2, nomeadamente aumentos de 38, 51, 148 e 40 vezes, respetivamente, relativamente ao valor inicial, poderão ser explicados devido à ocorrência de fenómenos de lixiviação destes metais, presentes na amostra utilizada, que se transferiu da fase sólida para a fase líquida, encontrando-se dissolvido na solução.

Como conclusões deste ensaio de biolixiviação tem-se:

- Houve um aumento na massa de cobre (Cu) na amostra final e simultaneamente verificou-se que ocorreu biolixiviação de cobre. Como existia cobre na cultura utilizada para biolixiviar a amostra mineral (amostra BG17_2), cerca de 26,9 mg/g, este aumento de massa pode ser assim explicado;
- A massa de mercúrio (Hg) em solução era mais elevada do que a massa de Hg medida na amostra mineral. Tal como a amostra anterior, BG17, a amostra BG17_2 era proveniente de resíduos da mina da Panasqueira que foram submetidos a tratamento, pode-se concluir que este aumento de massa poderia ser explicado por outra fonte de Hg proveniente deste tratamento;
- Verificou-se que ocorreu biolixiviação (em %) dos seguintes metais: 6,28% de As, 6,10% de Cd, 48,02% de Cu e 12,66% de Zn;
- A % de biolixiviação do Fe foi insignificante (0,07%);
- Houve remoção de tungsténio (W), cerca de 9,45 mg da amostra mineral. No entanto, verificou-se uma perda em massa de 2,13 g de mineral ao longo do processo de biolixiviação que corresponde, no máximo, a uma perda de 3,14 mg de W (considerando a concentração inicial deste metal);
- Foi possível constatar que a amostra BG17_2 apresentou uma maior eficiência quando comparada com as amostras ALC17 e BG17, esta observação pode estar diretamente ligada à diluição das amostras ALC17 e BG17 onde poderá ter ocorrido uma diminuição da comunidade bacteriana disponível para o processo de biolixiviação.

4.4.3. Variação Temporal na Concentração de Sulfatos

Os resultados obtidos para a variação da concentração de sulfatos ao longo dos três ensaios de biolixiviação, em reator e matraz (amostra ALC17, BG17 e BG17_2) e nos ensaios abióticos (controlo) dos ensaios de biolixiviação utilizando as amostras ALC17 e BG17 encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentração de Sulfatos nos ensaios de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17, a amostra BG17, amostra BG17_2 e nos ensaios de controlo abióticos.

Ensaio de Biolixiviação	Reator (amostra ALC17)	ALC17_Ccontrolo	Matraz (amostra BG17)	BG17_Ccontrolo	BG17_2
Dias de incubação	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L)
0	1282,132	1282,132	1282,132	1282,132	1282,132
7	1682,607	-	1118,78	-	1577
15	-	-	1434,945	-	1846
21	1751,109	-	1735,301	-	2268
28	1877,575	-	1503,447	-	-
32	1914,461	976,505	1682,607	1540,33	2849

Na fig. 31 é possível verificar a variação na concentração de sulfatos ao longo dos três ensaios de biolixiviação utilizando as amostras ALC17, BG17, BG17_2 e nos dois ensaios de controlo abióticos (BG17_Ccontrolo e ALC17_Ccontrolo).

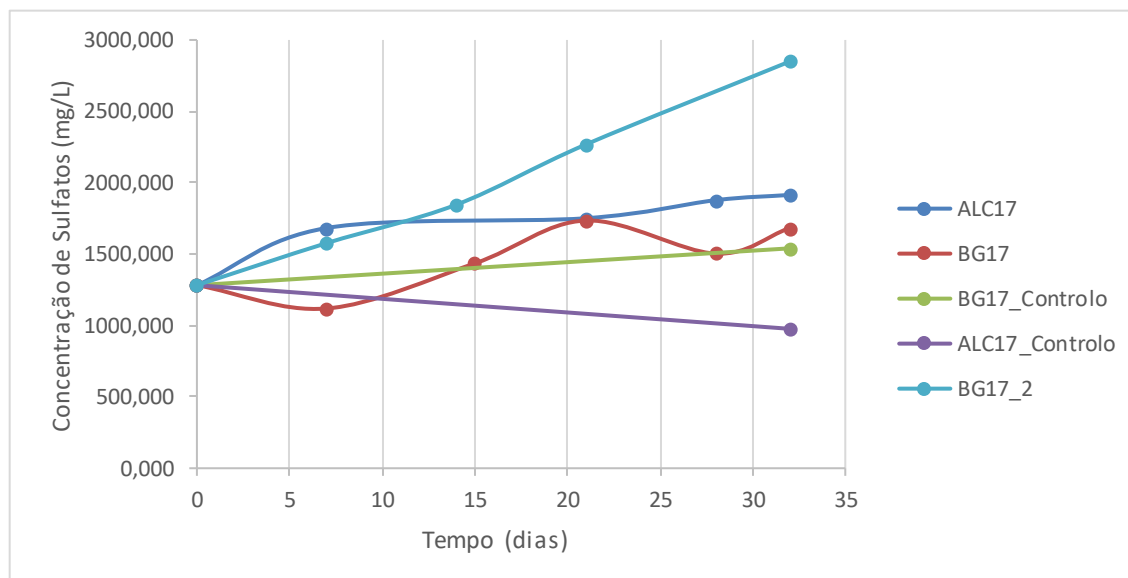


Figura 31 – Variação da concentração de sulfatos ao longo dos ensaios de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17, em matraz utilizando as amostras BG17 e BG17_2 e respetivos controlos abióticos.

Como é possível observar na fig. 32, para a amostra ALC17_Ccontrolo em condições aeróbias, verificou-se que a concentração de sulfatos decresceu de 1232,82 mg/l para 976,505 mg/l, mas no caso da amostra BG17_Ccontrolo este valor subiu até 1540,33 mg/l. No caso da amostra ALC17_Ccontrolo este valor pode estar relacionado com interferências na medição tais como a cor da amostra analisada ou matéria em suspensão em grandes quantidades que irão interferir na medição.

Tal como foi possível verificar anteriormente, no ensaio de biolixiviação utilizando a amostra BG17 houve uma contaminação de fungos e tal aconteceu também na respetiva cultura abiótica (BG17_Controlo). Pode ser esta a razão para que o valor da concentração de sulfatos em solução tenha subido.

As concentrações de sulfatos aumentaram ao longo dos ensaios de biolixiviação de forma gradual para as amostras ALC17 e BG17. Tal como no 1º ensaio de biolixiviação, este aumento pode ser explicado pela atividade microbiana, ou seja, pelo facto dos microrganismos quimio-lito-autotróficos oxidarem os elementos que lhes fornecem energia.

No caso do ensaio de biolixiviação utilizando a amostra BG17_2 verificou-se o maior aumento da concentração de sulfatos ao longo do ensaio, ou seja, houve um aumento de 1232,82 mg/l para 2849 mg/l, tal como nos ensaios anteriores, este facto pode ser explicado pela atividade microbiana presente na cultura.

4.4.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS)

A visualização das amostras utilizadas nos ensaios de biolixiviação em matraz e reator, utilizando as amostras BG17 e ALC17 respetivamente, fez-se recorrendo à Microscopia Eletrónica de Varrimento em alto vácuo (SEM/EDS) (Scanning electron microscopy) no Centro de Materiais na Universidade do Porto (CEMUP). Esta análise fez-se no dia em que terminaram ambos os ensaios, ou seja, ao final de 32 dias.

Na figura 32 é possível visualizar a amostra BG17 proveniente da mina da Panasqueira e na figura 32 é possível visualizar a amostra ALC17 proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo recolhidas dia 32 dos ensaios de biolixiviação correspondentes.

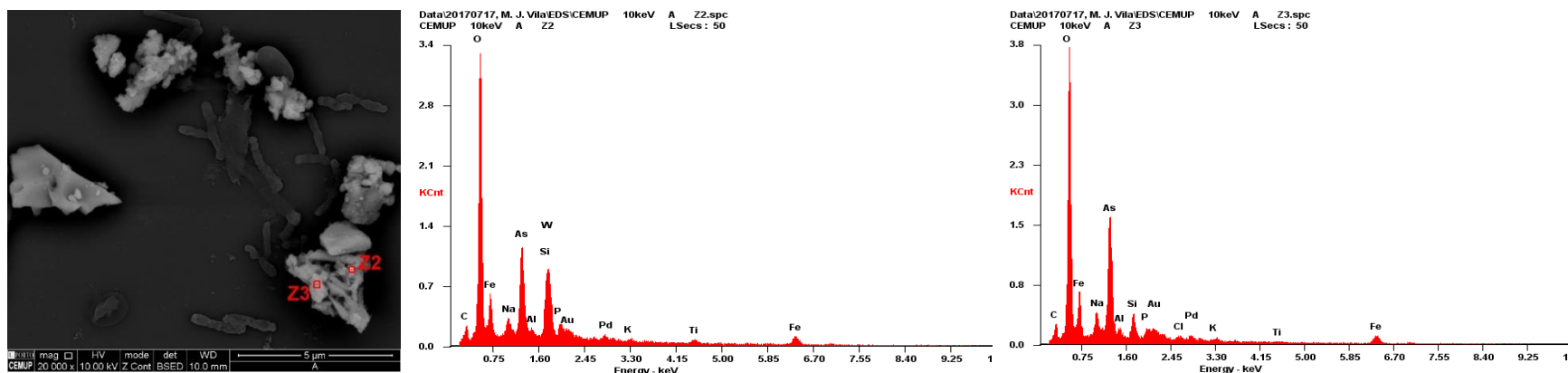


Figura 32 - Amostra retirada ao final do ensaio de biolixiviação em matraz (ao fim de 32 dias). Legenda: Z2 – Arsenopirite (FeAsS) e Volframite ($(\text{Fe,Mn})\text{WO}_4$) e Z3 – Silicatos magnésio e alumínio e Arsenopirite (FeAsS).

Da figura 32, pode-se retirar as seguintes conclusões: esta amostra (BG17), após biolixiviação, é constituída principalmente por enxofre (S), ferro (Fe), arsénio (As), volfrâmio (W) e silicatos o que consiste com as principais espécies minerais que se encontram na mina da Panasqueira.

É possível verificar a existência de bactérias com a forma de bastonete (bacilos) que confirmam os resultados obtidos anteriormente na identificação dos isolados obtidos. Estes microrganismos apresentavam um tamanho médio de $1422 \mu\text{m}$. Pode-se concluir que estes microrganismos estavam presentes na amostra, mas seriam microrganismos não cultiváveis no meio de cultura utilizado (R2A) visto que ao fim de 21 dias de ensaio de biolixiviação não foi possível contabilizar o número de UFC devido ao aparecimento de fungos cultiváveis na cultura.

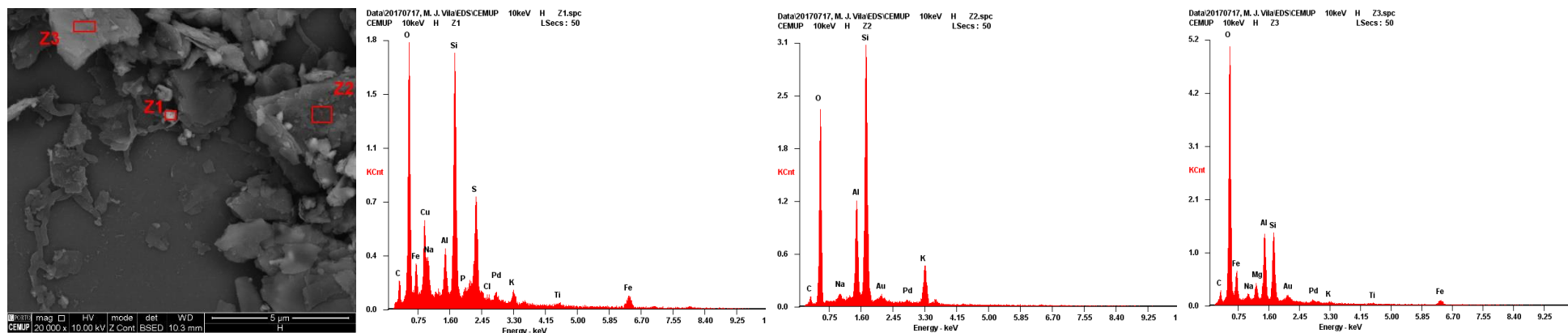


Figura 33 - Amostra retirada no final do ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17 (ao fim de 32 dias). Legenda: Z1 – Calcopirite (CuFeS_2); Z2 – Silicatos de alumínio e Z3 – Silicatos de alumínio e magnésio.

No que diz respeito à amostra ALC17 (fig. 33) proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo, após biolixiviação, os principais elementos observados foram o cobre (Cu), o ferro (Fe), o enxofre (S) e silicatos. Esta observação consiste com as principais espécies minerais encontradas na mina de Neves Corvo.

Em relação à observação de microrganismos, devido ao facto de esta amostra ser possuir uma elevada quantidade de minérios, apenas é possível verificar um pequeno número de microrganismos na forma de bastonete (bacilos) e um número ainda menor de microrganismos de forma esférica (cocos) que se encontravam por baixo dos minérios. A forma e a quantidade destes microrganismos consistem com os resultados obtidos na identificação dos isolados descritos no Capítulo anterior. Estes microrganismos apresentavam um tamanho médio de 177,93 μm .

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para além das conclusões apresentadas ao longo dos capítulos e subcapítulos, procura-se agora expor as principais conclusões obtidas ao fim deste trabalho.

Uma primeira consideração final acerca deste trabalho atenta para a aplicabilidade das técnicas empregues, quando utilizadas no fenómeno em estudo, a lixiviação bacteriana.

Foi possível caracterizar a comunidade bacteriana autóctone presente numa amostra da mina de Neves Corvo. Este estudo permitiu concluir que a amostra proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo possuía populações quimio-organo-heterotróficas cultiváveis em meio R2A. Estas populações apresentaram uma densidade de cerca de $\sim 10^6$ UFC/ml após 7 dias de cultura. Foi caracterizada a comunidade bacteriana para o dia 0 de incubação dos inóculos sujeitos a biolixiviação em que o género dominante foi o *Pseudomonas stutzeri*, organismos provenientes de solos e águas marinhas. A capacidade deste microrganismo para metabolizar uma ampla gama de substratos pode torná-lo numa alternativa a utilizar nos processos de biolixiviação. Também se identificaram organismos cuja proveniência mais provável pode ser a água utilizada no processo de tratamento efetuado na lavaria do cobre da mina de Neves Corvo.

A população microbiana nas amostras em estudo foi capaz de lixiviar zinco (Zn), cobre (Cu) e chumbo (Pb) de uma amostra proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo (amostra ALC17) e arsénio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) de amostras provenientes dos resíduos da mina da Panasqueira (Barroca Grande) (amostras BG17 e BG17_2).

Nesta investigação, os resultados das recuperações em metais críticos não foram tão promissores quanto seria esperado comparado com processos industriais abióticos. Uma das suposições para a baixa recuperação obtida foi o reduzido tempo de biolixiviação. Os ensaios de biolixiviação prolongaram-se durante 32 dias que é um período relativamente curto para um processo de cinética tão lenta como o processo de biolixiviação. Outra das hipóteses consideradas foi uma possível contaminação das soluções de biolixiviação. Embora a amostragem fosse feita em ambiente de assepsia, poderá ter ocorrido alguma contaminação das soluções que poderá ter alterado as características da comunidade bacteriana presente. No entanto, os resultados obtidos nos ensaios de biolixiviação sugerem que este fenómeno poderá ser usado no futuro em processos tratamento bem como processos de recuperação. Os resultados obtidos dos ensaios de biolixiviação para os elementos zinco, cobre, chumbo, cádmio e arsénio foram os expectáveis, confirmou-se uma evolução positiva nas concentrações durante o período de incubação usado. Para os restantes compostos analisados (concentração dos restantes metais) não foram obtidos resultados conclusivos. Podem ser apontadas várias razões para este facto, tais como, interferências associadas à metodologia utilizada, nomeadamente com agentes oxidantes presentes na amostra ou pela influência dos componentes do meio mineral utilizado.

Relativamente ao processo de identificação das comunidades bacterianas presentes na amostra, é possível concluir que as metodologias aplicadas para a concretização desta etapa foram alcançadas. Contudo a identificação dos microrganismos não foi a esperada visto que apenas um número reduzido das identificações efetuadas está direto ou indiretamente relacionado com a extração mineira. Os fatores que contribuíram para estas discordâncias estarão relacionados com o processo de tratamento ao qual a amostra foi sujeita ou a aplicação de tratamentos químicos, que poderão ter alterado as suas características microbiológicas originais.

No processo de sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S, os resultados foram nitidamente dominados pelo género *Limnobacter*, o qual não foi identificado quando se fez o isolamento de microrganismos presentes na amostra ALC17 em meio de cultura R2A agar. Para além do género *Limnobacter*, também se identificaram géneros de bactérias quimio-lito-autotróficas que são relevantes no processo de biolixiviação tais como o *Thermithiobacillus*, o género *Thiobacilluse* o género *Halothiobacillus*. A interação destes microrganismos é importante para o processo de biolixiviação, visto que esta interação permite obter recuperações superiores nos processos de biolixiviação.

No primeiro ensaio de biolixiviação em matraz, utilizando uma amostra dos resíduos da mina da Panasqueira (amostra BG17) verificou-se uma diminuição do número de unidades formadoras de colónias quando comparado com os valores dos ensaios de biolixiviação utilizando amostras da mina de Neves Corvo. Pode-se concluir que os resíduos provenientes da exploração da mina da Panasqueira, contêm elementos inibidores ao crescimento bacteriano.

O ensaio de biolixiviação em matraz contendo a amostra BG17_2 foi o ensaio em que se verificou uma maior eficiência quando comparada com os outros ensaios. Tal como referido anteriormente, esta observação pode estar diretamente ligada à diluição das amostras utilizadas nos ensaios de biolixiviação anteriores (amostras ALC17 e BG17) onde poderá ter ocorrido uma diminuição da comunidade bacteriana disponível para o processo de biolixiviação.

Entre os processos hidromineralúrgicos, as técnicas bio-hidromineralúrgicas surgem como uma alternativa quer para o tratamento de minérios, quer de rejeitados devido a este se tratar de um processo de reduzido custo operacional e de instalação, baixo consumo de energia e impacto ambiental. Uma das limitações do processo de biolixiviação aplicado a minérios complexos com libertação muito fina e/ou minérios refratários é a lenta cinética das reações, exigindo um elevado tempo de residência que pode inviabilizar a economia do processo. Por esta razão a investigação tem incidido em como incrementar a cinética e aumentar o rendimento da biolixiviação. A possibilidade de aumentar as taxas da biolixiviação dependem do uso de catalisadores, do isolamento térmico, da melhoria do design dos reatores e do desenvolvimento de novos microrganismos com maior capacidade de lixiviar minérios.

Terminado o projeto de investigação relacionado com o estudo da capacidade de biolixiviação das comunidades bacterianas em ambientes mineiros existem etapas e procedimentos que podem ser adotados para a continuidade do mesmo e melhoria dos resultados e futuras conclusões. O desenvolvimento futuro do processo vai incluir as bactérias termófilas que prosperam a temperaturas mais elevadas que as utilizadas ao longo deste trabalho e que prosperam em amostras de minério e em ambientes aquosos. Estas irão ter um papel importante e crescente na biolixiviação de minerais. O aumento da temperatura do processo permitirá uma cinética mais rápida.

Uma das alterações que pode ser feita em trabalhos futuros é aumentar o tempo dos ensaios de biolixiviação. Os ensaios experimentais são muito morosos, o que impediu a repetição de mais. Só com a repetição das experiências é que se poderia obter dados mais consistentes para avançar para o desenvolvimento de um modelo matemático do processo.

O facto de o trabalho ter sido realizado recorrendo a organismos vivos trouxe algumas limitações e a mais evidente foi a dificuldade em replicar uma experiência. Utilizando culturas preparadas nas mesmas condições, com mesma proporção de meio mineral e amostra utilizada, era possível verificar o aparecimento de colónias de bactérias com morfologia diferente das culturas anteriores. Uma razão para este acontecimento seria a representatividade das amostras sólidas utilizadas nos ensaios. As amostras provenientes das diferentes minas, mina de Neves Corvo e mina da Panasqueira eram amostras de grande dimensão tornou-se difícil que a amostra recolhida

fosse representativa de toda a comunidade microbiana presente na amostra original. Outra limitação encontrada ao longo desta dissertação foi o tempo despendido à procura de um meio mineral adequado ao crescimento das bactérias autóctones e de uma cultura adequada para servir de inóculo aos ensaios de biolixiviação.

Visto que se efetuaram análises das comunidades bacterianas presentes numa amostra representativa da etapa inicial do tratamento da mina de Neves Corvo, amostra esta recolhida na Lavaria do Cobre, seria pertinente a realização deste estudo para uma amostra representativa do final do processo de tratamento. Seria também pertinente esta análise para uma amostra representativa da fase inicial do processo de tratamento da Lavaria da mina da Panasqueira. Seria oportuno a realização dos procedimentos adotados neste trabalho, com vista a estabelecer uma análise comparativa entre os resultados obtidos nesta investigação e resultados obtidos a partir da fase final do processo para a mina da Neves Corvo e da fase inicial da mina da Panasqueira. Esta análise comparativa permitiria obter conclusões relativas à influência do processo de tratamento nas comunidades bacterianas e também permitiria estabelecer relações entre comunidades bacterianas de explorações mineiras de diferentes minérios.

Seria ainda pertinente aprofundar a investigação nos seguintes aspetos: a análise dos metais minoritários presentes nas amostras; análise do resíduo sólido resultante dos ensaios de biolixiviação - esta análise permitiria a comparação da concentração de metais presentes na fase líquida e na fase sólida bem como o papel dos microrganismos na alteração da amostra utilizada, por sua vez, permitiriam projetar instalações piloto e/ou industriais; realização de ensaios com mais variações nos principais parâmetros que afetam a biolixiviação, tais como, utilização de diferentes meios de cultura, pH, temperatura, granulometria da amostra e tempo do ensaio de modo a otimizar as condições operatórias. Não é relevante considerar apenas uma das variáveis, mas sim a conjugação de mais do que uma. Poderia então optar-se por um estudo exaustivo de todas as combinações segundo um plano fatorial, para um melhor ajuste à realidade.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahmadi, A., Schaffie, M., Manafi, Z. & Ranjbar, M. (2010). Eletrochemical bioleaching of high grade chalcopyrite flotation concentrates in a stirred bioreactor.
- Antunes, S., (2010). Levantamento do Estado de Contaminação da Barragem de Lamas e Escombreira da Mina da Panasqueira. Dissertação apresentada na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Departamento de Engenharia de Minas e Geoambiente. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto.
- ATCC - The Global Bioresource Center. ATCC Medium: 2511 M9 Minimal Agar/Broth. Recuperado de: <https://www.atcc.org/~media/B3590BBD1DF74203B0E8F0890ECF974F.ashx>
- Barret, J., Hugher, M. N., Karavaiko, G. I. & Spencer, P. A. (1992). *Metals extraction by bacterial oxidation of minerals*, Perth, Australia: Ellis Horwood Limited.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U. & Egli, T. (2007) 'Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry', *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 3283–3290.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J. & Simões, M. (2013) 'Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria.', *Microbial Drug Resistance*.
- Brock, T., Brock, K., Belly, R., Weiss, R., (1972). *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. & Eaton, A. D. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. s.l.:Hardcover.
- Colling, A. (2014). Biolixiviação para o aproveitamento da pirite presente em rejeitos de carvão mineral. (Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Brasil).
- Coram N., and Rawlings, D., (2001). Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C.
- Dhanial, S., Kaur, I., Korpole, S., Schummann, P., Cameotra, S., Pukall, R., Klenk, H. & Mavilrai, S., (2011). *Agrococcus carbonis* sp. nov., isolated from soil of a coal mine.
- Donati, R. E. & Wolfgang, S. (2007). *Microbial Processing of Metal Sulfides*. s.l.:Springer.
- Douglas E. Rawlings, (2002). Heavy Metal Mining Using Microbes. Annual review of microbiology. 56, pp. 65-91. Recuperado de: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161052.
- Ehrlich, H.L., (2001). Past, present and future of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 59, pp. 127-137.
- F. Godoy, M. Vancanneyt, M. Martínez, A. Steinbuchel, J. Swings & B. H. A. Rehm (2003). *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates

polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov.

Ferreira, C., Pereira, A., Pereira, M., Simões M. & Melo, L., (2011). Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, Portugal. *Biofilm Control With New Microparticles With Immobilized Biocide*.

Fitriyah, D., Arimurti, S. & Senjarini, K., (2013). Physiological and Molecular Characteristics of Bacterial Isolates from Bandarlit Coastal Area Jember, East Java. Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Jember University, Jalan Kalimantan, Jember.

Fiúza, A. (2010). Departamento de Minas da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Texto-Base para uma Disciplina do 4º Ano do Mestrado em Engenharia de Minas e Geo-Ambiente.

Garcia, O. (1989). *Estudos da biolixiviação de minérios de urânio por Thiobacillus ferrooxidans*. Tese de Doutoramento – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Garcia, O. (1995). Utilização de microrganismos em processos bio-hidrometalúrgicos. Encontros de Metalurgia, Mineração e Materiais da UFMG, Belo Horizonte.

Garcia O., Wilmo, F., & Bevilaqua, D., (2007). Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Estudo da Dissolução Oxidativa Microbiológica de uma Complexa Amostra Mineral Contendo Pirita (FeS_2), Pirrotita (Fe_{1-x}S) e Molibdenita (MoS_2).

Gabriel, J. (2012). Otimização do sistema de suporte por cabos da Mina de Neves-Corvo. (Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Geológica e de Minas - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa).

Garrity, G., Brenner, D. . J., Krieg, N. R. & Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria (Part C)*. s.l.:Springer Science & Business Media.

Gonçalves, A. (2016). Exploração Mineira e Impactes Ambientais, o caso das Minas da Panasqueira. GEGOT – Centro de Estudos de Geografia e Ordenamento do Território.

Grumann C. Eletroforese (2017). Recuperado de: http://genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/genetica_molecular/eletroforese.pdf

Hall, T., (2013). *BioEdit Biological sequence alignment editor*. [Online]

Herlemann D., Labrenz M., Juergens K., Bertilsson S., Waniek JJ. and Andersson AF (2011). Transition in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. ISME. 5, pp. 1571 - 1579.

ITGE (1991). Minería Química, Ministério de Indústria, Comércio y Turismo, Secretaria General de la Energía y Recursos Minerales, Instituto Tecnológico GeoMineiro de Espanha.

John A. Fuerst, John A. Hawkins, Andrew Holmes, Lindsay I., Chris J. Moore & Erko Stackebrandt (1993). *Polphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an Aerobic Bacteriochlorophyll-Synthesizing Budding Bacterium from Fresh Water.

Johnson, D. (2001). Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies, Hydrometallurgy. 59, pp. 147-157.

Jorge Lalucat, Antoni Bennasar, Rafael Bosh, Elena García-Valdés & Norberto J. Palleroni (2006). *Biology of Pseudomonas stutzeri*.

Jornal de Negócios - *ARC Ratings desce notação, de A-1 + para A-1 com tendência estável, à Somincor*. Recuperado de: http://www.jornaldenegocios.pt/files/2014-01/02-012014_17_19_52_Somincor_02_Jan_2014_PT.pdf

Kelly D, & Wood A. (2000). *Int J Syst Evol Microbiol*. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. 50(2):511-516 doi:10.1099/00207713-50-2-511. Recuperado de: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/50/2/0500511a.pdf?expires=1505137390&id=id&accname=guest&checksum=0BFF416B4E10EA1C27D9E95DBA135B50>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41(1), e1.

Lee, H., Kim, S., Im, W., Oh, H., & Sung-Taik Lee (2009). *Pedobacter composti* sp. nov., isolated from Compost.

Leibniz Association (2015). Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cells Cultures. DSMZ_71 (*Acidithiobacillus ferrooxidans* medium – thiosulfate).

Leibniz Association (2014). German Collection of Microorganisms and Cells Cultures. *Acidiferrobacter* (MS) Medium.

Lourenço, A. (2008). *As minas da Panasqueira*. Reitoria da Universidade do Porto. Centro de Geologia da Universidade do Porto. Recuperado de: <http://www.cienciaviva.pt/veraocv/2010/downloads/Minas%20da%20Panasqueira.pdf>

Lynn, N. S. (1997). The bioleaching and processing of refractory gold ore: overview. *Journal of Minerals, Metals and Materials*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02914870>

Manuel, C., (2007). *Biofilm Dynamics and Drinking Water Stability: Effects of Hydrodynamics and Surface Materials* Dissertation submitted for the degree of Doctor in Sciences of Engineering

Martins, L., (2012). *Exploration and Exploitation of Mineral Resources in Portugal*. “Mineral Resources of Portugal”. Governo de Portugal, Ministério da Economia e do Emprego, Direção Geral de Energia e Geologia. Recuperado de: <http://www.peprobe.com/wp-content/uploads/2014/05/Mineral-Resources-of-Portugal1.pdf>

Melvin P. Silverman & Donald G. Lundgren (1991). *ITGE*.

Madigan, Michael T., Martinko, John M., Dunlap, Paul V. & Clark, David P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Education, Limited, 12^a Edition.

Mindat - Panasqueira Mines, Covilhã, Castelo Branco District, Portugal, (2013). Recuperado de: <http://www.mindat.org/loc-2591.html>

Mindat - Neves-Corvo Mine, Santa Bárbara de Padrões, Castro Verde, Beja District, Portugal. Recuperado de: <https://www.mindat.org/loc-14752.html>

Mohanty, S., Ghosh, S., Nayak, S. & Das, A., (2016). Bioleaching of manganese by *Aspergillus* sp. isolated from mining Deposits.

- Nguyen, Tuan & Kim, Jaisoo. (2017). *Limnobacter humi* sp. nov., a thiosulfate-oxidizing, heterotrophic bacterium isolated from humus soil, and emended description of the genus *Limnobacter* Spring et al. 2001. *Journal of Microbiology*. 55. 10.1007/s12275-017-6645-7. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/317416109_Limnobacter_humi_sp_nov_a_thiosulfate-oxidizing_heterotrophic_bacterium_isolated_from_humus_soil_and_emended_description_of_the_genus_Limnobacter_Spring_et_al_2001
- Ohtsubo, Y., Nonoyama, Y., Nagata, Y., Numata, M., Tsuchikane, K., Hosovama, A., Yamazoe, A., Tsuda, M., Fujita N., & Kawaic, F., (2016). Complete Genome Sequence of *Sphingopyxis terrae* Strain 203-1 (NBRC 111660), a Polyethylene Glycol Degradar.
- Pelczar, Jr., M. J., Chan, E. C. & Krieg, N. R. (1996). *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2ª ed. São Paulo: MAKRON Books.
- Penn, C. (1991). Chapter 1. Equipment and materials; Chapter 5. Sterility and aseptic technique. *Handling Laboratory Microorganisms*, Open University Press, Philadelphia.
- Pereira, E. & Rodrigues, J. (2009). *Geologia II. Notas orientadoras do curso de Licenciatura em Ciências da Engenharia – Engenharia de Minas e Geoambiente da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto*.
- Philippe J. M. Bouvet & Patrick A. D. Grimont (1986). Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*.
- Pradhan, N.; Nathsarma, K.C.; Srinivasa Rao, K.; Sukla, L.B.; Mishra, B.K. (2008). Heap bioleaching of chalcopyrite: A review, *Minerals Engineering*.
- Ribeiro, Jaques, L., Gonçalves & Anselmo C. R. (2013). Contributo para o Conhecimento Geológico e Geomorfológico da Área Envolvente do couro Mineiro da Panasqueira. *Revista GOT – Geografia e Ordenamento do Território*. Recuperado de: <http://cegot.org/ojs/index.php/GOT/article/view/70/35>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmieder, R & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 27, pp. 863 - 864.
- Schubert M, Lindgreen S & Orlando L. (2016). AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res Notes*. 9: 88.
- Semenza, M., Viera, M., Curutchet, G., & Donati, E. (2002). The role of *Acidithiobacillus Caldud* in the bioleaching of metal sulfides. *Latin American applied research*, v. 32, p. 303-306. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-07932002000400006&lng=es&tlng=en.
- Sievert, S., Heidorn T., & Kuever, J., (2000). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* *Halothiobacillus kellyi* sp. nov., a mesophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfuroxidizing bacterium isolated from a shallowwater hydrothermal vent in the Aegean Sea, and emended description of the genus *Halothiobacillus*.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. (1997). São Paulo: Varela. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. p.259.

SOMINCOR - Seminário “O Legado Mineiro Sustentável”. Gama, H., 29 maio 2015. Sustentabilidade na Fase de Exploração, Mina de Neves Corvo. Recuperado de: http://www.ordemengenheiros.pt/fotos/dossier_artigo/20150529_hgama_944045248557efceb523ec.pdf

SOMINCOR – Seminário de Gestão, Projeto, construção e Encerramento de Instalações de Resíduos Mineiros. Mina de Neves Corvo. A problemática da Gestão dos Resíduos Mineiros, 2015. Recuperado de: http://www.ordemengenheiros.pt/fotos/dossier_artigo/20170127_moliveira_58580693354d3502c68934.pdf

SOMINCOR – Sociedade Mineira de Neves-Corvo, S.A. 2017. Recuperado de: <http://somincor.com.pt/>

Song, C., Wen-Qing, Q. & Guan-Zhou, Q., (2008). Effect of Cu^{2+} ions on bioleaching of marmatite, Transactions of Nonferrous Metals society of China. v. 18, pp. 1518-1522.

Wu, Y., Wu, M., Wang, C., Wang, X., Yang, J., Oren, A., & Xu, X., (2008). *Microbacterium profundum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of polymetallic nodule environments.

Xie, F., Ma, H., Quan, S., Liu, D., Chen, G., Chao Y., & Qian, S., (2014). *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from a phosphate mine.

Ye, X., Chu, C., Shi, C., Zhu, J., He, Q., & He, J., (2015). *Lysobacter caeni* sp. nov., isolated from the sludge of a pesticide manufacturing factory.

Yingnan Fu, Qipei Li, Keshao Liu, Yongle Xu, Yanan Wang e Nianzhi Jiao (2011). *Paracoccus oceanense* sp. nov., Isolated from the West Pacific.

Young, C., Lin, S., A. Arun, Shen, F., Chen, W., Rekha, P., Langer, S., Busse, H., Wu, Y., & Kampfer, P., (2009). *Algoriphagus olei* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil

Zhang, D., Liu, H., Xin, Y., Zhou, Y., Schinner, F., Margesin, R., (2010). *Sphingopyxis bauzanensis* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from soil.

7. ANEXOS

ANEXO I - Metodologia Experimental

i) Amostras utilizadas ao longo do trabalho laboratorial

O caso de estudo foi desenvolvido a partir de amostras representativas dos resíduos e da alimentação da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo, recolhidas em diferentes datas e de amostras provenientes dos resíduos da escombreira da Mina da Panasqueira (Barroca Grande e Cabeço do Pião). De modo a simplificar o trabalho laboratorial deram-se nomes a estas amostras que se encontram descritas por ordem de cronológica de utilização na tabela 15.

Tabela 15 - Amostras utilizadas ao longo do trabalho experimental

Nome	Local e data da recolha da amostra
CP16	Amostra do Cabeço do Pião (Mina da Panasqueira) recolhida em 2016
RLC16	Amostra dos resíduos da Lavaria do Cobre (Mina de Neves Corvo) recolhida em 15/12/16
ALC16	Amostra da alimentação da Lavaria do Cobre (Mina de Neves Corvo) recolhida em 15/12/16
ALC17	Amostra da alimentação da Lavaria do Cobre (Mina de Neves Corvo) recolhida em 17/3/17
RLC17	Amostra dos resíduos da Lavaria do Cobre (Mina de Neves Corvo) recolhida em 17/3/17
RLC06	Amostra dos resíduos da Lavaria do Cobre (Mina de Neves Corvo) recolhida em junho de 2006
BG17	Amostra da Barroca Grande (Mina da Panasqueira) recolhida em 09/02/17

ii) Preparação de meios de cultura

O primeiro meio mineral preparado foi o meio M9. A preparação deste meio foi adotada seguindo o protocolo fornecido pelo Global Bioresource Center (ATCC, 2017). Para a preparação de 1000 ml de meio: Na_2HPO_4 (33 g); KH_2PO_4 (15 g); NaCl (2,5 g); $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (0,72 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,49 g); CaCl_2 (0,15 g); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 ml); água destilada (1000 ml). Para a sua preparação, devem ser adicionados todos os reagentes exceto o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O pH foi ajustado entre 6,5 – 7. Posteriormente o frasco foi colocado no autoclave a 121°C durante 15 minutos. Não foi utilizado o volume total de água destilada (1000 ml) para a preparação do meio mineral pois foi necessário adicionar o Na_2HPO_4 com recurso a um filtro de seringa. Esta solução ficou com uma cor acastanhada depois de ir para o autoclave a 121°C por 15 minutos, isto aconteceu, pois, alguns antibióticos, vitaminas, aminoácidos ou açúcares podem sofrer alterações incluindo degradação a 121°C e, para além desta cor a solução formou um precipitado branco por isso, decidiu-se não utilizar este meio.

O passo seguinte foi a preparação do meio 9K. A preparação deste meio foi adotada de Silverman e Lundgren, (ITGE, 1991). Para a preparação de 1000 ml de meio: FeSO_4 (9 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g); KH_2PO_4 (0,50 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,50 g); KCl (0,050 g); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,010 g); KH_2PO_4 (10 ml); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 ml). O pH foi ajustado entre 6,5 – 6,8. Posteriormente os frascos foram colocados no autoclave a 121°C durante 15 minutos. Não foi utilizado o volume total de água destilada (1000 ml) para a preparação do meio mineral pois foi necessário adicionar o KH_2PO_4 , colocado no autoclave em separado e o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, adicionado posteriormente, com recurso

a um filtro de seringa. Este meio não foi utilizado porque em trabalhos semelhantes não estava a ter resultados favoráveis.

Após a preparação dos meios anteriores o passo seguinte foi a utilização do meio mineral DSMZ_71 (*Acidithiobacillus ferrooxidans medium – thiosulfate*). Este é um meio muito seletivo em que só se conseguem desenvolver os microrganismos que estiverem adaptados aos sais que o constituem pois contém substâncias que inibem o crescimento de determinados microrganismos, mas permite o crescimento de outros (Leibniz Association, 2015). Para a preparação de 1000 ml de meio: KH_2PO_4 (3,00 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,50 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,00 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5,00 g), Água destilada (1000 ml). Para a sua preparação, devem ser adicionados todos os compostos excluindo o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O pH foi ajustado entre 4,4 – 4,7, por indicação do protocolo da DSMZ (para tal utilizou-se ácido clorídrico [0,1 M]). Posteriormente o frasco foi colocado no autoclave a 121°C durante 15 minutos. Não foi utilizado o volume total de água destilada (1000 ml) para a preparação do meio mineral pois foi necessário adicionar o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com recurso a um filtro de seringa. Este meio foi preparado para espalhamento em placas de *petri* (com a adição de agar ao preparado) e para incubação da amostra em meio líquido (sem a adição de agar).

O meio de cultura seguinte a ser preparado foi o MSM de S. Mohanty *et. al.*, 2016. O meio MSM (Minimal Salt Medium). Para a preparação de 1000 ml de meio: Extrato de levedura (0,5 g); $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (10 g); K_2HPO_4 (1,5 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g) e NaCl (0,2 g). O pH foi ajustado a 5. Posteriormente o frasco foi colocado no autoclave a 121°C durante 15 minutos.

O último meio preparado foi o meio DSM_670 – *Acidiferrobacter (MS) Medium* (Leibniz Association, 2014). Para a preparação de 1000 ml de meio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g) e K_2HPO_4 (0,1 g). Ajustou-se o pH a 3,5 com recurso a ácido clorídrico 0,1 M e colocou-se no autoclave a 121°C durante 15 minutos.

iii) Preparação das culturas

Ao longo deste trabalho laboratorial foram preparadas diferentes culturas utilizando amostras provenientes da mina de Neves Corvo e da mina da Panasqueira com os meios de cultura referidos anteriormente de modo a eger a(s) cultura(s) mais adequada(s) para a inoculação das amostras a lixiviar. Estas culturas foram abandonadas visto não terem sido obtidos resultados satisfatórios. Estas culturas encontram-se descritas na Tabela 16.

Tabela 16 – Preparação das culturas utilizadas ao longo do trabalho experimental.

Culturas	
1)	20 g de amostra do CP16 + 250 ml de solução salina a 0,85%
2)	20 ml de meio mineral DSMZ_71 + 10 ml de RLC16 + solução padrão de W (8 µM)
3)	33 ml de meio mineral DSMZ_71 + 17 ml de amostra de RLC16
4)	50 ml de meio mineral DSMZ_71 + 10 g de amostra da ALC16
5)	33 ml de meio mineral TB + 17 ml de amostra de RLC16
6)	50 ml de meio mineral TB + 10 g de amostra de ALC16
7)	33 ml de meio mineral MSM + 17 ml de amostra de RLC16

8)	50 ml de meio mineral MSM + 10 g de amostra de ALC16
9)	50 ml de meio mineral DSMZ_71 + 10 g de amostra de ALC17
10)	35 ml de meio mineral DSMZ_71 + 15 ml de amostra de RLC17
11)	50 ml de meio mineral TB + 10 g de amostra de ALC16
12)	50 ml de meio mineral DSMZ_71 + 10 g de amostra de RLC06
13)	50 ml de meio mineral MSM + 10 g de amostra de RLC06
14)	50 ml de meio mineral TB + 10 g de amostra de RLC06
15)	50 ml de meio mineral TB + 10 g de amostra de ALC17 (Nova cultura mãe - NCM)
16)	Cultura M – constituída por 25 ml de NCM + 575 ml de meio mineral TB. Esta cultura serviu de inóculo ao ensaio de biolixiviação em matraz com a amostra BG17
17)	Cultura R – constituída por 25 ml de NCM + 575 ml de meio mineral TB Esta cultura serviu de inóculo ao ensaio de biolixiviação em reator contendo a amostra ALC17

A primeira cultura preparada (com amostra CP16) foi colocada a agitar a 140 rpm e a temperatura de 26 °C. Depois de três dias a incubar fez-se espalhamentos em meio de cultura R2A agar. Fez-se espalhamentos em placas de *Petri* após 7 dias de incubação desta cultura e as placas de *Petri* foram colocadas a incubar à temperatura de 26 °C para que pudesse ocorrer crescimento de microrganismos. Ao fim de uma semana fez-se a contagem de microrganismos e a caracterização da morfologia colonial, mas não se verificou crescimento de microrganismos. Concluiu-se que não existiam microrganismos cultiváveis nesta amostra utilizando estas condições.

Face a estes resultados foi decidido utilizar outra amostra, a amostra RLC16. De modo a apurar se os microrganismos seriam resistentes a ambientes com tungsténio colocou-se na cultura uma solução padrão de W inicialmente com concentração de 8 µM. Esta cultura foi espalhada em meio de cultura R2A agar e DSMZ_71 com agar. Depois de uma semana de incubação das placas de *Petri* era possível observar dois tipos distintos de bactérias como se pode verificar pela fig. 35. A descrição destas bactérias encontra-se na Tabela 17.

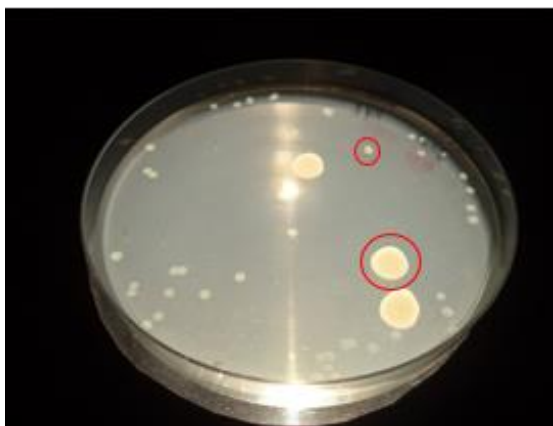


Figura 34 - Placa de *Petri* com meio R2A agar destacando os 2 tipos de colónias de bactérias (B1 e B2) (diluição 10^{-1}).

Tabela 17 – Caracterização dos isolados identificadas na cultura constituída por 10 ml de RL16 e 20 ml de meio DSMZ_71.

Nome	Cor	Margem	Tamanho (mm)	Forma	Elevação	Brilho	Opacidade
B1	Bege	Inteira	1,5	Circular	Plana	Brilhante	Opaca
B2	Bege	Inteira	5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca

Após uma semana de incubação desta cultura fez-se novos espalhamentos em meios de cultivo de R2A agar e DSMZ_71 com agar. Desta cultura foram transferidos 5 ml, cerca de 10 % desta solução para um balão de Erlenmeyer de 500 ml com meio DSMZ_71. A esta cultura acrescentou-se uma concentração mais elevada de solução padrão de W ($15 \mu\text{M}$). De modo a perceber se a comunidade bacteriana presente na amostra era significativa, foi medida a densidade ótica desta solução no espectrofotómetro V-1200 *spectrophometer* VWR no Departamento de Química.

O método turbidimétrico consiste na determinação da densidade ótica (D.O.) ou absorvância de amostras da cultura, ou das suas diluições. Este valor pode ser relacionando com o número de células, isto é, quanto maior é o número de células, maior é a D.O. da suspensão. Este método tem como principais desvantagens o fato de não distinguir as células vivas das mortas e de não distinguir partículas em suspensão de células.

Os resultados desta medida foram para a cultura inicial (constituída por 10 ml de RLC16 + 20 ml de meio DSMZ_71 + $8 \mu\text{M}$ de solução padrão W) de 0,114 e da cultura transferida de 0,017, o que significava que estas amostras apresentavam D.O. baixas, ou seja, tinham um baixo número de células em suspensão. Cerca de uma semana após serem feitos os espalhamentos em placas de Petri não foi possível verificar qualquer aparecimento de UCF. Decidiu-se então que algumas das placas de Petri resultantes dos espalhamentos destas culturas seriam analisadas com recurso ao microscópio de fluorescência OLYMPUS SZX10 no Departamento de Metalurgia, de modo a tentar perceber se era possível ver algumas colónias que poderiam ser invisíveis a olho nu. Desta análise (fig. 35) pode-se verificar que na placa com meio de cultura R2A agar se encontravam umas colónias muito pequenas de cor bege com um núcleo alaranjado e na placa com meio sólido de DSMZ_71 com agar não se consegue verificar crescimento de colónias, mas apenas se identificavam pequenas fissuras que apareciam no próprio meio de cultura.

**Figura 35 - Cultura em meio de cultura R2A agar, ampliação 100 x, diluição 10^{-5} e Cultura em meio de cultura DSMZ_71, ampliação 60 x, diluição 10^{-1} .**

Conclui-se que após a transferência da cultura anterior com aumento da concentração da solução padrão para $15 \mu\text{M}$ não foi possível verificar qualquer crescimento de UFC após 7 dias de incubação das placas de Petri.

De modo a tentar compreender o que teria acontecido com a cultura anterior em que se não verificou crescimento microbiano, preparou-se uma nova cultura constituída por 33 ml de meio

mineral DSMZ_71 e 17 ml de amostra RLC16, mas sem colocar a solução padrão de W. Fez-se espalhamentos em placas de Petri da cultura em meio DSMZ_71 com agar, R2A agar e PCA. Depois de sete dias não se verificou crescimento de microrganismos tal como tinha acontecido com a cultura anterior, mas para confirmar que os microrganismos tinham morrido, foi feito um Teste Live/Dead.

O teste Live/Dead Kit *BacLight TM*[®] (Invitrogen, EUA) consiste em dois corantes de ligação a ácidos nucleicos, o SYTO9TM (verde fluorescente – reagente A) que é capaz de penetrar em todas as células e permite a avaliação e contagem total de bactérias e o Iodeto de Propídio (PI) – reagente B que só consegue penetrar em células danificadas com membrana citoplasmática comprometida. A mistura das duas manchas produz fluorescência vermelha nas células danificadas (Berney *et al.*, 2007). O procedimento de coloração foi adaptado de Borges *et al.* 2013. Aproximadamente 500 µL de cada amostra foi corado com 250 µL de reagente A e 50 µL de reagente B diluído e filtrado através de um *Nucleopore* (Whatman, UK) uma membrana negra de polycarbonato. Após a filtração deixou-se os corantes a reagir durante 7 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após os 7 minutos a membrana foi colocada no BacLight de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As bactérias coradas foram observadas no microscópio Leica DM LB2 equipado com iluminação de fluorescência.

Foram analisadas a diluição 10^{-1} da cultura inicial (constituída por amostra RLC16 e meio mineral DSMZ_71 com 15 µM de solução padrão de W) e da cultura homóloga, mas sem esta solução. Os resultados deste teste podem-se verificar na fig. 36. e tal como se pode observar nesta imagem as bactérias encontravam-se mortas em ambas as culturas.

Várias razões podem ser apontadas para este acontecimento. As bactérias existentes na amostra RLC16 são bactérias mesófilas e o aumento de temperatura da estufa de 26 para 29 °C não seria uma razão para a sua morte, além disso, como a amostra é proveniente do distrito de Beja onde no verão são atingidas temperaturas muito superiores a estas. Outra causa para esta morte poderia ser a falta de “head space” na cápsula onde a amostra se encontrava armazenada. Esta cápsula estava completamente preenchida com a amostra líquida não permitindo que as bactérias captassem o carbono para o utilizarem nos seus processos metabólicos. Outra alternativa seria a falta de nutrientes da amostra que fez com que as bactérias crescessem muito lentamente e que posteriormente levaria à sua morte.

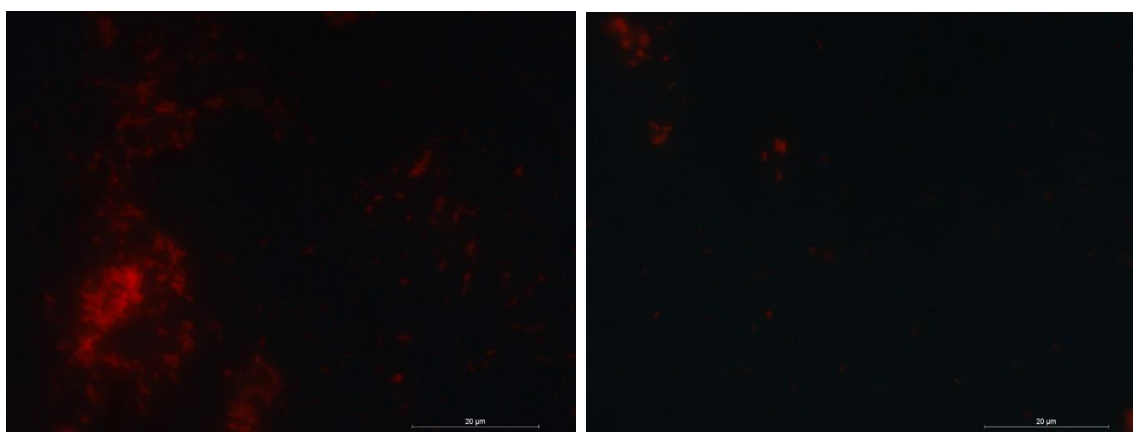


Figura 36 – Resultados do teste Live/Dead da cultura inicial (esquerda) e da cultura transferida (direita). Diluição 10^{-1} .

Como os resultados anteriores não foram favoráveis optou-se por preparar novos meios de cultura como foi descrito anteriormente. Prepararam-se também outras culturas constituídas por 17 ml de amostra RLC16 e 33 ml de cada um dos meios minerais, ou seja, DSMZ_71, TB e MSM. No caso das culturas preparadas com meio mineral MSM verificou-se que tinham desenvolvido fungos antes de se fazer os espalhamentos por isso foram excluídas.

Foram realizados testes de Catalase e Oxidase e Coloração de Gram, no Departamento de Química utilizando as novas culturas com amostra RLC16. Para além destas culturas prepararam-se três novas culturas com uma amostra provenientes da mina de Neves Corvo recolhidas no verão de 2016. A amostra utilizada é proveniente da alimentação da Lavaria do Cobre (ALC16). Fez-se espalhamentos em placas de *Petri* nos 3 meios de cultura, mas sem diluições com o propósito de se confirmar se existiam microrganismos cultiváveis nesta amostra. Tal como na cultura contendo RLC16, no caso do meio mineral MSM verificou-se que tinha desenvolvido fungos antes de se fazer os espalhamentos por isso foi excluída. Na cultura constituída por amostra ALC16 e meio mineral DSMZ_71 verificou-se um pequeno crescimento de UFC mas após se fazerem transferências desta não se verificou qualquer UFC em placas de *Petri*. Após sete dias de incubação das culturas, transferiu-se a cultura com amostra ALC16 e meio TB (5 ml de inóculo e 45 ml de meio TB fresco), o mesmo foi feito para a cultura com a mesma amostra e meio DSMZ_71. Após 7 dias de incubação das placas fez-se a contagem de UFC e a caracterização da morfologia colonial das culturas referidas anteriormente. A caracterização destas culturas e dos microrganismos identificados encontra-se descrita na Tabela 18.

Tabela 18 – Descrição das culturas preparadas com amostras da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo (ALC16 e RLC16).

Cultura	Meio de Cultura	Observações
20 ml de meio DSMZ_71 + 10 ml de amostra RLC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Identificaram-se 2 tipos distintos de colónias, umas colónias beges com núcleo mais escuro e forma circular e outras bactérias beges de forma circular mais pequenas.
50 ml de meio DSMZ_71 + 10 g de amostra ALC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Verificou-se um pequeno crescimento inicial, mas depois de se fazer transferências desta cultura para uma cultura com e sem solução padrão de W não se verificou crescimento nas placas de <i>Petri</i> para os 3 meios de cultura.
33 ml de meio TB + 17 ml de amostra RLC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Apenas se conseguiu contabilizar colónias nas placas de <i>Petri</i> com espalhamento direto em R2A agar e PCA. No meio de cultura DSMZ_71 com agar verificou-se crescimento bacteriano passados 48 horas, mas sem se conseguir contabilizar os UFC.
50 ml de meio TB + 10 g de amostra ALC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Verificou-se crescimento em R2A agar e PCA, mas também se verificou o aparecimento de fungos que se sobrepuseram às bactérias.
33 ml de meio MSM + 17 ml de amostra RLC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Esta cultura foi excluída porque apenas se verificou o crescimento de fungos.
33 ml de meio MSM + 10 g de amostra ALC16	PCA, R2A agar, com DSMZ_71 agar	Esta cultura foi excluída porque apenas se verificou o crescimento de fungos.

Depois destes resultados optou-se por preparar novas culturas utilizando novas amostras provenientes da mina de Neves Corvo recolhidas dia 17 de março de 2017 (amostras provenientes da alimentação e dos resíduos da Lavaria do Cobre). Estas culturas eram constituídas por 15 ml de amostra RLC17 e 35 ml de meio mineral DSMZ_71 e 10 g de amostra ALC17 e 50 ml de meio mineral DSMZ_71. Fez-se espalhamentos em placas de *Petri* após 7 dias de incubação das culturas. Nas placas de *Petri* com meio de cultura DSMZ_71 com agar não se verificou crescimento bacteriano após 7 dias de incubação por isso decidiu-se abandonar esta meio de cultura passando apenas a se utilizar o meio de cultura R2A agar. Fez-se espalhamentos das culturas constituídas por RLC17 e meio TB e meio DSMZ_71, mas após uma semana de incubação das placas não se conseguiu uma contagem de UFC razoável por isso esta cultura foi abandonada. Após 7 dias de incubação das placas verificou-se o aparecimento de 5 tipos diferentes de colónias na cultura contendo a amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71. A caracterização das colónias e da morfologia celular encontra-se descrita na Tabela 25.

Tabela 19 - Descrição dos isolados identificados na cultura constituída por amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.

Nome	Cor	Margem	Tamanho (mm)	Forma	Elevação	Brilho	Opacidade
Tipo 1	Bege	Ondulada	1	Irregular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 2	Bege	Lobulada	2	Irregular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 3	Cor-de-laranja	Inteira	1,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 4	Bege	Ondulada	3	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 5	Bege	Inteira	2,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca

De modo a continuar com a análise da comunidade bacteriana existente nas amostras provenientes da mina de Neves Corvo fez-se novos espalhamentos das culturas contendo a amostra ALC17 em meio mineral DSMZ_71 e TB. Depois de se transferir estas culturas para meio mineral fresco foram identificados 4 tipos distintos de UFC (descritos nas Tabelas 20 e 21), estas colónias foram isoladas e posteriormente foram feitos testes de Gram, Oxidase e Catalase de modo a caracterizar estes isolados. Estes diferentes tipos de bactérias foram criopreservados no LEPABE no Departamento de Engenharia Química de modo a ter-se sempre um stock viável de isolados. O protocolo de criopreservação foi adaptado de C. Ferreira, (2011). Cada tipo de bactéria foi criopreservado numa câmara de refrigeração a - 80 °C numa mistura de meio LB com 15% (v/v) de glicerol.

Tabela 20 - Descrição do tipo de bactérias presentes na primeira transferência da cultura preparada com a amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.

Nome	Cor	Margem	Tamanho (mm)	Forma	Elevação	Brilho	Opacidade
Tipo 1	Amarela	Inteira	1,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 2	Rosa	Inteira	1	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 3	Bege	Ondulada	3	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca
Tipo 4	Bege	Inteira	2,5	Circular	Convexa	Brilhante	Opaca

Tabela 21 - Caracterização do tipo de isolados presentes na primeira transferência da cultura preparada com a amostra ALC17 e meio mineral DSMZ_71.

Nome	Coloração de Gram	Teste de Oxidase	Teste de Catalase
Tipo 1	-	+	+
Tipo 2	-	+	+
Tipo 3	-	+	+
Tipo 4	-	-	-

De modo a perceber se os microrganismos presentes nesta cultura (1º transferência da cultura com ALC17 e meio mineral DSMZ_71) poderiam ser utilizados em ensaios de biolixiviação fez-se uma segunda transferência desta cultura (30 ml da cultura e 270 ml de meio mineral fresco). Esta cultura foi abandonada após se fazer espalhamentos em placas de *Petri* e se verificar o aparecimento de fungos que se sobrepuseram às bactérias existentes. Também não se conseguiu resultados satisfatórios com a amostra da mesma mina, mas recolhidas em 2016 (ALC16) onde também se verificou o aparecimento de fungos.

Paralelamente ao primeiro ensaio de biolixiviação foram preparadas novas culturas constituídas por 3 meios minerais diferentes e por uma amostra dos resíduos da Lavaria do Cobre da mina de

Neves Corvo recolhida em 2006 (RLC06) de modo a verificar se esta amostra continha microrganismos favoráveis aos ensaios de biolixiviação. Estas culturas encontram-se descritas na Tabela 22. Fez-se espalhamentos em placas de *Petri* em meio R2A agar destas 3 culturas, mas após uma semana de incubação das placas excluíram-se estas culturas porque apenas se verificou o crescimento de fungos.

Tabela 22 - Novas culturas constituídas por uma amostra proveniente dos rejeitados da Lavaria do Cobre da Mina de Neves Corvo, recolhida em junho de 2006.

Culturas constituídas por rejeitados da Lavaria do Cobre, 2006	
Cultura 1	50 ml de meio mineral TB + 10 g da amostra RLC06
Cultura 2	50 ml de meio mineral DSM670 + 10 g da amostra RLC06
Cultura 3	50 ml de meio mineral DSMZ_71 + 10 g da amostra RLC06

Utilizou-se no primeiro ensaio de biolixiviação a cultura constituída por 10 g de amostra ALC17 e 50 ml de meio TB. Depois desta fase, os resultados do trabalho laboratorial encontram-se descritos no Capítulo 4.

iv) Meios de cultura utilizados ao longo do trabalho laboratorial

Ao longo do trabalho laboratorial foram utilizados 3 meios de cultura sólidos. A utilização destes meios nas diferentes culturas encontra-se descrita na Tabela 23.

Tabela 23 – Meios de Cultura sólidos utilizados ao longo do trabalho laboratorial.

Meios de cultura	Culturas
R2A agar	Cultura 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; CM17; A; W; CBG; Ensaios de biolixiviação e respetivos controlos abióticos
PCA	Cultura 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 e 13
DSMZ_71 com agar	Cultura 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 e 13.

ANEXO II - Diagrama do Processo da Mina da Panasqueira

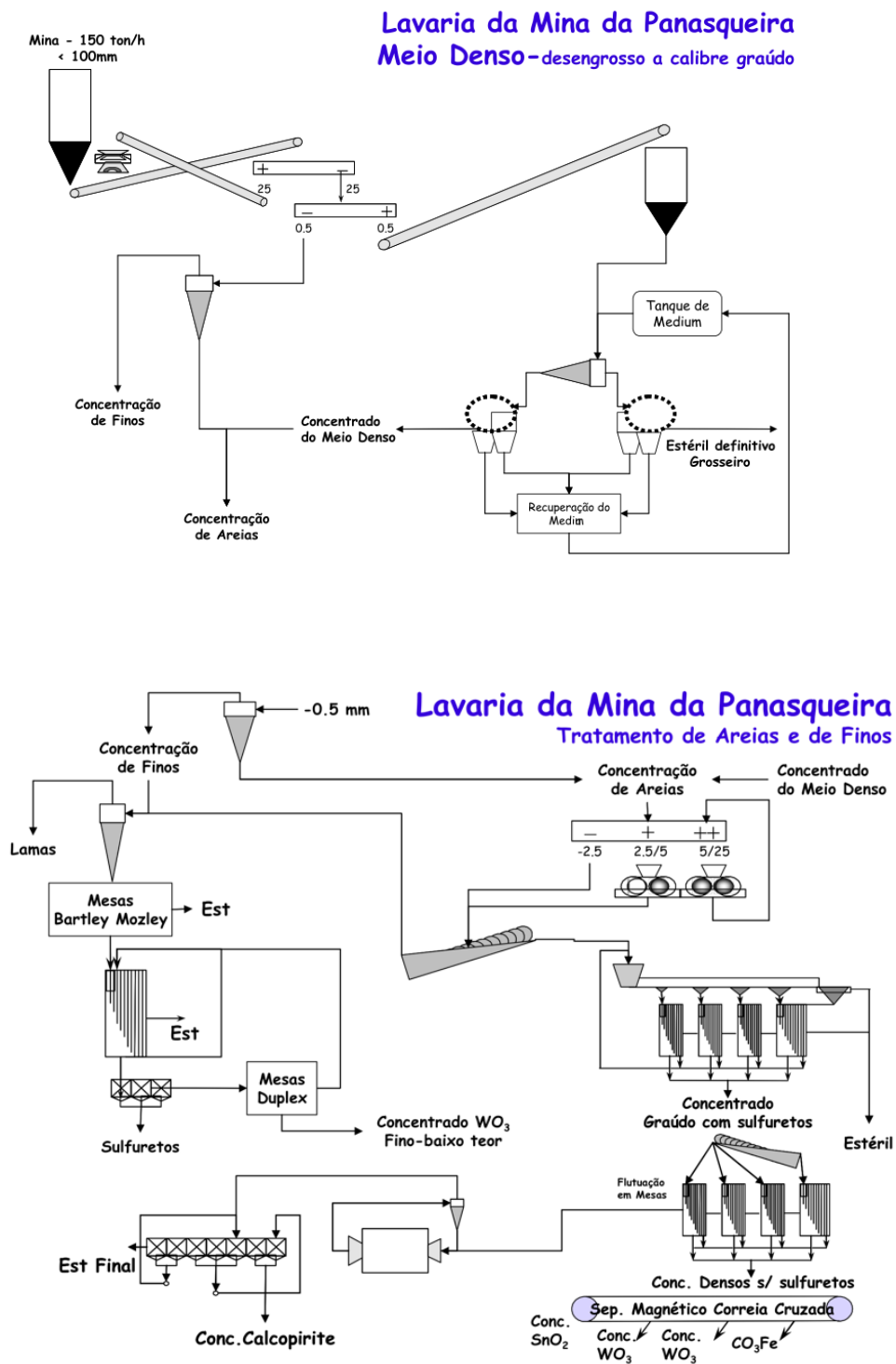


Figura 37 - Diagrama de processo do tratamento da mina da Panasqueira.

ANEXO III - Diagrama do Processo da Mina de Neves Corvo

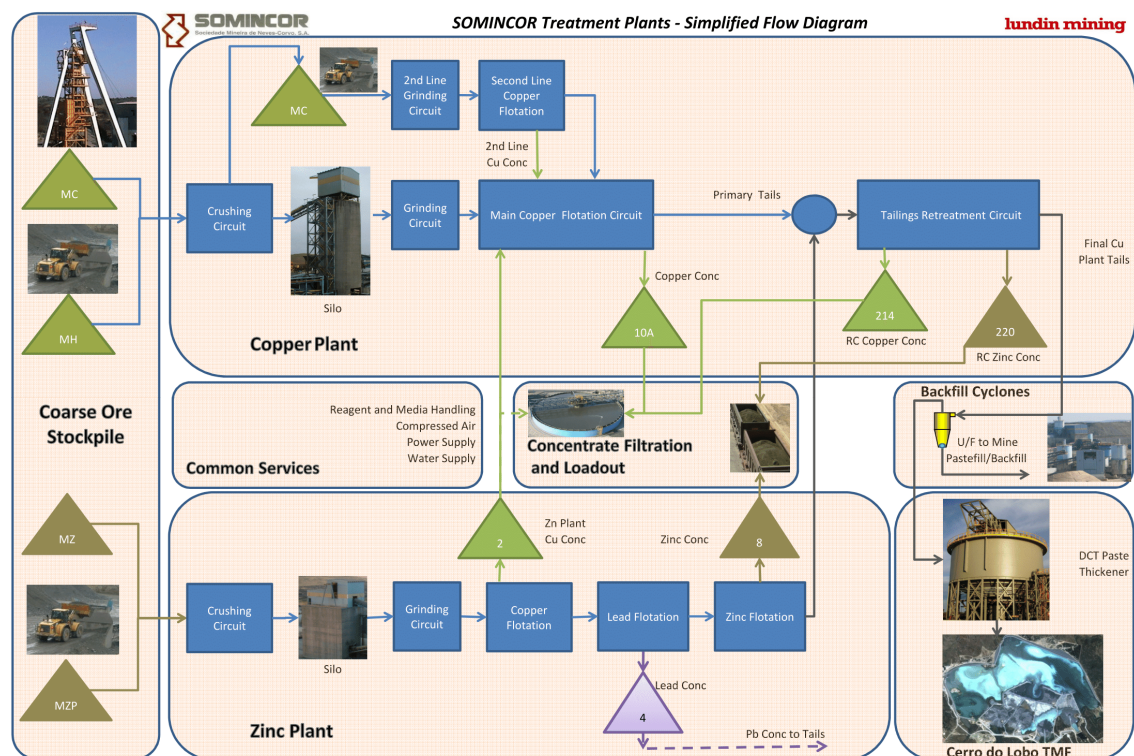


Figura 38 – Diagrama do processo de tratamento da Lavaria do Cobre da mina de Neves Corvo.

ANEXO IV – Placas de *Petri* da Cultura W com concentração 3075 μM

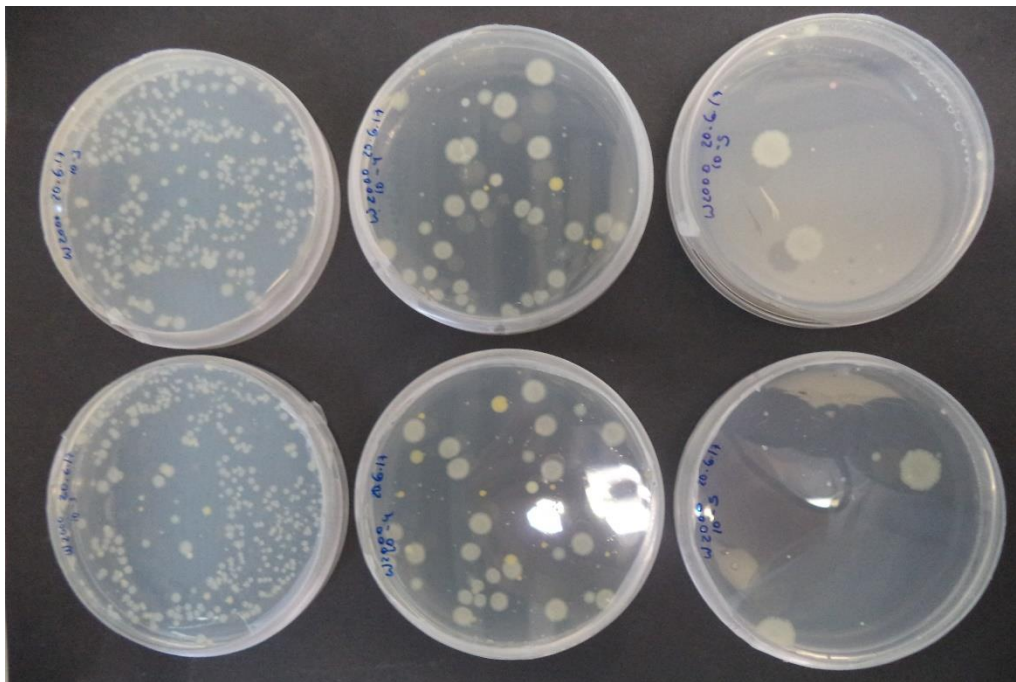


Figura 39 - Ilustração das placas de *Petri* com a Cultura W com concentração de 3075 μM após um tempo de incubação de sete dias no meio de cultivo R2A agar (diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}).

ANEXO V - Isolados da cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator

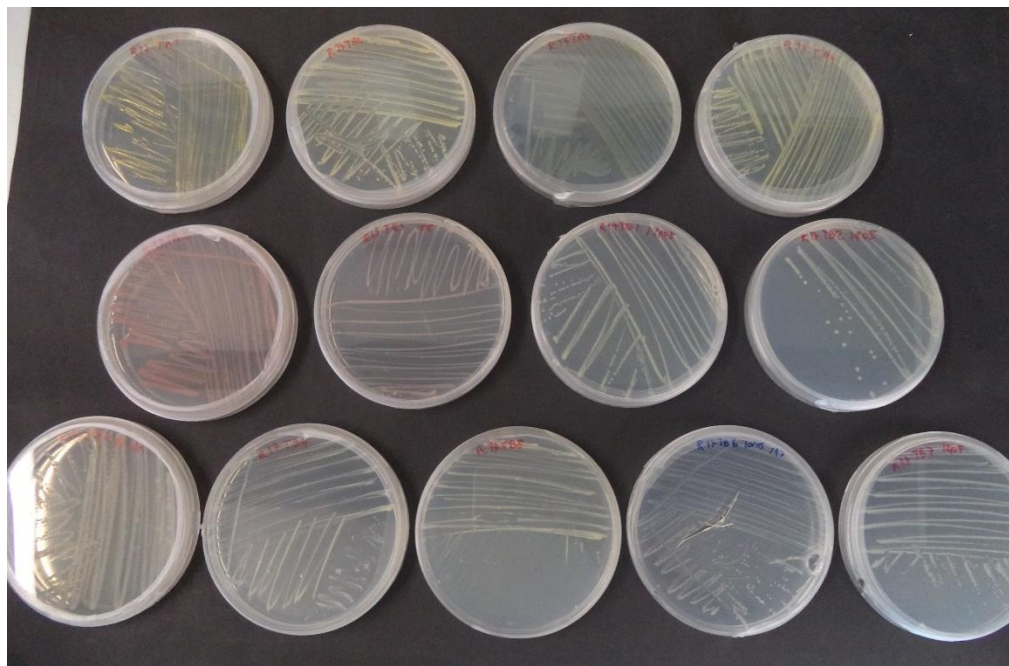


Figura 40 - Ilustração das placas de *Petri* com os isolados formados após um tempo de incubação de sete dias no meio de cultivo R2A agar provenientes da cultura que serviu de inóculo ao 1º ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

ANEXO VI - Resultados da coloração Gram dos isolados identificados na cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator

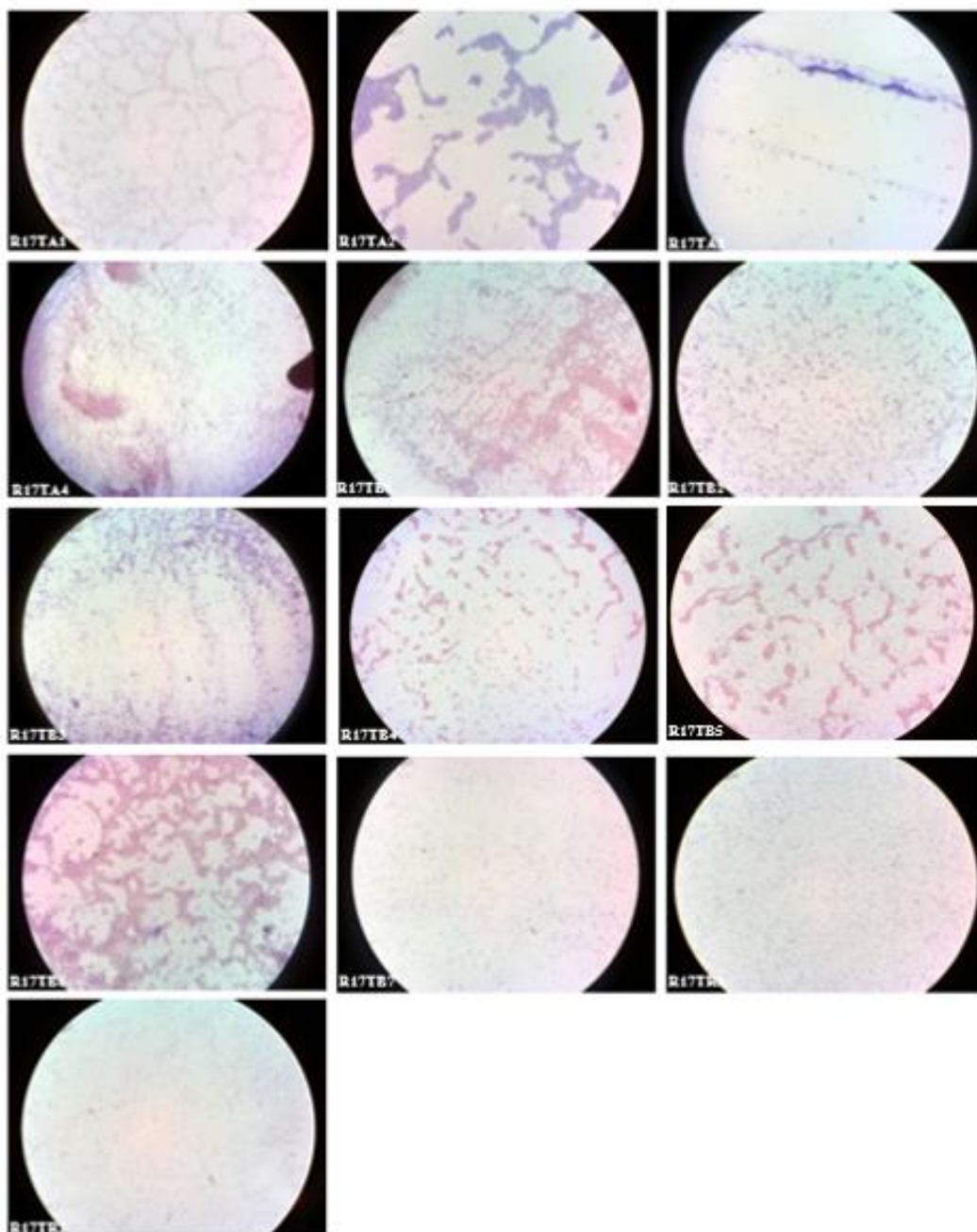


Figura 41 – Ilustração do resultado da Coloração de Gram dos isolados da cultura que serviu de inóculo ao primeiro ensaio de biolixiviação em reator utilizando a amostra ALC17.

ANEXO VII - Extração de ADN utilizando um kit de Extração

Procedimento:

- Inicialmente retirou-se 1 a 3 colónias de cada isolado e se colocou num *eppendorf* de 1,5 ml com 100 µL de água ultrapura. Agitou-se vigorosamente.
- Os *eppendorf* foram colocados a centrifugar numa centrífugadora da Thermo Scientific a 14 000 rpm durante 3 minutos e após este tempo o sobrenadante foi descartado (para bactérias gram-negativas).
- No caso de bactérias gram-positivas, ao *pellet* foi acrescentado 200 µL de *Buffer G+* com lisozima e agitou-se imediatamente. Incubar a 37 °C durante 30 minutos e inverter os tubos regularmente durante este tempo.
- Juntar 20 µL de solução *Proteinase K* e incubar durante 15 minutos a 60 °C. Inverter o tubo regularmente durante este tempo. Para o caso de bactérias gram-negativas juntar 180 µL de *Buffer GN* e agitar o tubo.
- Juntar 20 µL de solução *Proteinase K* e incubar durante 15 minutos a 60 °C. Inverter o tubo regularmente durante este tempo. Após este passo proceder da mesma forma para os dois tipos de bactérias.
- Juntar 200 µL de *Buffer BL* e agitar vigorosamente durante 10 segundos e deixar a incubar a 70 °C (durante este tempo pré aquecer o *Elution Buffer* a 70 °C para ser posteriormente utilizado).
- Juntar 200 µL de etanol (96 % - 100 %) e misturar agitando vigorosamente durante 10 segundos. Colocar uma *mini spin column* num *eppendorf* de 2 ml e transferir a solução para esta coluna.
- Centrifugar a 14.000 G durante 2 minutos. Descartar o *flow-through* e colocar a coluna num novo *eppendorf* de 2 ml e juntar 400 µL de *Wash Buffer 1*.
- Centrifugar durante 30 segundos a 14.000 G e descartar o *flow-through*. Colocar a coluna no *eppendorf* e juntar 600 µL de *Wash Buffer 2*. Centrifugar a 14.000 G durante 30 segundos e descartar o *flow-through*.
- Colocar a coluna no *eppendorf* e centrifugar durante 3 minutos a 14.000 G de modo a secar completamente a membrana da coluna. Descartar o *flow-through* e o *eppendorf*.
- Remover a coluna com cuidado e colocar num novo *eppendorf* de 1,5 ml. Pipetar 100 µL de *Elution Buffer* (previamente aquecido) para o centro da membrana. Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Centrifugar durante 1 minuto a 14.000 G e descartar a coluna. Utilizar o ADN imediatamente ou guardar a -20 °C.

ANEXO VIII - Extração de ADN total

Para a extração do ADN das amostras provenientes da Mina de Neves-Corvo (Rejeitados, Underflow e Alimentação da Lavaria do Cobre) foi utilizado o *kit* de extração *PowerSoil® DNA Isolation Kit* de acordo com o procedimento do fabricante. Este *kit* de isolamento utiliza-se para isolar o ADN genómico microbiano a partir todos os tipos de solos e outras amostras ambientais. Para a extração de ADN são necessários 6 reagentes, soluções com identificação de c1, c2, c3, c4, c5 e c6; *eppendorf* denominados de tubos de recolha; tubos com filtro de rotação; tubos com uma solução *buffer* e pequenas partículas (presentes no Kit).

Preparou-se um matraz com 250 mL da amostra que se designou por *paste*, da alimentação (que se designou por *feed*) prepararam-se dois matrizes com 100 g da amostra e 250 mL de salina estéril (0,85% NaCl) e dos rejeitados (que se designou por *tailings*) prepararam-se três matrizes com 250 mL de amostra cada um. Estas suspensões foram colocadas a agitar durante 1h e depois colocadas a incubar (Incubator Shaker Series, I26, New Brunswick Scientific) em câmara escura a temperatura e agitação constantes de 22 °C e 150 rpm, respetivamente durante 72 h. Após este

período, extraiu-se o ADN total com o *kit* de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit*[®] seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este protocolo foi otimizado com as seguintes alterações ao protocolo do fabricante: a lise celular foi realizada no *cell disruptor* durante 8 min (amostras de *feed*) e 5 min (amostras *paste* e *tailings*). Colocaram-se as amostras durante 15 min a 65 °C, centrifugou-se como descrito no protocolo a 10.000 rpm durante 30 s, mas passou-se o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga extra, adicionou-se 300 µl de *skim milk* (1%) e misturou-se, centrifugou-se a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C e seguiu-se o protocolo do fabricante descrito no Anexo VIII. No final adicionou-se 70 - 80 µl de solução C6 a cada amostra, e recolheu-se o filtrado das diferentes membranas da mesma amostra, para o mesmo tubo de centrífuga.

Para a extração do ADN da amostra foi necessário proceder à centrifugação das amostras e depois sujeitá-las aos seguintes passos:

Procedimento:

- Adicionar o líquido presente no tubo com a solução buffer ao eppendorf com contém a amostra em causa e agitar, retornar o líquido ao tubo que contém a solução;
- Adicionar 60 µl da solução C1;
- Agitar os tubos contendo a solução durante 20 minutos na velocidade 3;
- Colocar os tubos durante 15 minutos a 65°C;
- Agitar durante 30 segundos a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Retirar 500 µl do sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar 250 µl da solução C2 e fazer agitar durante 5 segundos e de seguida colocar durante 5 minutos a incubar a 4°C;
- Centrifugar os tubos durante 1 minuto a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Retirar o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar 200 µl da solução C3 e agitar, colocar durante 5 minutos a incubar a 4°C;
- Centrifugar os tubos durante 1 minuto a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Retirar 750 µl do sobrenadante para um novo tubo;
- Agitar a solução C4 antes de usar. Adicionar ao tubo 1,2 ml da solução C4 e agitar durante 5 segundos;
- Retirar aproximadamente 675 µl para um tubo com filtro de rotação e centrifugar os tubos durante 1 minuto a uma velocidade de 10 000 rcf. Descartar o líquido e colocar novamente 675µl do sobrenadante do tubo anterior e centrifugar nas mesmas condições. Descartar o líquido e colocar o restante sobrenadante e centrifugar nas mesmas condições;
- Adicionar 500 µl da solução C5 e centrifugar os tubos durante 30 segundos a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Descartar o líquido e centrifugar novamente os tubos durante 1 minuto a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Retirar o filtro de rotação e colocar num novo tubo;
- Adicionar 80 µl da solução C6 e centrifugar os tubos durante 30 segundos a uma velocidade de 10 000 rcf;
- Descartar o filtro. O líquido presente no novo tubo é utilizado para a quantificação do ADN;
- Os tubos devem ser conservados entre os -20 °C e -80 °C, por recomendação do fabricante do kit de extração.

ANEXO IX - Amplificação por PCR

- Deve-se preparar uma mistura de reação (*mix*) que será depois distribuída por tubos *Eppendorf* de 200 μL estéreis e aos quais se adiciona a amostra de ADN para amplificar (Tabela 29);
- Em cada tubo *Eppendorf* de 200 μL adiciona-se 24,5 μL de *mix* + 0,5 μL da amostra (ADN total);
- Para identificar o organismo em estudo será necessário comparar os seus perfis de restrição (perfil de bandas de ADN obtido a partir da amplificação com cada um dos *primers*) com os de organismos de referência;
- Deve sempre fazer-se um Branco (24,5 μL de *mix* + 0,5 μL da água ultra-pura estéril) para confirmar que a amplificação do ADN decorre como pretendido, ou seja, não deve haver amplificação de ADN nesta reação;
- Depois das reações terem sido preparadas, devem colocar-se no termociclador para amplificar o ADN de acordo com o seguinte programa de temperaturas: Desnaturação inicial (94°C, 5 min.); 45 ciclos de Desnaturação (94°C, 1min.); *Annealing* (34°C, 1 min.); Extensão (72 °C, 2 min.) e Extensão final (72 °C, 10 min.);
- Os produtos de PCR (devidamente identificados) devem ser guardados a -20 °C.

Tabela 24 - Quantidade de reagentes necessários para a realização da técnica de PCR.

Reagentes	Reações de 12,5 μL ¹	Reações de 25 μL ²
H ₂ O UP (μL)	7,313	14,62
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ 10× diluído (μL)	1,250	2,5
MgCl ₂ (25mM) (μL)	0,625	1,25
dNTPs (1mM) (μL)	0,125	5,0
Primer 27F (100mM) (μL)	0,125	0,250
Primer 1525R (μL) (μL)	0,063	0,250
Taq (1U/ μL) (μL)	0,5	0,126

¹ - Considerando que vão ser adicionados 12 μL da solução *master mix* e 0,5 μL de amostra de ADN.

² - Considerando que vão ser adicionados 24 μL da solução *master mix* e 1 μL de amostra de ADN.

ANEXO X - Extração de ADN por fervura

- Com uma ansa estéril, retirar 2/3 colónias de uma cultura em meio sólido. Suspende a biomassa em 50 μL de água ultra-pura estéril, num tubo *Eppendorf* estéril, devidamente identificado;
- Colocar a suspensão (no tubo *Eppendorf*) num banho de água a 95 °C, durante 10 minutos;
- Transferir rapidamente o tubo *Eppendorf* para gelo e deixar arrefecer durante 5 minutos;
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 2 minutos;
- Transferir o sobrenadante (ADN total) para um tubo *Eppendorf* estéril, devidamente identificado;
- Guardar as amostras (nos tubos *Eppendorf*) a -20 °C.

ANEXO XI - Eletroforese em gel de agarose

- Preparar o gel de agarose para a eletroforese do ADN total misturando agarose com solução-tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1x), de modo a obter a concentração final de 0,7 % (p/v). A mistura deve ser aquecida até fundir.
- Deixar arrefecer um pouco e adicionar 5 μL de corante Gel Red (agente intercalante) por cada 50 mL de gel de agarose. Adicionar a agarose ao *gel caster*, e deixar polimerizar durante cerca de 30 minutos.

- Depois de polimerizado, colocar o gel na tina de eletroforese contendo o tampão TAE (1x).
- Retirar o pente, e com a ajuda de uma pipeta com ponta estéril adicionar 6 µL de marcador de peso molecular no primeiro poço.
- Preparar as amostras misturando 2 µL de *loading buffer* (azul de bromofenol/glicerol) com 8 µL de amostra de ADN total.
- Aplicar as amostras no gel adicionando os 8 µL de amostra + 2 µL *loading buffer* no poço seguinte.
- Correr a eletroforese a 90 V, durante cerca de 35 a 50 min.
- Visualizar as bandas de ADN colocando o gel num transiluminador (UV).
- Fotografar o gel para registo.

ANEXO XII -Preparação das amostras para a análise SEM

A solução de glutaraldeído para a preparação das amostras antes da observação SEM foi preparada a 3 % wt. De calcodeído de sódio a pH = 7,2 tal como indicado na Tabela 24 (para 200 mL 4,28 g de cacodilato, adicionaram-se 100 mL de H₂O estéril, adicionaram-se 16.60 mL de 0.1 N HCl e completou-se o volume até 200 mL.

Tabela 25 – Preparação do fixativo de glutaraldeído usado para preparar as amostras para a análise SEM.

Reagente	Peso
Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ .3H ₂ O	1,07 g e diluir em 50 ml de água destilada
HCl 0,1 N	4,45 ml e diluir em 100 ml de fixativo de glutaraldeído
12 ml de solução glutaraldeído, 25 %	Diluir em 100 ml de Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ .3H ₂ O a pH = 7,2

Inicialmente retirou-se o *pellet* com o auxílio de uma espátula para um poço de uma placa de 12 poços, deixou-se secar a 50 °C e fez-se a fixação por 10 minutos com 3% Glutaraldeído em buffer de cacodilato (Ferreira, C., *et. al.*, 20131; Manuel 2007). Após se retirar o glutaraldeído, as amostras foram expostas a concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% duas vezes). A amostra foi exposta 10 minutos a cada concentração (1 mL para cada poço). As amostras foram colocadas num exsiccador durante 24 h e após este tempo foram colocadas em fita de carbono.

Recolheram-se amostras de 15 mL de líquido após deixar sem agitação 15 minutos de modo a que a maioria do minério depositasse.

Em algumas amostras foram adicionados 15 mL de 6% Glutaraldeído em buffer de cacodilato (a 152 mL de buffer de cacodilato, adicionaram-se 48 mL de glutaraldeído), a 15 mL de amostra, de modo a obter uma concentração final de 3%. As amostras foram incubadas a 4 °C, durante 2h30 (amostras foram agitadas após decorrer metade deste período) e centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e retirou-se o pellet para uma e deixou-se secar a 35 °C.

Após as restantes amostras serem centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi transferido para uma lamela circular. Numa placa de 24 poços, a lamela foi coberta por uma solução de 3% glutaraldeído em buffer de cacodilato e estas amostras foram colocadas a incubada *overnight* a 4 °C. Após a incubação, removeu-se a solução de 3% glutaraldeído em buffer de cacodilato.

Todas as amostras foram desidratadas em etanol ao serem expostas a uma série de concentrações crescentes de etanol e posteriormente desidratadas quimicamente ao serem expostas a concentrações crescentes de HMDS + etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 2 vezes 100% (v/v)) (600 μ L) – 10 min cada concentração. Em seguida, as amostras foram colocadas no exsiccador durante 24 h.

ANEXO XIII – Resultados da Sequenciação de Illumina por amplificação do gene rRNA 16S

Tabela 26 - Dados relativos ao processo de sequenciação da amostra ALC17.

Distribuição por filos			
Filo	Número de OTUs	Leituras	Abundância (%)
<i>Proteobacteria</i>	148	39305,0	95,1
<i>Actinobacteria</i>	15	1912,0	4,6
<i>Firmicutes</i>	4	12,0	0,03
<i>Bacteroidetes</i>	2	40,0	0,1
<i>Chloroflexi</i>	2	5,0	0,01
OD1 (<i>Parcubacteria</i> -candidate phyla)	4	8,0	0,02
TM7 (<i>Saccharibacteria</i> Candidate phyla)	14	43,0	0,1
Total	189	41325,0	100

Tabela 27 - Dados relativos ao processo de sequenciação da amostra ALC17.

ID	S17.41 Feed	Taxonomia	Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Espécie	Porcentagem
denovo608	4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	johnsonii	0,01
denovo586	2	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Agrobacterium		0,00
denovo217	5	Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Arcobacter		0,01
denovo49	3	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter		0,01
denovo140	4	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Blautia		0,01
denovo26	103	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Erythrobacter		0,25
denovo121	4	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Gordoniaceae	Gordonia		0,01
denovo109	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas		0,00
denovo34	42	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothiobacillaceae	Halothiobacillus		0,10
denovo27	30	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothiobacillaceae	Halothiobacillus		0,07
denovo53	6	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	Hyphomonas		0,01
denovo120	3	Bacteria	Chloroflexi	Chloroflexi	[Roseiflexales]	[Kouleothrixaceae]	Kouleothrix		0,01
denovo0	19061	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		46,12
denovo59	440	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		1,06
denovo322	126	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,30
denovo733	94	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,23
denovo417	65	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,16
denovo742	35	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,08
denovo415	31	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,08
denovo379	24	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,06
denovo63	23	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,06
denovo566	23	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,06
denovo318	20	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter		0,05

denovo515	11	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,03
denovo248	11	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,03
denovo556	10	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,02
denovo668	10	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,02
denovo838	6	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo306	6	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo233	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo390	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo215	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo240	4	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo478	4	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo674	3	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo464	3	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo359	3	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,01
denovo364	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo238	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo588	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo607	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo676	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo317	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo408	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnobacter	0,00
denovo150	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnohabitans	0,00
denovo28	68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	0,16
denovo130	12	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	0,03
denovo32	45	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Methylophaga	0,11
denovo208	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Methyloversatilis	0,00
denovo39	30	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleibacter	0,07

denovo14	732	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	aminovorans	1,77
denovo13	403	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus		0,98
denovo289	4	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	Phycoccus		0,01
denovo89	2	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	acnes	0,00
denovo841	2	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Pseudoclavibacter	bifida	0,00
denovo3	221	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,53
denovo22	56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,14
denovo79	11	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,03
denovo29	8	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,02
denovo860	7	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,02
denovo547	5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,01
denovo704	5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,01
denovo129	4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,01
denovo243	3	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,01
denovo310	3	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	pseudoalcaligenes	0,01
denovo660	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo52	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo295	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo715	1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo807	1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo629	1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		0,00
denovo9	9	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	[Chromatiaceae]	Rheinheimera		0,02
denovo11	6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	[Chromatiaceae]	Rheinheimera		0,01
denovo644	1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	[Chromatiaceae]	Rheinheimera		0,00
denovo620	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira		0,00
denovo136	2	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus		0,00
denovo284	3	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus		0,01

denovo4	4077	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	9,87
denovo6	1795	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	4,34
denovo20	11	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,03
denovo56	8	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,02
denovo43	5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,01
denovo145	4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,01
denovo611	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,00
denovo278	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	Thermithiobacillus	tepidarius	0,00
denovo621	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Thermomonas	fusca	0,00
denovo1	1140	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		2,76
denovo16	326	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,79
denovo18	139	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,34
denovo397	127	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,31
denovo172	100	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,24
denovo363	56	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,14
denovo74	55	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,13
denovo71	51	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,12
denovo601	49	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,12
denovo179	48	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,12
denovo23	47	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,11
denovo615	41	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,10
denovo131	37	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,09
denovo321	36	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,09
denovo482	27	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,07
denovo149	23	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,06
denovo597	21	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,05
denovo779	20	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,05

denovo46	18	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,04
denovo428	13	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,03
denovo66	6	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo382	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo494	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo550	5	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo228	4	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo757	3	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo516	3	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,01
denovo271	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo584	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo602	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo391	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo809	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo636	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo55	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Thiobacillus		0,00
denovo31	64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Halothiobacillaceae	Thiovirga		0,15
denovo497	3	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	Veillonella	dispar	0,01
denovo480	2	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Yonghaparkia		0,00
denovo2	8270	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae			20,01
denovo7	1830	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae			4,43
denovo38	135	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae			0,33
denovo21	123	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae			0,30
denovo19	81	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae			0,20
denovo569	54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae			0,13
denovo134	51	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae			0,12
denovo17	45	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae			0,11

denovo37	39	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideaceae	0,09
denovo30	39	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria			0,09
denovo25	38	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	0,09
denovo33	36	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0,09
denovo12	33	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	0,08
denovo36	33	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales		0,08
denovo24	26	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	0,06
denovo324	25	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales		0,06
denovo47	21	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0,05
denovo60	13	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0,03
denovo263	7	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	0,02
denovo108	6	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	0,01
denovo378	6	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01
denovo122	6	Bacteria	TM7				0,01
denovo58	5	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioideaceae	0,01
denovo51	5	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0,01
denovo70	5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales		0,01
denovo683	5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,01
denovo104	5	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01
denovo277	4	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	0,01
denovo231	4	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	0,01
denovo97	3	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales		0,01
denovo103	3	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	0,01
denovo270	3	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01
denovo302	3	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01
denovo50	3	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01
denovo829	3	Bacteria	TM7	TM7-1			0,01

denovo72	2	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	0,00
denovo498	2	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	0,00
denovo171	2	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	WCHB1-50		0,00
denovo159	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0,00
denovo84	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria			0,00
denovo335	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria			0,00
denovo517	2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	MWH-UniP1		0,00
denovo603	2	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	[Weeksellaceae]	0,00
denovo361	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo127	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales		0,00
denovo795	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo580	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	0,00
denovo265	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	[Chromatiaceae]	0,00
denovo269	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo170	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	[Chromatiaceae]	0,00
denovo409	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo743	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo696	2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	0,00
denovo844	2	Bacteria	TM7	TM7-1			0,00
denovo227	2	Bacteria	TM7	TM7-1			0,00
denovo459	2	Bacteria	TM7	TM7-1			0,00
denovo168	2	Bacteria	TM7	TM7-3			0,00
denovo521	2	Bacteria	TM7	TM7-3			0,00
denovo223	2	Bacteria	TM7	TM7-3			0,00
denovo425	2	Bacteria	TM7	TM7-3			0,00
denovo148	2	Bacteria	OD1	ZB2			0,00
denovo304	2	Bacteria	OD1	ZB2			0,00

denovo537	2	Bacteria	OD1	ZB2			0,00
denovo529	2	Bacteria	OD1				0,00
denovo92	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0,00
denovo5	1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0,00