

BIOHIDROMETALURGIA: RECUPERAÇÃO DE COBRE PROVENIENTE DE REEE ATRAVÉS DA LIXIVIAÇÃO BACTERIANA*

Solange Kazue Utimura¹
Amilton Barbosa Botelho Junior²
Jorge Alberto Soares Tenório³
Denise Croce Romano Espinosa⁴

Resumo

As placas de circuito impresso (PCIs) dos resíduos eletroeletrônicos (REEEs) possuem diversos materiais na composição. A recuperação dos metais tem incentivado as pesquisas no seu processo de extração. Como alternativa de recuperação de metais das PCIs de forma sustentável optou-se pela biohidrometalurgia envolvendo a fase extração. O presente estudo avalia a biolixiviação do cobre na presença da bactéria *Acidithiobacillusferrooxidans*(AF) em PCIs de REEEs provenientes de impressoras obsoletas. As PCIs foram caracterizadas mediante as técnicas analíticas de espectrometria ICP-OES e de fluorescência de Raios X (FRX) para determinar os elementos químicos presentes na amostra inicial. A bactéria utilizadas na lixiviação bacteriana foicultivada em meio de cultura T&K. Os ensaios de biolixiviação foram realizados em incubadora orbital, com velocidade de rotação de 170 rpm, temperatura de 30 °C, volume de inoculo de 10% (v/v) e densidade de polpa de 30g/L. Foi possível determinar que a cepa AFapresentou uma extração de 100% de cobre em 8 dias e foi analisado o MEV-EDS da bactéria AF.

Palavras-chave: REEE; PCI; Biolixiviação; *Acidithiobacillusferrooxidans*

TÍTULO DO TRABALHO EM INGLÊS

Abstract

In this study, a bioleaching test of copper from electronic solid waste using a strain mesophilic bacteriasuch as *Acidithiobacillusferrooxidans*(AF) was investigated. Biohydrometallurgical processes allow for metal extraction by microorganisms with advantagesto offer by selectively metal extraction at low temperature, less energy consumption and less environmental impact. Copper extraction from printed wired boards (PWBs) of printers discarded waste evaluated. Bioleaching experiments were performed in an orbital shaker at 170 rpm, at 30 °C, withinoculum 10 % (v/v) and pulp density of 30 g/L. Copper extraction was determined by energy dispersive X-ray fluorescence (XRF). The results show that copper recovery from PWBs using *Acidithiobacillusferrooxidans* (AF) was 100 % in 8 days and the SEM-EDS of the AF was analyzed.

Keywords: WEEE; PWB; Bioleaching; *Acidithiobacillusferrooxidans*

¹ Engenharia Química, Doutoranda, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Engenheiro Industrial, Mestrando, departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³ *Engenheiro Metalurgista, Doutor, Professor Titular, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.*

⁴ *Engenheira Metalurgista, Doutora, Professora Associada, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.*

⁵

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho utiliza técnicas aplicadas na área da engenharia química, no campo da biotecnologia, da engenharia de materiais, da engenharia de minérios e da engenharia metalúrgica uma vez que se trata de um processo de reciclagem de resíduos de equipamentos eletrônicos. O estudo se relaciona com a sustentabilidade e com o meio ambiente por se referir a um processo de recuperação de metais e do reaproveitamento dos materiais contidos na sucata de eletroeletrônicos [1].

Os resíduos eletroeletrônicos são formados de materiais cerâmicos, poliméricos e metálicos. Esse tipo de resíduo colocados em aterros se torna um problema ambiental, uma vez que são constituídos por substâncias tóxicas e não biodegradáveis. A preocupação ambiental em se descartar estes resíduos em aterros estão relacionados a oxidação dos metais, uma vez que ocorre a lixiviação de metais pelos ácidos orgânicos da degradação anaeróbia da matéria orgânica [2],[3].

A degradação térmica como uma maneira de eliminação dos resíduos, deve-se levar em consideração a necessidade de adaptações nos incineradores para a prevenção da formação do poluentes como os organohalogenados devido à presença de retardantes de chamas e resinas poliméricas, além do elevado custo associado aos gastos de energia dessa técnica [4],[5].

Outra rota convencional na recuperação de materiais de resíduos eletroeletrônicos é o uso de técnicas hidrometalúrgicas. Nesses processos, utilizam-se soluções ácidas e básicas e agentes oxidantes, que lixiviam e solubilizam o metal de interesse que é recuperado da solução. A rota hidrometalúrgica para a solubilização dos metais, deve-se considerar o consumo dos insumos e a manipulação de reagentes em elevadas concentrações utilizados no processamento dos materiais, além da formação de efluentes e do seu tratamento [6],[7].

O desenvolvimento de métodos alternativos para a recuperação de materiais, atendendo aos princípios da sustentabilidade, deve ser estimulada e pode ser atendida através da rota biohidrometalúrgica, que utiliza os microrganismos para promover a solubilização dos metais de interesse econômico. O uso da técnica de lixiviação bacteriana tem como vantagens a economia dos insumos utilizados no processo, uma vez que a própria bactéria produz os insumos e a não utilização de reagentes tóxicos, o que facilita a manipulação nos processos [8].

A biohidrometalurgia tem como base as interações entre as bactérias e o substrato. A oxidação do substrato pela ação bacteriana pode ocorrer através de mecanismos de contato direto dos microrganismos com a superfície do substrato, e pode ocorrer indiretamente com a ação do íon férrico, uma vez que o íon ferroso é reoxidado a íon férrico pela ação das bactérias e o íon férrico regenerado retorna a oxidar o substrato [9].

As etapas do processo deve-se à caracterização da amostra com o intuito de determinar os elementos químicos presentes e a inoculação sucessiva com o incremento de resíduos tem como objetivo aumentar a tolerância às concentrações dos metais solubilizados durante o processo de biolixiviação. Outros fatores levados em consideração foram as análises de amostras biológicas com a utilização de um microscópio eletrônico de varredura acoplado a um equipamento de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS). A preparação das amostras biológicas deve-se à condição natural hidratada, apresenta características específicas durante o seu processamento para os resultados na visualização no MEV-EDS [10],[11].

O objetivo do estudo procura uma alternativa ambiental positiva para a recuperação de metais e uma tentativa de minimizar os resíduos dispostos em aterros. A reciclagem de resíduos tem um apelo socioambiental e está inserido no conceito de despoluição por intermédio da reciclagem e do reaproveitamento dos materiais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das amostras

As amostras de placas de circuito impresso (PCIs) utilizadas nos ensaios foram provenientes de impressoras obsoletas coletadas no Centro de Descarte e Reuso de Resíduos de Informática da Universidade de São Paulo. As PCIs foram cominuídas em moinho de martelos modelo MDM 18/18 da Astecma em grelhas de 9 mm, 6 mm e 2 mm. As PCIscominuídas foram peneiradas em aberturas de 4 mm, 2 mm, 1 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,125 mm, 0,075 mm e 0,038 mm. As amostras foram quarteadas e separadas em amostras de 5 g. Foi realizada a caracterização de 5 g das amostras (<1 mm) com água régia e a fração solubilizada foi analisada no ICP-OES, AgilentTechn. Série 700 e por fluorescência de raios-X da PANalytical, Epsilon3-XL.

2.2 Inoculação Bacteriana

A bactéria utilizada nos ensaios de biolixiviação foi a *Acidithiobacillusferrooxidans* adquirida do Banco de Microrganismos e Culturas Celulares do Instituto Leibniz DSMZ da Alemanha. O processo de inoculação, foi feito com a preparaçãodo meio de cultura T&K formado pela solução A e B nas seguintes quantidades: solução A: 0,625 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,625 g/L K_2HPO_4 , 0,625 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e solução B: 166,5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. As soluções A e B foram aciduladas no pH 1,8 com H_2SO_4 5M. A solução A foi esterilizada durante 30minutos a 1 atm e a 121°C em autoclave. A solução B foi esterilizada no sistema de filtração Millipore com papel de filtro de 0,2 µm. O preparo do meio de cultura T&K consistiu na mistura das duas soluções na proporção de 4:1 (soluções A : B).

O processo de inoculação foi realizado em erlenmeyer de 250mL contendo 72 mL de solução A, 18mL de solução B e 10mL da cepa bacteriana (inóculo de 10% (v/v)). O procedimentofoi realizado em uma incubadora orbital (Infors HT) com rotação de 170 RPM e temperatura de 30 °C. A inoculaçãofoi realizadapelo método de repiques sequencial, no qual era feito um novo repique assim que o potencial redox (Hanna - E, mVvs Ag/AgCl) atingia o valor acima de 600 mV. O processo de crescimento foi realizado em 3 repiques sequenciais por bactéria com o monitoramento do potencial de oxirredução para valores acima de 600 mV.

A *Acidithiobacillusferrooxidans*foi adaptada a diferentes concentrações de PCIs pelo método do cultivo sucessivo. O procedimento de adaptação ocorreu após o crescimento das bactérias e com a adição crescente das amostras de PCIs até uma densidade de polpa de 30 g/L. Fez-se o controle e o monitoramento do pH (modelo mPA – 210) e do Eh (mV) durante o processo de adaptação bacteriana. O ajuste do pH em 1,8 foi realizado com uma solução de H_2SO_4 5M.

2.3Lixiviação Bacteriana

A lixiviação bacteriana iniciou com a bactéria pré-adaptadas em PCIs. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 500 mL com 270 mL de solução T&K e 30 mL de inóculo contendo a bactéria pré-adaptada em PCIs. O procedimento foi realizado em uma incubadora orbital com velocidade de rotação de 170 RPM e temperatura de 30 °C. Após 72 horas de crescimento foi monitorado o potencial de oxidação para verificar o valor acima de 600 mV. O processo de biolixiviação foi realizado durante

15 dias e foi retirada uma amostra diária para determinar a concentração de cobre através da análise química pela técnica de espectrometria de Fluorescência de Raio-X (FRX).

2.3 Procedimento das amostras para microanálise

Um cultivo da bactéria inoculada no meio de cultura foi filtrada em uma ultracentrífuga Himac CR21GII/Hitachi. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com a solução A do meio de cultura para a retirada de ferro presente no cultivo de crescimento da solução B. A velocidade da ultracentrífuga utilizada no processo foi de 10.000 rpm por 5 min. O procedimento de centrifugação e lavagem foi realizada por duas vezes. Após o processo de lavagem e centrifugação, o precipitado contendo as bactérias concentradas, foi congelada a -20 °C por 12 horas e depois por mais 4 horas na temperatura de -80 °C. A biomassa foi liofilizada em um liofilizador L101 da Liotop por 48 horas para a criosecação. A biomassa em pó foi fixada em um adesivo no suporte (stub) e foi recoberta com ouro em um aparelho *sputtering* MTEC K150. A amostra biológica foi analisada no MEV-EDS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização e crescimento do microorganismo

A composição da amostra de PCIs foi realizado por meio de lixiviação ácida e os principais elementos presentes na amostra foram quantificados (% em massa): Cu = 73,98 %; Al = 11,90 %; Ca = 7,54 %; Fe = 2,05 %; Zn = 1,35 %; Ni = 0,70 %; Mg = 0,26 %; Mn = 0,13 % e Ag = 0,11 %. Para a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (AF), algumas concentrações de metais podem ser nocivas como os teores limite de 55 g/L para o Cu; 160 g/L para o Fe; 0,8 g/L Cr; 0,05 g/L para a Ag e entre outros [12].

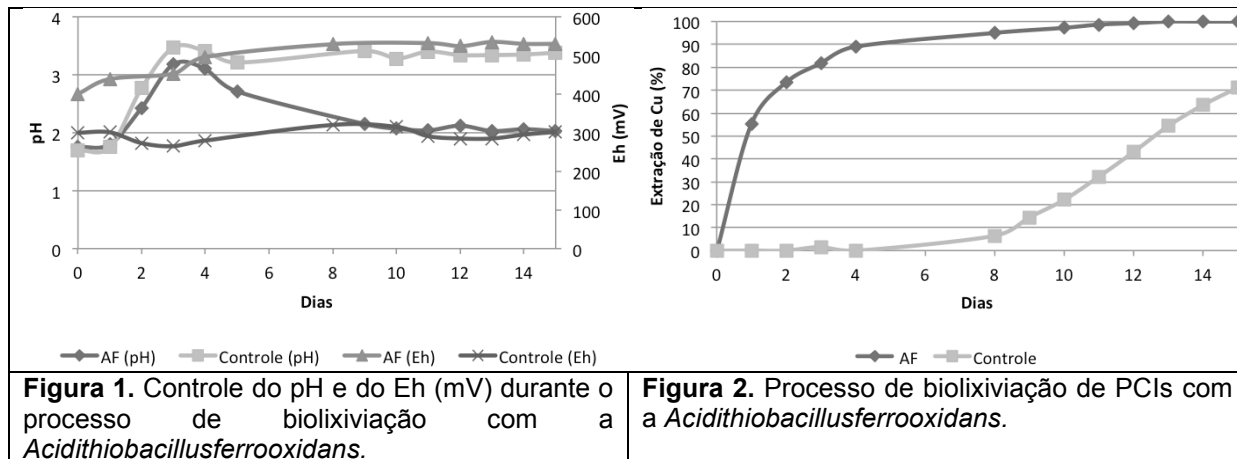
No processo de crescimento da bactéria com uma concentração de 10 % (v/v) no meio de cultura apresentou um Eh de cerca de 350 MV nos primeiros dias e pH 1,8. Após 3 dias de inoculação foi verificado o crescimento com uma elevação do Eh para 650 mV e pH 2,1. Foi feita a contagem dos microrganismos pelo método do número mais provável (NMP) no qual foi de 1×10^6 células por mL.

Outro método utilizado para a contagem das bactérias foi por plaqueamento pelo método de unidade formadora de colônias (UFC/mL). Para o plaqueamento foi utilizado a solução A de sais basais mas com uma composição diferente do meio T&K, solução A: 1,8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,7g/L K_2HPO_4 , 0,0278g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e solução B: 139,01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e solução C: 20 g/L de agarose. As soluções A e B foram aciduladas no pH 2,5 e 2 com H_2SO_4 5M, respectivamente. A solução A e C foram esterilizadas durante 15 minutos a 1 atm e a 121°C em autoclave. A solução B foi esterilizada no sistema de filtração Millipore com papel de filtro de 0,2 μm . O preparo da solução para o plaqueamento consistiu na mistura de 70 % da solução A; 5 % da solução B e 25 % da solução C [13],[14].

A bactéria foi adaptada para a tolerância às concentrações dos metais solubilizados formados por meio de cultivo repetitivo para o processo de biolixiviação, uma vez que os microrganismos pela sua conduta metabólica, correspondem às condições do meio e com a concentração do substrato [15],[16].

3.2 Ensaio de Biolixiviação

A Figura 1 mostra a variação do pH e do Eh (mV) *Acidithiobacillus ferrooxidans* e a Figura 2 mostra a lixiviação bacteriana da amostra de PCIs.



De acordo com Brandl (2001), o resíduo eletroeletrônico pode apresentar caráter alcalino elevando o pH e a precipitação de íons férricos na forma de hidróxidos férricos [17]. A solubilização dos metais está relacionado com a concentração de Fe^{3+} em solução que por sua vez, está diretamente relacionada com o potencial de oxirredução. Desta forma, quanto maior a concentração de íons férricos em solução, maior o valor do Eh [18]. No início da biolixiviação das PCIs, ocorreu uma queda nos valores do Eh da solução, que pode ter uma relação com a concentração de Fe^{3+} em solução. Após a estabilidade do pH no processo da lixiviação bacteriana, ocorreu um aumento nos valores de Eh da solução e estabilizam em valores acima de 500 mV. Deveria haver um excesso de ferro na solução para garantir o aumento nos valores do Eh da solução e a perda de íons férricos por precipitação.

A Figura 2 mostra a lixiviação bacteriana nas amostras de PCIs. A bactéria *Acidithiobacillusferrooxidans* apresentou uma extração de cobre de 100 % em 8 dias e se manteve constante durante todo o processo de acordo com a estabilidade do pH e do Eh. O controle até o 5 dias não ocorreu lixiviação da amostra e após esse período, começou a lixiviar e aumentou até o final do monitoramento do processo. Conforme Lambert et al., (2015) mostrou que a lixiviação química do controle pode acontecer devido ao excesso da concentração de Fe^{3+} acumulado na solução [18].

3.3 Análise das Micrografias

Na preparação das amostras contendo as bactérias *Acidithiobacillusferrooxidans* que foram recobertas com um material condutor, que neste caso foi o ouro, as Figuras 3 e 4 mostram as micrografias do MEV.

Como pode-se observar nas Fig. 3 e 4, as bactérias se romperam de acordo com as micrografias realizadas nas amostras com as *Acidithiobacillusferrooxidans*. Não é possível visualizar a morfologia das bactérias e o seu formato. De acordo com Castro (2002), o tratamento prévio em amostras biológicas se faz necessário para evitar a ruptura das células durante o processo de secagem. A desidratação de amostras contendo compostos orgânicos deve ser realizada com o uso de um aparelho de ponto crítico. As amostras biológicas devem ser desidratadas com álcool etílico ou acetona e secado na câmara com CO_2 do equipamento de ponto crítico. O CO_2 líquido é aquecido lentamente dentro da câmara e mantém-se acima de 31 C com pressão acima de 73 atm. Com a temperatura acima de 31 C, pode-se garantir que não há a liquefação do CO_2 . Com esse procedimento, a amostra é seca sem o efeito das forças atuantes de tensão superficial, evitando-se as mudanças no formato das células [19].

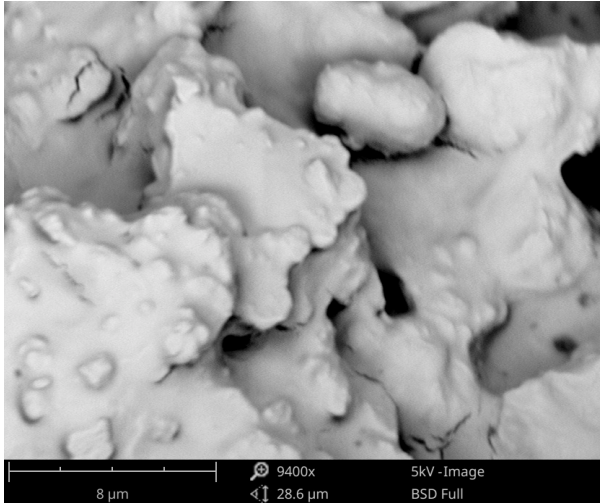


Figura 3. MEV de uma amostra contendo a bactéria *Acidithiobacillusferrooxidans* de um cultivo de 7 dias de crescimento.

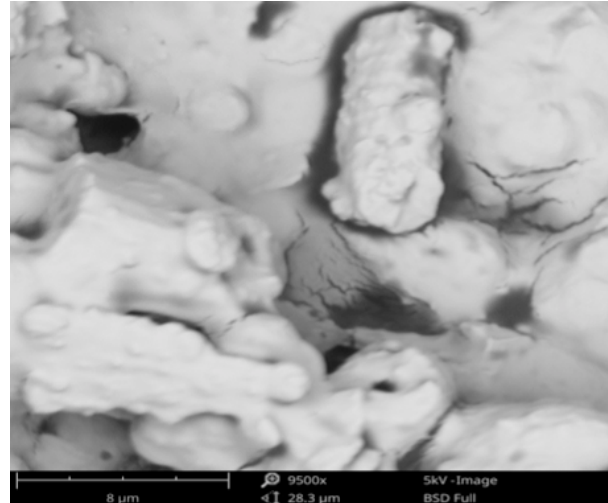


Figura 4. MEV da *Acidithiobacillusferrooxidans* de um cultivo de 7 dias de crescimento recoberta com ouro.

A Figura 5 mostra o MEV-EDS da amostra com a bactéria *Acidithiobacillusferrooxidans*. De acordo com Damy-Benedetti et al., 2011, é possível realizar a desidratação de células através do processo de liofilização. O processo ocorre com a remoção de água por sublimação. A água passa do estado sólido (congelada), diretamente para o gasoso em baixas temperaturas e sem a presença de oxigênio (criodesidratação ou criosecação). Desse modo, as células dos microrganismos não se rompem com a perda do vapor de água [20].

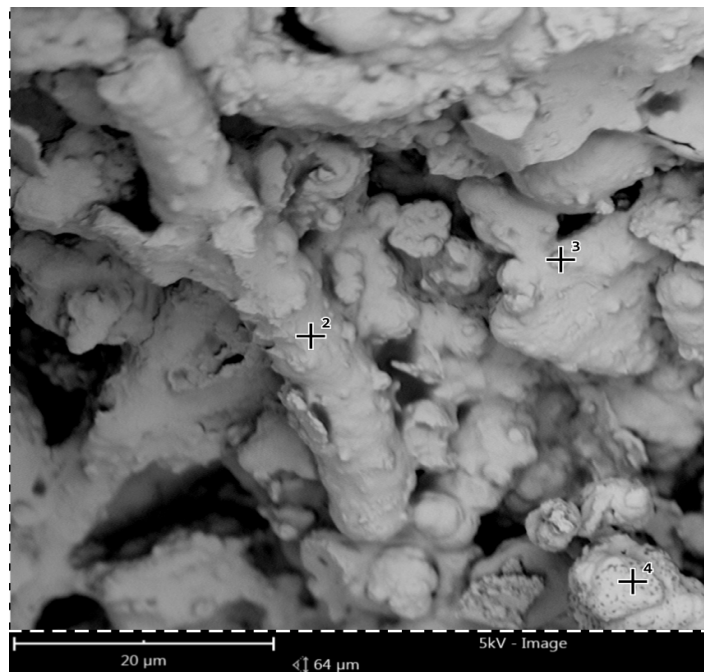


Figura 5. MEV-EDS dos pontos 2, 3 e 4 analisados da amostra com a *Acidithiobacillusferrooxidans* de um cultivo de 7 dias de crescimento.

Conforme Sette(2011), o rompimento da estrutura celular pode ocorrer com a perfuração da membrana e da parede celular pelo cristal de gelo. O uso de agentes

crioprotetores como glicerol 10 % podem reduzir os danos durante o congelamento e o descongelamento das células [21],[22],[23].

A Figura 5 mostra que com o processo de liofilização ocorreu o rompimento da estrutura das células e que não foi possível analisar o formato das células. Na análise de EDS na amostra foi detectado os elementos como C, N, O e Fe, e na quantidade (% atômica) de cerca de 10,37 %; 9,31 %; 7,87 % e 2,18 %, respectivamente. De acordo com Nkulu et al., (2015) foi utilizado na preparação das amostras para a análise no MEV-EDS, glutaraldeído 25 % e foi feito o enxágue com o meio 9K para eliminar o Fe da solução das amostras. A camada condutora utilizado foi de espessura de 20 nm de Pt e com esse procedimento foi possível visualizar o formato dos microrganismos [10].

3 CONCLUSÃO

A *Acidithiobacillus ferrooxidans* apresentou um crescimento bacteriano e atingiu a maior concentração celular após 3 dias de inoculação a 30°C e 170 RPM em pH 1,8. A lixiviação bacteriana de PCIs permitiu concluir que a *Acidithiobacillus ferrooxidans* apresentou uma extração de cobre de 100% em 8 dias. O processamento da amostra com a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* para microanálise no MEV-EDS com o método de criosecação por liofilização não resultou em imagens representativas e compatíveis para identificação do formato da cepa de *thiobacillus*. Outros métodos serão avaliados, assim como o uso de reagentes como o tetróxido de ósmio (OsO₄) para aumentar a rigidez celular e diminuir os danos no processo de secagem durante a preparação das amostras para as micrografias.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) nos processos: 141086/2015-7 e 870243/1997-7; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo no processo: 2012/51871-9. Agradecimento aos Srs. Joel B. Sígolo, Isaac J. Sayeg e César W.G. Moreno do Depto de Geociências pela metalização das amostras para análise no MEV-EDS.

REFERÊNCIAS

- 1 Xavier, L.H.; Carvalho, T.C. Gestão de Resíduos Eletroeletrônicos. 2014; 1.ed.: cap.8, RJ: Elsevier, p. 129-148.
- 2 Espinosa, D.C.R., Bernardes, A.M., Tenório, J.A.S. Brazilian policy on battery disposal and its practical effect on battery recycling. 2004. Journal of Power Sources, v.137,1, pp. 134-139.
- 3 Espinosa, D.C.R., Bernardes, A.M., Tenório, J.A.S. An overview on the current processes for the recycling of batteries. 2004. Journal of Power Sources, v.135, 1-2, p. 311-319.
- 4 Menetti, R.P., Chaves, A.P.; Tenório, J.A.S. Obtenção de concentrados metálicos não ferrosos a partir de sucata eletrônica. 1996. In: Anais do 51 Congresso Anual da ABM. Porto Alegre, RS. Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais. V.4.
- 5 Silva, M.C.; Espinosa, D.C.R.; Tenório, J.A.S.; Bergmann, C.P.; Bernardes, A.M. 2004. Pyrometallurgical processing of e-waste dust through the distillation of metals. In: Rewas'04 – Global Symposium on Recycling, Waste Treatment and Clean Technology., Warrendale/San Sebastián: TMS/Inasmet, v.3. p. 2785-2787.
- 6 Yamane, L.H.; Tavares, V.; Espinosa, D.C.R.; Tenório, J.A.S. Recycling of WEEE: Characterization of spent printed circuit boards from mobile phones and computers. 2011. Waste Management, 31., p. 2553-2558.

- 7 Silvas, F.P.C.; Correa, M.M.J.; Caldas, M.P.K.; Moraes, V.T.; Espinosa, D.C.R.; Tenório, J.A.S. Printedcircuitboardrecycling: physicalprocessingandcopperextractionbyselectiveleaching. 2015.Waste Management, 46., p. 503-510.
- 8 Yamane, L.H.; Espinosa, D. C. R.; Tenório, J. A. S. Lixiviação Bacteriana de Sucata Eletrônica: Influência dos Parâmetros de Processos. 2013. Tecnol. Metal. Mater. Miner., São Paulo, v. 10, n. 1, p. 50-56.
- 9 Marra, A.; Cesaro, A.; Rene, E.R.; Belgiorno, V.; Lens, P.N.L. 2018. Bioleachingofmetalsfrom WEEE shreddingdust. Jour. Environm. Managem. 210, pp. 180-190.
- 10 Nkulu, G.; Gaydardzhiev, S.; Mwema, E.; Compere, P. SEM and EDS observationsofcarrollitebioleachingwith a mixedcultureofacidophilic bactéria. 2015. Minerals Eng. 75, pp. 70-76.
- 11 Mannheimer, W.A. Microscopia dos Materiais – Uma Introdução. 2002. Soc.Bras.Microscopia e Microanálise. E-papers Serv. Edit. Cap. XII, p. 15-16.
- 12 Frenay, J.; Wiertz, J.; Corneille, E.K. Contributiontothebioleachingstudyofcomplexpyritics-ores. 1985. MicrobiologicalEffectsonMetallurgical Processes. L. Has; J. Clum. Ed. AIME, p. 35-50.
- 13 Johnson, D.B. Selectivesolid media for isolatingandenumeratingacidophilic bactéria. 1995. Jour. Microbiol. Meth. 23, pp. 205-218.
- 14 Johnson, D.B.; Macvicar, J.H.M.; Rolfe, S. A new solid médium for theisolationandenumerationof *Thiobacillusferrooxidans*andacidophilicheterotrophic bactéria. 1987. Jour. Microbiol. Methods 7, pp. 9-18.
- 15 Modak, J.M.; Natarajan, K.A. Developmentofspecialstrainspf *Thiobacillusferrooxidans*for enhancedbioelachingofsulphideminerals. 1995. In: Biohydromet. Proesses., Chile, v.1, p. 33-46.
- 16 Attia, Y.A.; El-Zeky. Bioleachingofgoldpyritetailingswithadapted bactéria. 1989. Hydromet., Amsterdam, v. 22, n.3, p. 291-300.
- 17 Brandl, H.,Bosshard, R., Wegmann, M. Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. 2001. Hydrometallurgy 59, 319–326.
- 18 Lambert, F., Gaydardzhiev, S., Léonard, G., Lewis, G., Bareel, P. F., Bastin, D. Copperleachingfromwasteelectriccablesbybiohydrometallurgy. 2015. Minerals Eng. 76, p. 38-46, 2015.
- 19 Castro, L.A.S. Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura. 2002. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. Etapas gerais do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura, pp. 12-15.
- 20 Damy-Benedetti, P.C.; Terroni, H.C.; Jesus, J.M.; Artuzo, L.T.; Ventura, L.V.; Santos, R.F. 2011. Liofilização. Unilago. Rev.Cient. pp. 271-284.
- 21 Sette, L.D. Técnicas de Preservação de Microrganismos. 2011. CBMAI-CPQBA/Unicamp.
- 22 Wu, X.L.; Hu, D.M.; Xin, X.H.; Miao, B.; Wang, Y.Y.; Liu, X.D.; Shen, L. Preservationefficiencyof new cryoprotectantused for *Acidithiobacillusferrooxidans* in liquidnitrogen. 2013. ScienceDirect.Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 23, pp. 818-823.
- 23 Cleland, D.; Krader, P.; McCree, C.; Tang, J.; Emerson, D. Glycinebetaine as a cryoprotectant for prokaryotes. 2004. Jour. Microbiol. Meth. 58, pp. 31-38.