

DAVID NESTOR URQUIZO VALDÍVIA



LIXIVIAÇÃO BACTERIANA DE MINÉRIOS REFRACTÁRIOS DE OURO

**CONSULTA
FT-1787**

**São Paulo
2003**

DAVID NESTOR URQUIZO VALDÍVIA



LIXIVIAÇÃO BACTERIANA DE MINÉRIOS REFRAATÓRIOS DE OURO

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia Mineral

Área de Concentração: Engenharia Mineral

Orientador:
Arthur Pinto Chaves

São Paulo
Março - 2003

Aos meus pais, principalmente à memória da minha mãe, pelo carinho, dedicação e esforço na minha formação.

A Virginia, minha filha, uma nova luz em meu caminho.

A Marcia, minha esposa, pelo carinho.

Agradecimentos

Ao Prof. Arthur Pinto Chaves, pela amizade, orientação, apoio e incentivo constantes.

À Rose, secretária do Laboratório de Tratamento de Minérios-LTM, pela força constante.

Aos grandes amigos, em especial Tico, Rozendo, Altair, Jailson, Jorge, Juscelino, e Alfredo, pelo apoio, a minha gratidão.

Aos amigos da pós-graduação: Reynaldo, Naelcio, Priscila, Moustafa, Wendel, Angelo, Guillermo, Hugo, etc., pela convivência diária e amizade. Aprendi muito com vocês.

Ao Pesquisador Luis Carlos Urenha, do IPT, pelas sugestões e ajuda constante.

Ao Prof. Oswaldo Garcia Junior, pelas recomendações iniciais.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento integral, que proporcionou a realização deste trabalho.

A todos aqueles, pessoas especiais, que com uma palavra amiga, um gesto ajudaram neste longo caminhar...

2.5 - Planejamento experimental	35
2.5.1 - Princípios básicos	36
2.5.2 - Classes de projetos	36
2.5.3 - Esquema do planejamento experimental	38
2,6 – Bioreatores	39
2.6.1 – Tipos de bioreatores	39
2.6.2 – Bioreator de tanque agitado	40
2.6.3 – Bioreator Airlift	42
3. Materiais e Métodos	44
3.1 – Materiais	44
3.1.1 – Microorganismo e meio de cultura	45
3.1.2 – Caracterização do minério	45
3.2 – Métodos	47
3.2.1 - Cultivo de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	47
3.2.2 - Obtenção da suspensão concentrada de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	47
3.2.3 - Procedimento de bio-oxidação	47
3.3 - Ensaio preliminares de bio-oxidação em frascos agitados	48
3.3.1 - Adaptação bacteriana	48
3.3.1a. – Testes de atividade oxidativa	49
3.3.2 – Mecanismos de biolixiviação	49
3.3.2.1 – Ensaio da interação bacteriana sobre a superfície mineral	50
3.3.2.2 – Influência dos reagentes de flotação sobre o <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	51
3.3.2.3 – Influência dos reagentes de flotação sobre a capacidade de aderência do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	52
3.4 - Ensaio preliminares em bioreator Airlift	53
3.4.1 - Efeito da presença de reagentes de flotação	

na biolixiviação	53
3.4.2 - Ensaios iniciais em bioreator Airlift	54
3.5 - Caracterização das variáveis de biolixiviação	54
3.5.1 - Preparo de amostras minerais	55
3.5.2 - Bioreator Airlift	55
3.5.3 - Planejamento estatístico de experimentos	58
3.5.4 - Definição de parâmetros a serem analisados	58
3.5.5 - Definição das faixas de trabalho dos parâmetros escolhidos	58
3.5.6 - Projeto experimental selecionado	59
3.5.7 - Análise de resultados do processo	59
3.5.8 - Descrição de um ensaio típico de biolixiviação	60
3.5.9 - Ensaio de cianetação direta	60
3.6 - Análise de ferro	61
3.7 - Dosagem de proteína total	64
3.8 - Medida de proteína celular	64
3.9 - Determinação do arsênio	65
4. Resultados e Discussão	66
4.1 - Adaptação bacteriana	66
4.1.1 - Adaptação bacteriana $\frac{1}{4}$ Fe II + 2 g de minério	66
4.1.2 - Adaptação bacteriana $\frac{1}{8}$ Fe II + 4 g de minério	69
4.1.3 - Adaptação bacteriana (8 e 12 % de minério)	69
4.1.4 - Adaptação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	72
4.2 - Mecanismos de biolixiviação	76
4.2.1 - Atividade oxidativa	76
4.2.2 - Interação da célula bacteriana <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> com a superfície mineral	80
4.2.3 - Efeito da concentração inicial de íon férrico	86
4.2.4 - Influência do pH	94
4.2.5 - Influência dos reagentes de flotação no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	98

4.2.6 - Influência dos reagentes de flotação sobre a aderência de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	102
4.2.7 - Influência dos reagentes de flotação no processo de biolixiviação	105
4.3 – Ensaios preliminares em bioreator Airlift	108
4.4 – Planejamento experimental	118
4.5 – Análise do projeto fatorial e caracterização de variáveis	134
4.5.1 – Cálculo de efeitos	135
4.5.2 – Análise estatística de variância (ANOVA)	141
5. Conclusões	149
Referências Bibliográficas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Anexos	

Resumo

A evolução da atividade mineira tende a esgotar os minerais ricos e fáceis de processar. Como consequência têm se observado teores cada vez mais baixos nos minérios e aumento na complexidade das composições minérios. A preocupação com a proteção ambiental está crescendo. Tudo isto faz com que os custos da mineração e de processamento de minérios esteja aumentando. Grande número de depósitos de ouro estão associados a minérios sulfetados, principalmente à arsenopirita. Em muitos casos, o ouro (e outros metais preciosos) está encapsulado dentro dos grãos de sulfeto, ou faz parte do próprio retículo cristalino. Em tal situação ele não é acessível aos agentes lixiviantes – eles são chamados “minerais refratários”. A moagem fina dos mesmos não é suficiente para fornecer recuperações satisfatórias de ouro.

As técnicas disponíveis para processar estes depósitos são onerosas dada a complexidade do processamento. Como resultado, jazidas de baixos teores e/ou depósitos pequenos não são economicamente viáveis, na maioria das vezes. Assim, aumentar a eficiência de recuperação de ouro de minérios cada vez mais refratários, e ao mesmo tempo reduzir os custos de produção, tornou-se um problema crítico.

Por outro lado, os processos convencionais de oxidação, principalmente a ustulação, muitas vezes podem ter um resultado pobre na recuperação do metal precioso devido à formação de escória (cinzas do carvão) ou compostos cianídeos. A oxidação sob pressão é um processo sofisticado, que requer temperaturas e pressões elevadas, materiais resistentes à corrosão, além de fábrica de oxigênio.

A biotecnologia é uma proposta alternativa e inovadora. Usa bactérias para quebrar a matriz mineral através da oxidação e libertar os metais - para serem recuperados através de processos convencionais.

Os processos de oxidação biológica são usados para extrair metais de concentrados sulfetados. Outros contaminantes, como arsênio, antimônio, cádmio e outros também são solubilizados seletivamente. Metais básicos como o cobre são solubilizados e podem ser recuperados usando extração por solventes e eletrodeposição.

Um das chaves para o desenvolvimento desta tecnologia será entender o papel exato das bactérias que oxidam ferro e enxofre. Os mecanismos de bio-oxidação (direto e indireto) são importantes para descrever a solubilização do sulfeto mineral. Pelo mecanismo direto, a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* adere-se tenazmente à superfície mineral, promovendo a bio-oxidação. Pelo mecanismo indireto, a lixiviação química do sulfeto

acontece pela redução do íon férrico em solução, o qual é re-oxidado pelo *Acidithiobacillus*. A contribuição de cada um desses mecanismos de lixiviação, depende das características do minério e das condições de operação.

A interação entre a célula e a superfície mineral mostrou-se dependente de vários parâmetros físicos e bioquímicos. A ligação bacteriana para cada mineral depende do tipo do substrato de crescimento, concentração do substrato e características do mineral. Também depende das propriedades bioquímicas dos microorganismos e das condições de crescimento. Por outro lado, a composição da superfície bacteriana muda de acordo com o substrato de cultura. Alguns componentes da membrana externa, como as proteínas, poderiam ter um papel importante na adesão e na oxidação.

Neste trabalho foram estudadas as variáveis que influenciam a velocidade de oxidação de um concentrado refratário de pirita aurífera. Inicialmente foi analisada a influência das características do minério sobre o processo de biolixiviação. Principalmente como a concentração do substrato mineral interfere com a atividade metabólica de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Também foram caracterizados os efeitos de alguns parâmetros: pH, presença inicial de íons férricos, e de reagentes de flotação no curso da biolixiviação. A caracterização metabólica dos microorganismos utilizados na oxidação bacteriana facilita a avaliação dos mecanismos envolvidos.

As variáveis mais importantes estudadas num bio-reator Airlift de 12 L foram tamanho de inóculo, vazão de ar, porcentagem de sólidos e tempo de residência. As variáveis de resposta foram tempo de lixiviação, concentração da massa celular, pH e extração de ouro.

Os estudos detalhados contribuíram para a melhor compreensão de cinética da oxidação. A técnica de planejamento estatístico experimental foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis importantes e as relações existentes entre elas.

SUMMARY

The increase in mining activity is leading to the exhaustion of the rich and easy-to-process mineral deposits. As a result, ores have now decreased in grades and increased in mineralogical complexity. Also, conscience of environment care is growing. All of this results in that mining and mineral processing costs are increasing. A great number of ore deposits is associated to sulphide minerals, especially arsenopyrite. In many cases, gold (and other precious metals) is inclosed inside the sulphide grains or as part of the crystal lattice. In such a situation they are not accessible to leaching agents - they are called "refractory ores". Fine grinding is not enough to provide satisfactory recoveries of gold.

The techniques available to process ores of this kind are expensive, given the processing complexity. As a result, most of the times, low grade ores and/or small deposits are not economically feasible. So, increasing the recovery of ores more and more refractory and at the same time reducing production costs becomes a critical job.

On the other hand, conventional oxidation processes, specially roasting, may lead to poor results in precious metal recovery, due to the formation of slags (from coal ashes) or of cyanide compounds. Pressure leaching is a sophisticated process, demanding high pressures, corrosion-resistant materials and an oxygen factory.

Biotechnology is an alternative and innovative proposal. It uses bacteria to break down the mineral structure through oxidation and to free the metals - which will be recovered by conventional techniques.

Biological oxidation processes are used to extract metals from sulphide concentrates. Other contaminants, like As, Sb, Cd and others, are also selectively solubilized. So are basic metals like Cu and they must be recovered through solvent extraction and electrowinning.

Key to this technology is understanding the exact role of the bacteria which oxidizes Fe and S. Bio-oxidation mechanisms (direct and indirect) are important to describe the sulphide mineral solubilization. By the direct mechanism, the bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* strongly adheres to the surface of the mineral, promoting bioleaching. By the indirect mechanism, the leaching of the sulphide occurs via reduction of the ferric ion in solution, which is reoxidized by the *Acidithiobacillus*. The contribution of each of these mechanisms depends on the mineral's characteristics and on operational conditions.

Cell and mineral surface interaction depends on many physical and biochemical parameters. Bacterial adhesion to each mineral depends on the kind of growing substratum, substratum concentration and mineral's characteristics. It also depends on microorganism

biochemical properties and growing conditions. On the other hand, the bacterium surface composition changes according to culture substratum. Some of the external membrane components, like proteins, may have an important role in adhesion and oxidation.

In this thesis, the variables affecting the oxidation rate of a refractory gold pyrite concentrate have been studied. To begin with mineral the characteristics' influence have been analyzed, especially, how mineral substratum concentration interferes on the metabolic activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Selected parameters effect have also been studied: pH, presence of ferric ions and flotation chemicals on bioleaching course. The metabolical characterization of the microorganism used makes easier the evaluation of the mechanisms.

The most important variables found in a 12 L Airlift reactor are size of the inoculum, air flow, percent solids and residence time. Leaching time, cellular mass concentration, pH and gold extraction were the answer variables.

Their detailed study contribute to a better comprehension of the oxidation kinetics. Stathistical planning has been used to evaluate the effect of these variables and existing relations among then.

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

Um dos principais desafios da indústria mineral é extrair e processar minerais metálicos com mínimo dano para o ecossistema. O aumento desta preocupação nos países mineradores sugere que os custos das operações convencionais de fundição e refino aumentarão com o tempo.

Os problemas ambientais gerados pela indústria mineral são tecnicamente complexos e afetam o equilíbrio do meio. Entre os principais assuntos ambientais que a comunidade minerária está tentando resolver, estão os riscos da degradação de zonas arborizadas, emissão de gases poluentes e contaminação, particularmente, das águas subterrâneas.

A busca de soluções alternativas aos processos convencionais estará focalizando esforços no desenvolvimento e adoção de tecnologias novas para abaixar as emissões de gases das usinas de ustulação e redução, que continuarão formando uma parte significativa na estrutura dos custos produtivos da indústria.

Por outro lado, a emissão de rejeitos potencialmente perigosos, geradores de drenagem ácida pode desequilibrar ecossistemas. A drenagem ácida gerada por minas abandonadas é um dos maiores impactos ambientais causados pela indústria da mineração.

Torna-se evidente que somente uma mudança radical nos métodos do processamento mineral permitirá resolver muitos destes problemas ambientais. A mineração fez e faz progressos consideráveis focalizando o aspecto ambiental e este enfoque pode ajudar a indústria a promover o gerenciamento ambientalmente responsável de rejeitos sólidos e líquidos para mitigar os impactos ambientais.

Os jazimentos minerais de superfície (óxidos) estão exauridos há tempo e as minas trabalham os corpos minerais mais profundos (sulfetos), muitos dos quais são de natureza complexa (refratários) e de difícil processamento. Os minérios são definidos como refratários quando uma porção significativa do metal contido não pode ser recuperada por moagem e extração simples: o metal está contido dentro de

minerais sulfetados, ou então, carbono elementar está presente e pode interferir com o processo de extração.

A indústria mineira de ouro sofreu sérias mudanças na produtividade. Ela está encarando o declínio dos teores minerais e o aumento dos corpos refratários de ouro. A diminuição do preço de ouro tem obrigado o desenvolvimento e a implementação de novas tecnologias para incrementar a eficiência na recuperação de minerais altamente refratários e ao mesmo tempo abaixar o custo de produção, que ficou crítico para a sobrevivência desta indústria. Adicionalmente, na próxima década cerca de 50% da nova mineração mundial de ouro poderá ser produzida de mineral refratário de sulfeto (Newmont Gold, 1994).

Atualmente as tecnologias para processar estes depósitos são onerosas, dada a complexidade do processamento. Como resultado, jazidas de baixos teores e depósitos pequenos não são economicamente viáveis, na maioria das vezes. Por outro lado, a maioria dos metais existe como sulfeto em seu estado natural e deve ser oxidada (convertidos à forma metálica). Comumente os metais incluem cobre, ferro, níquel e zinco. Esses metais, na sua forma sulfetada, contêm pequenas quantidades de metais preciosos, que estão encapsuladas dentro da estrutura do minério e não podem ser recuperadas por métodos convencionais.

A oxidação de minérios sulfetados por métodos convencionais encarece os custos de produção (significa que somente minerais refratários com alto grau de concentração poderiam ser economicamente processados). Adicionalmente soma-se a dificuldade de controlar a emissão de gases.

O crescimento da demanda de metais força a utilização de minérios com baixo teor, depósitos mais profundos ou depósitos de rejeitos. Depósitos estes que têm metalurgia altamente complexa e podem incluir uma gama de metais básicos e metais preciosos. São necessárias rotas de processamento complexas para remover os metais valiosos. Por outro lado, a rota normal de processo para depósitos que não produzem concentrados limpos requer melhor moagem e um aumento do número de etapas na flotação para limpar os diferentes concentrados. Estes passos extras, têm efeitos econômicos em custos e recuperação.

A biotecnologia parece ser uma alternativa viável para muitos destes projetos. Menor capital inicial e baixo custo operacional, junto com uma tecnologia amigável e melhoria na qualidade ambiental colocam a biolixiviação numa posição privilegiada para a participação em projetos com tecnologia limpa. Em lugar de uma moagem complexa e várias operações de flotação para produzir concentrados separados, uma rota de flotação simples produziria concentrado para lixiviação biológica.

Estes processos são usados para extrair metais de concentrados sulfetados, processos nos quais os contaminantes, tais como arsênio, antimônio, cádmio e outros são solubilizados seletivamente através da oxidação biológica.

A bio-oxidação ou lixiviação bacteriana, envolve a extração de metais de minérios e concentrados sulfetados, usando-se componentes que ocorrem naturalmente como ar, água e microorganismos. Estas bactérias podem solubilizar os sulfetos através da oxidação na faixa de temperaturas de 30 a 70 °C. O sulfeto é a fonte de energia para estas bactérias e o CO₂ do ar é a fonte de carbono.

O processo de biolixiviação é levado a cabo a temperaturas próximas da ambiente e à pressão atmosférica. Por isto consome menor energia, tem baixo capital e menores custos operacionais, se comparado com a ustulação e redução, que são processos de temperaturas elevadas. Em geral, o capital e os custos são significativamente mais baixos (até 50%) que os processos tradicionais de ustulação e refino.

A biolixiviação é um processo não agressor ao meio ambiente: degrada os efluentes tóxicos geradores de ácido (a bactéria oxida o sulfeto a sulfato solúvel em meio ácido), geralmente produz resíduos ambientalmente estáveis e não emite gases poluentes. Adicionalmente, acelera o processo natural de oxidação, em aproximadamente 500.000 vezes.

A bio-oxidação consiste na solubilização de minerais sulfetados através da ação bacteriana por meio de reações oxidantes da bactéria acidofílica *Acidithiobacillus ferrooxidans*. O microorganismo envolve a matriz sulfetada degradando-a e permitindo a liberação dos metais preciosos. Ele, basicamente, catalisa a oxidação das formas reduzidas de ferro e enxofre presentes no minério,

utilizando a energia liberada para o seu metabolismo. Além de tornar solúvel o metal, a atividade destes microrganismos gera um licor ácido que é um potente agente lixiviante adicional.

A ação das bactérias se dá através de dois mecanismos. Na primeira etapa ocorre um ataque direto à superfície do mineral e as bactérias oxidam a parte sulfetada do minério. A segunda etapa inclui a oxidação de sulfetos na solução pela ação do íon férrico bacteriano produzido.

Existe a necessidade urgente de entender melhor os fenômenos biológicos, químicos, de transporte de massa e de calor, envolvidos nos processos da lixiviação bacteriana, e como estes fatores interagem entre si. Uma das chaves para o desenvolvimento desta tecnologia será entender o papel exato das bactérias que oxidam ferro e enxofre no processo de lixiviação.

A lixiviação bacteriana de metais é influenciada por uma série de fatores físico-químicos e biológicos. Ela é primariamente determinada pela condição mineralógica do concentrado (Taxiarchou, 1994) e pela influência das condições de operação: granulometria do minério, concentração de sólidos, temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, agitação, tempo de residência. As atividades da bactéria, podem ser estritamente controladas pelo meio de crescimento (Modak, 1995).

A bio-oxidação industrial não é feita em condições estéreis. Esta bactéria geralmente ocorre junto com uma população mista de outras bactérias, com as quais coexiste como uma cultura mista. As proporções relativas das diferentes bactérias dependem do ambiente em que se opera, principalmente da temperatura, pH e natureza do suprimento do sulfeto. Geralmente o *Acidithiobacillus ferrooxidans* opera em ambiente hostil em termos de calor e acidez, de modo que a contaminação por outro microrganismo não acontece.

A dissolução biológica dos minerais que contêm arsenopirita permite a produção de ouro em reservas que não são viáveis do ponto de vista econômico. Por exemplo, uma melhoria em recuperação de ouro de 30% a 90% pode ser alcançada com 3 e 5 dias de oxidação bacteriana antes da cianetação (Deng, 2000).

Por razões econômicas, a biolixiviação tem potencial para gradualmente substituir os processos convencionais, dados sua alta eficiência, baixo custo e pouco

investimento industrial. As usinas de processamento mineral de bio-oxidação são simples de construir e operar e são ideais para regiões remotas. As recuperações de ouro podem ser superiores ao 90 %, quando são processados concentrados de minérios refratários.

O uso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* num processo de biolixiviação para extrair metais de minérios de baixo teor, provou recentemente ser economicamente produtivo. Foi calculado um ganho comercial em 1998, de US\$ 2 a US\$ 3 bilhões para a biolixiviação de ouro (200 a 300 toneladas). Já a biolixiviação de cobre foi calculado para produzir \$8 bilhões em 1998 (9.000.000 toneladas) (Newmont Gold, 1994).

Os processos de bio-oxidação tiveram êxito em vários países, especialmente Chile, Austrália e África do Sul. Por exemplo, o processo de BIOX está sendo usado para o pré-tratamento de concentrados de ouro em cinco instalações e o processo de BacTech em três instalações. Estão sendo planejadas usinas de demonstração para processos de BioCop (Chile), BioNic (África do sul), BioZinc (China).

Na maioria dos países, pesquisa considerável está sendo levada a cabo com biolixiviação de minerais refratários de sulfeto, de difícil processamento para a extração de metais preciosos e metais básicos (cobre, níquel, zinco, cobalto e molibdênio). Citamos o Centro de Investigacion Minera y Metalurgica (CIMM) no Chile, a Mintek, organização nacional de pesquisa de minerais, da África do Sul, o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Cape Town, a Escola de Engenharia Nacional de Idaho e o Laboratório Ambiental de Estados Unidos de América (INEEL). Também foram desenvolvidas pesquisas nesta área, em companhias tais como Billiton (Londres) e BacTech (Belmont, Austrália Ocidental).

A Billiton, que tem operações em vários países, inclusive no Canadá, em colaboração com Gencor, fixada na África do Sul (BIOX) está direcionando seus esforços para demonstrar o processo BioNic para o tratamento de minérios de baixo teor e de minérios de níquel quimicamente difíceis, assim como também, o processo BioCop para a extração de cobre.

Do mesmo modo, a BacTech, validou, em 1994, uma tecnologia comercial para o pré-tratamento de concentrados de ouro com bactérias termofílicas. Em abril

de 1999, entrou em um empreendimento conjunto com Mintek e a Industria Peñoles S.A. (Mexico) para o desenvolvimento de tecnologia de biolixiviação especialmente para concentrados de cobre e foi montada uma usina para extração de cobre por biolixiviação em escala industrial no México. A usina usa um circuito integrado de biolixiviação, extração por solvente e eletrodeposição (SX/EW), tem uma capacidade operativa de 500 kg/dia de cobre.

As características principais da tecnologia de oxidação bacteriana incluem:

- ❖ melhor extração,
- ❖ alta recuperação,
- ❖ recuperação econômica de concentrados e rejeitos minerais,
- ❖ produção de rejeitos ambientalmente estáveis,
- ❖ eliminação de rejeitos geradores de ácidos.

1.2. Justificativa

O presente projeto é a continuação das atividades desenvolvidas no Laboratório de Tratamento de Minérios e Resíduos Industriais, Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP, onde foram desenvolvidos trabalhos relacionados à lixiviação bacteriana de cobre e vários trabalhos para extração de ouro (Chaves, 1973, 1985; Urenha, 1992; Horta, 1996; Torres, 1996; Gomes, 1997; Gomes, 1999; Torres, 1999, Evelin, 2000; Nardi, 2000).

A recuperação de metais preciosos a partir de minérios e concentrados refratários, é um desafio técnico na Hidrometalurgia, fato este evidenciado pelo número importante de pesquisas e desenvolvimentos no processamento industrial do ouro, na procura de alternativas mais baratas e de mais fácil aplicação.

As técnicas de tratamento prévio à cianetação incluem tratamentos caros e complexos de oxidação, como a ustulação, a oxidação sobre pressão e a oxidação química. Isto resulta em tratamentos muito complexos que produzem poluição ambiental, pela geração de compostos tóxicos como o dióxido de enxofre e arsênico volátil.

Tratamento alternativo, menos prejudicial ao meio e de menor custo, recentemente utilizado para esta finalidade, é a oxidação por lixiviação bacteriana. Esta técnica tem se tornado uma alternativa atraente, principalmente em minerações pequenas e de médio porte. Após este processo, torna-se possível a extração de ouro do rejeito biolixiviado mediante a utilização de reagentes lixiviantes como cianeto ou tioureia.

1.3. Objetivo

O propósito deste estudo foi examinar a possibilidade de viabilizar a extração de ouro refratário de minérios e concentrados sulfetados complexos pela tecnologia da bio-oxidação.

Foram estudadas as variáveis que influenciam a velocidade de bio-oxidação de um concentrado sulfetado de pirita aurífera refratária. Foram determinadas quais variáveis têm maior influência no processo de biolixiviação com a finalidade de caracterizar os parâmetros críticos do processo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Processos de pré-tratamento de minérios refratários

Aproximadamente um terço da produção de ouro do mundo vem de minérios descritos como refratários, e esta proporção está crescendo (Fleming, 1998). O tratamento econômico e ambiental responsável de minérios refratários complexos do ouro está tornando-se assim cada vez mais importante. A causa a mais comum da refratariedade é a associação do ouro com minerais sulfetados como a arsenopirita, a pirita, e a pirrotita (Attia, 1989; Taxiarchou, 1994).

Tecnicamente, o fenômeno de refratariedade pode ser compreendido como uma limitação estrutural de alguns minérios em permitir o acesso livre da solução lixivante à interface de reação dos metais preciosos, contidos no interior dessa matriz, evitando deste maneira, o contato adequado entre o sólido e a solução lixivante (Dutrizac and Donald, 1974). Para lograr uma recuperação satisfatória dos minérios refratários, os cristais de enxofre da pirita e arsenopirita deveriam primeiramente romper-se (pela oxidação) para eliminar o encapsulamento dos metais preciosos antes da aplicação dos processos convencionais de extração, assim permitindo o contato com o agente lixivante.

As três rotas de processo principais disponíveis para romper a estrutura cristalina dos minerais sulfetados e expor o ouro para a lixiviação subsequente são a ustulação, a oxidação sob pressão e a oxidação bacteriana (Fleming, 1998).

Até dez anos atrás, a prática mais comum no tratamento de minérios refratários era a ustulação, a qual consiste na oxidação de sulfetos a dióxido de enxofre. Mais recentemente foi desenvolvida, como processo industrial, a oxidação sob pressão, entre 180 e 220 °C. Ela vem sendo preferida à ustulação por não ter a emissão de gases poluentes e o sulfeto ser completamente oxidado a sulfato. Do mesmo modo foi desenvolvida a lixiviação bacteriana como processo industrial, que envolve a oxidação de sulfeto a ácido sulfúrico.

2.1.1. Ustulação

A ustulação é uma técnica convencional usada para decompor os minérios sulfetados, liberar o ouro ocluso e torná-lo acessível à cianetação. Entretanto, a ustulação é uma operação complexa que requer controles cuidadosos das operações e da alimentação, além de produzir gases tóxicos (SO_2 , As_2O_3) que requerem processos custosos de abatimento (Ubalini, 2000).

A ustulação de minérios e concentrados de flotação foi convencionalmente usada para quebrar a matriz do mineral sulfetado. Esta tecnologia foi amplamente praticada no passado na recuperação de ouro de minérios refratários antes da cianetação (Fleming, 1998). Na presença de arsenopirita aplica-se um processo de dois estágios. O primeiro estágio, não oxidativo, de ustulação a 400 a 450 °C, remove o arsênio como trióxido de arsênio volátil, seguido da ustulação oxidativa a 650 e 750 °C, para produzir hematita e dióxido de enxofre. O produto da calcinação deve ser suficientemente poroso para que as partículas de ouro sejam acessíveis à solução de cianeto.

Trata-se de um processo caro, devido aos dispositivos de controle de emissão de gases. Estes aumentam grandemente os investimentos e os custos operacionais. Os depuradores de gás são essenciais para conter o dióxido de enxofre e as emissões de trióxido de arsênio, que são poluentes.

2.1.2. Oxidação sob pressão

Recentemente vem ocorrendo uma mudança na direção do tratamento de minérios e concentrados de ouro refratário, do método tradicional de ustulação para a lixiviação sob pressão (Fleming, 1998). Esta foi o resultado de dois fatores. Primeiramente a incapacidade das primeiras usinas ustuladoras em satisfazerem os novos limites ambientais de descarga de dióxido de enxofre e trióxido de arsênio na atmosfera. Segundo, o fato de que a recuperação de ouro dos produtos ustulados é geralmente inferior à atingida depois da oxidação sob pressão. Este último fator é especialmente importante no tratamento de minerais com arsenopirita onde o ouro

freqüentemente está finamente disseminado e não acessível ao cianeto, nem é tornado acessível ao cianeto mesmo que um calcinado poroso seja produzido.

A oxidação sob pressão envolve a quebra de minerais sulfetados (pirita e arsenopirita) usando vapor e injeção de oxigênio sob pressão. Assim, qualquer ouro incluso nas fases minerais fica completamente exposto durante a oxidação.

De forma semelhante, este processo de oxidação é muito mais caro que a ustulação e requer grandes investimentos. As autoclaves da pressão são caras por causa de seus materiais de construção avançados, a fabricação e instalação de autoclaves requerem tempos longos. Adicionalmente é necessário alto nível de treinamento e habilidade do operador por causa da complexidade de operação, manutenção e das exigências de segurança para controlar as pressões e temperaturas altas, o que também aumenta os custos operacionais deste processo.

2.1.3. Biolixiviação

A biolixiviação de minérios sulfetados refratários é um conceito relativamente novo em comparação aos processos de ustulação, oxidação sob pressão e oxidação química. E, rapidamente foi estabelecido como um pré-tratamento alternativo viável de oxidação. As perspectivas da aplicação industrial da lixiviação bacteriana para minérios auríferos refratários no mundo têm crescido muito (Aswegen, 1998).

A oxidação de minérios sulfetados por métodos biológicos, particularmente o de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, é bem conhecida e é o centro de um grande número artigos publicados. Os processos de oxidação biológica são agora intensamente avaliados para a extração de metais de concentrados sulfetados, processos nos quais os contaminantes de metais, tais como arsênio, antimônio, cádmio e outros, são solubilizados seletivamente através da ação biológica antes dos procedimentos convencionais de extração.

Os benefícios da lixiviação bacteriana sobre a ustulação são semelhantes aos obtidos pela oxidação sob pressão. Os minerais de sulfeto geralmente dissolvem-se completamente, expondo completamente as partículas de ouro encapsuladas

(Attia,1989). O arsênio também é liberado do mineral em forma de ácido arsênico, que é mais facilmente manipulado, do ponto de vista ambiental, que o vapor de trióxido de arsênio.

Na realidade, o ouro não é solúvel nas soluções ácidas geradas pela bactéria lixiviante, o ferro é solubilizado e oxidado de ferro ferroso a ferro férrico, o arsênio é solubilizado e oxidado a arsenato e o sulfeto a sulfato.

A biolixiviação de sulfetos é conduzida a baixa porcentagem de sólidos, usualmente em torno de 10 a 30 %. O pH é controlado na faixa de 1,5 a 2,0, o excesso de ácido sulfúrico gerado pela oxidação de sulfetos, deve ser continuamente neutralizado pela adição de cal e a temperatura deve estar entre 30 e 40 °C para a reprodução ótima da cepa bacteriana (Aswegen, 1998).

As quantidades de ferro dependem da pirrotita, pirita e arsenopirita, mas deveria haver um excesso de ferro a arsênio para garantir a precipitação de arseniato férrico em vez de arseniato de cálcio durante a neutralização depois da biolixiviação. A estabilidade dos precipitados aumenta com a razão molar ferro/arsênio de 4:1, o que é necessário para produzir resíduos que são estáveis nos testes de lixiviação.

Uma importante característica das reações da lixiviação bacteriana é que elas são autocatalíticas. As bactérias usam a energia da oxidação para desenvolver suas atividades metabólicas (Guiliani, 2000). Muito do progresso que tem sido feito nos últimos anos para o tratamento de concentrados, dá-se no desenvolvimento de cepas bacterianas que se multiplicam rapidamente nas condições agressivas que prevalecem nas reações exotérmicas de oxidação de sulfeto. Este foi um desenvolvimento essencial antes da biolixiviação de concentrados em reatores agitados de aplicação industrial. Por exemplo, no começo do trabalho em usina piloto nos laboratórios da GENCOR , verificou-se que o tempo de residência de 10 dias era necessário para alcançar 97 % de recuperação de ouro. Depois de dois anos de operação, a bactéria tinha-se adaptado e mudado, e o tempo de residência decresceu para 4 dias. Atualmente este tempo de residência é típico para todas as usinas de biolixiviação (Aswegen, 1998).

2.2. Lixiviação bacteriana

A lixiviação bacteriana de minérios, apesar de ser usada como processo industrial desde 1950, é bem antiga como fenômeno natural conhecido da formação de drenagem ácida de mina (Chaves, 1973; Ribet, 1994). A oxidação bacteriana foi usada por milhares de anos como um dos meios para a recuperação de metais de depósitos de minerais sulfetados. O método foi empregado pelos romanos, embora eles não percebessem o que estavam fazendo (Susuki, 2001). Em 1947, foi reconhecido que as bactérias estavam presentes dentro da drenagem ácida e que desempenham um papel fundamental dentro dos processos da oxidação mineral.

Estudos feitos no sentido de utilizar a atividade bacteriana na recuperação de metais tornaram a lixiviação bacteriana uma alternativa para o aproveitamento não só de rejeitos e minérios de baixo teor, mas também para o tratamento de concentrados (Chaves, 1973; Haisch, 1985; Taxiarchou, 1994). O processo vem sendo utilizado industrialmente em vários países: Canadá, USA, Austrália, Brasil, África do Sul, Suécia, Rússia, Bulgária, México, China e Chile.

A lixiviação bacteriana tem sido mais estudada e empregada para minérios de cobre e urânio de baixo teor e/ou rejeitos, como alternativa ecológica e econômica para aproveitamento desses materiais (De Filippo, 1988; Garcia, 1989). Estes estudos abriram caminho na mineração do cobre e foram adaptadas para o ouro.

Nos últimos anos, o maior número de desenvolvimentos na área biohidrometalúrgica está ligado à extração de ouro de minérios e concentrados refratários. O crescente reconhecimento da oxidação bacteriana como um processo economicamente viável é atribuído principalmente, ao esgotamento de minérios de ouro e prata de alto grau. Além disto, o controle do aumento da poluição no meio ambiente, de acordo com o regulamento proposto para a indústria de mineração, com respeito à qualidade de efluentes gasosos e líquidos produzidos por processos metalúrgicos convencionais, significa contribuir em direção a pesquisar novas tecnologias (Attia, 1985).

Na essência, certas bactérias catalisam a oxidação de elementos tais como íon ferroso e/ou enxofre reduzido e geram a energia usada para manutenção da suas funções celulares e de crescimento. O efeito sobre o mineral (exemplo: pirita,

arsenopirita) é causar a sua quebra, produzindo, através de uma série complexa de fases químicas intermediárias, compostos solúveis de íon férrico e/ou ácido sulfúrico. Estes, por sua vez, entrando na solução, podem reagir com outros minerais presentes que não contêm ferro ferroso ou enxofre. Desta forma, o número e variedade de minérios que podem ser tratados pela oxidação bacteriana pode ser ampliado.

Os principais organismos da hidrometalurgia (Rawlings, 2001) estão divididos em dois grupos:

- Microorganismos autotróficos:
 - o Mesofílicos, 30 a 40 °C, do gênero *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum*.
 - o Termofílicos moderados, 40 a 55 °C, do gênero *Sulfolobus*, *Acidiamus*, *Metallosphaera* e *Sulforococcus*.
 - o Termofílicos extremos, acima de 55 °C, do gênero *Sulfolobus*, *Acidiamus*, *Metallosphaera* e *Sulforococcus*
- *Microorganismos heterotróficos* (usam compostos orgânicos como fonte de carbono).

Os microrganismos responsáveis pela lixiviação bacteriana de minerais refratários de ouro pertencem ao gênero *Acidithiobacillus*, espécies *ferrooxidans* e *thiooxidans*. A sua presença está relacionada à presença de compostos de ferro e enxofre.

A atividade é estimulada dentro dos tanques de processo conhecidos como bio-reatores, nos quais temperatura, oxigênio e nutrientes criam as condições certas para os micro-organismos florescerem. Somente cepas naturais das bactérias são usadas atualmente, mas no futuro bactérias geneticamente modificadas poderão ser desenvolvidas (Haish, 1985).

As reações de oxidação catalisadas pela bactéria são de natureza exotérmica, não necessitando de aquecimento. Ao contrário, os recipientes de reação precisam freqüentemente ser esfriados, especialmente em climas tropicais. Tem se reportado que o tanque de reação BIOX da São Bento, de 580 m³ tem instalado um tubo de resfriamento interno, de aproximadamente 1,7 Km (Aswegen, 1998).

Os processos da lixiviação bacteriana, muitas vezes, são limitados pela concentração de oxigênio e dióxido de carbono (Haish, 1985). Os microorganismos empregados neste processo, dependem da transferência de oxigênio dentro da fase líquida. Por outro lado, deve haver um volume suficiente de água na suspensão ativa, para garantir às bactérias, o oxigênio e gás carbônico necessários. Por isto a concentração de sólidos não deve ser muito alta. Na operação do processo BIOX, usa-se uma concentração de 20 % de sólidos em suspensão (Aswegen, 1998).

A maior usina de biolixiviação do mundo para ouro está na mina de Obuasi, em Ghana, desde 1994. A mineração de Newmont tem uma pilha de operação de lixiviação bacteriana em sua operação de Carlin, Nevada. Esta mina produziu 43,5 toneladas de ouro no ano que terminou em junho de 1997, com custo operacional médio de US\$ 274/oz. A Beatrix foi o produtor de mais baixo custo na África do Sul, com US\$ 207/oz (Aswegen, 1998).

Por outro lado, o desenvolvimento do processo de biolixiviação para recuperar metais básicos dos concentrados de sulfetos que contêm arsênio pode mudar a viabilidade econômica destes depósitos. A biolixiviação de concentrados de sulfetos complexos de minérios tem obtido resultados muito encorajadores (Brierley, 2001).

As seguintes recuperações de metais foram atingidas :

- 91 % de cobalto recuperado de cobaltita (escala usina piloto),
- 90 % de níquel recuperado de pentlandita (escala usina piloto),
- 95 % de cobre recuperado de calcocita e bornita,
- 92 % de cobre recuperado de calcocita, enargita e tennantita,
- 85 % de ouro, 90 % de prata e 75 % de cobre recuperados de concentrados complexos de sulfetos que consistem em tetrahedrita, pirita, calcopirita, estibnita e sinábrio.

Métodos de operação

Há cinco métodos gerais para realizar a oxidação bacteriana em escala comercial (Brierley, 2001). Estes são:

- tanque agitado de lixiviação,
- pilhas de lixiviação,
- colunas de lixiviação,
- “dump leaching”,
- lixiviação in situ.

No primeiro caso, uma suspensão contendo o mineral é agitada dentro de um tanque de material resistente ao ácido. Esta é a rota mais cara, de modo que, na prática, este método será usado provavelmente para tratar minério rico moído para extração de ouro.

As pilhas de lixiviação, são pilhas projetadas especialmente. Usualmente são tratados minerais de baixo teor ou rejeitos de flotação. O método pode ser aplicado para a extração de cobre. Aproximadamente 30 % da produção de cobre em Chile é por biolixiviação (Velasco, 2000; Brierley and Briggs, 1997; Brierley, 2001).

Na lixiviação em colunas, a solução lixivante é deixada percolar através dos sólidos colocados na coluna. A lixiviação em coluna é realizada em menor escala que a lixiviação por pilhas. Na realidade, só é levada a cabo para extração de cobre, este método está sendo usado em Chuquimata (Chile) desde 1993.

A dump leaching é semelhante à lixiviação por pilhas. Tipicamente pilhas de minerais de baixo teor ou estéril de mina poderiam ser tratadas por este método. A reação bacteriana pode ocorrer naturalmente, resultando na corrente de drenagem ácida.

A lixiviação in situ aproveita trincas naturais e fissuras do terreno ou induzidas pelo desmonte por explosivos sem que se proceda à remoção do minério (marginal). É principalmente utilizada para a extração de urânio em escala comercial.

2.2.1. Processo BIOX

O processo bacteriano comercializado pela Gencor (BIOX), comparado com a ustulação e a lixiviação sob pressão é relativamente simples e requer um nível muito mais baixo de habilidade operacional.

O processo compreende uma série de etapas. O mineral é britado e moído para liberar os minérios sulfetados da ganga. Estes são posteriormente flotados, produzindo um concentrado que contém acima de 90 % do ouro contido em aproximadamente 5 a 10 % da massa original. Este concentrado geralmente é remoído, alimentado a uma série de tanques agitados contendo a bactéria, configurados para prover ótimas taxas de biolixiviação. As variáveis principais controladas são: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e vazão de alimentação. O tempo médio de residência para a suspensão é de 4 dias (Aswegen, 1998).

A suspensão oxidada é lavada numa série de espessadores em contracorrente, a suspensão lavada é tratada numa usina convencional de cianetação na qual o ouro é finalmente recuperado. A solução dos espessadores é neutralizada e o arsênio dissolvido durante a oxidação é precipitado como arsenato férrico básico o qual é inerte e ambientalmente estável . O processo é contínuo (Ashanti Golfields 720 toneladas de concentrado por dia)

2.2.2. Processo Bactech

Outro processo para a liberação de ouro encapsulado dentro dos minérios refratários foi desenvolvido pela BacTech (Budden, 1993), usada comercialmente na Youanmi Mines (125 toneladas de concentrado por dia).

O método usa uma mistura de cepas bacterianas termofílicas (conhecidas como M4) primeiro encontrada na Austrália Ocidental, uma cultura diferente daquela usada no processo BIOX. A cultura Bactech é capaz de operar nas temperaturas ambientais do deserto australiano, a temperatura ótima é de 46 °C e também pode sobreviver a 55 °C por três dias. Ela tem a grande vantagem econômica de não precisar ser resfriada. Adicionalmente, outra vantagem da cultura usada pela Bactech sobre *Acidithiobacillus ferrooxidans* é que pode tolerar a água altamente salina.

O processo opera em condições ácidas, entre pH de 1,0 a 1,4, em reatores agitados. A suspensão tem aproximadamente 15 a 20% de sólidos. O sistema opera somente a temperaturas acima do ambiente, a 45 °C. A recuperação no reator está entre 93 e 95 %, com um tempo de residência de 3,5 dias.

2.2.3. Lixiviação em pilhas (Biolixiviação de Newmont)

Processo para recuperar ouro de material de sulfeto de baixo teor que não poderia ser considerado econômico. O mineral foi primeiramente inoculado com bactéria usando uma mistura de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* e colocado no bloco de biolixiviação. O processo de inoculação empregado adiciona a bactéria ao mineral por pulverização. A intenção é assegurar que uma população ativa de bactérias seja distribuída ao longo da massa inteira da pilha para a rápida iniciação do processo de bio-oxidação e assegurar a bio-oxidação homogênea dos sulfetos.

2.3. Bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria quimioautotrófica, que obtém sua energia da oxidação de íons ferrosos e compostos reduzidos de enxofre e pode usar o CO₂, para formar suas moléculas biológicas (Suzuki, 2001). Oxida principalmente todos os minerais sulfetados.

Ele é um microrganismo acidofílico (capaz de desenvolver-se em condições de elevada acidez). Desenvolve se numa faixa de pH de 1,5 até 4,5. O pH ótimo de crescimento esta entre 1,6 e 2,0. Surpreendentemente, enquanto cresce num ambiente ácido, seu pH citoplasmático está perto da neutralidade e o gradiente de pH através da membrana citoplasmática é um dos maiores de todos os organismos vivos (Amaro, 1991). Similarmente ele sobrevive numa faixa de temperaturas de 2 a 40 °C, mas a melhor faixa de crescimento está entre 30 e 40 °C.

Acidithiobacillus é uma bactéria autotrófica estrita, seu crescimento é inibido por muitas substâncias orgânicas e provavelmente pelos seus produtos de decomposição no meio. A presença de matéria orgânica influencia a atividade

metabólica e o crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans*, principalmente a adição de ácidos orgânicos como o formiato e o acetato, que inibem a oxidação do ferro (Frattini, 2000).

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma das principais bactérias acidofílicas usadas na lixiviação de sulfetos. Alguns outros microorganismos como as termófilas (*Sulfolobus*), podem oxidar minérios sulfetados a altas temperaturas, como 70°C (Cassa, 1985). Geralmente, estas bactérias operam em ambientes hostis de calor e acidez, de modo que a contaminação por outros microorganismos não acontece.

A natureza proveu a estas bactérias uma parede citoplásmica celular, que permite que sobrevivam no ambiente tóxico que elas criam.

2.3.1. Característica morfológicas

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* apresenta as seguintes características: é um organismo microscópico móvel com flagelo polar; de forma cilíndrica, apresenta-se sob a forma de pequenos bastonetes de 1,0 a 2,0 µm, e espessura na faixa de 0,3 a 0,5 µm. Gram-negativo; apresenta seu ponto isoelétrico com pH em torno de 4,0 a 5,0.

A tabela 1 esquematiza suas características principais.

Tabela 1. Características do *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Condição	Características
pH de crescimento	1,5-4,5
Faixa de temperatura	2-40°C
Temperatura ótima	30-40°C
Mobilidade	flagelada
Mol % G+C	56-59
Coloração Gram	gram-negativa
Formação de esporo	nenhuma
Forma	cilíndrica 0,5-1,0 µm
Classificação	quimioautotrófico*
Fonte de energia	oxidação de Fe ²⁺ e enxofre reduzido**
Aceptor de elétron	oxigênio*
Fonte de nitrogênio	Sais de amônio, nitrato, fixa dinitrogênio
Requerimentos de oxigênio	aeróbio*

**Acidithiobacillus ferrooxidans* geralmente é aeróbio obrigatório, mas debaixo de condições anaeróbias, pode crescer sobre o enxofre elementar usando ferro férrico como receptor de elétron. Estes resultados indicam que o *T. ferrooxidans* pode ser considerado um anaeróbio facultativo que tem um papel importante nos ciclos de ferro e enxofre em condições ácidas. A capacidade do *T. ferrooxidans* para crescer em ambientes deficientes de oxigênio pode ter implicações importantes em processos de biolixiviação onde condições anaeróbias podem ser frequentes.

** *Acidithiobacillus ferrooxidans* também pode obter energia da oxidação do Cu e Se²⁻ e da oxidação de tetrionato, hidrogênio molecular, ácido fórmico, compostos de antimônio.

urânio e molibdênio. O *Acidithiobacillus ferrooxidans* é um organismo autotrófico, cresce em ambientes ácidos utilizando a energia necessária da oxidação do íon ferroso, dos sulfetos solúveis e insolúveis dos compostos de enxofre tais como tiosulfatos e tetrationsatos, produzindo soluções de H_2SO_4 e sulfato férrico. Tais reações produzem uma importante fonte de energia e nutrientes para seu crescimento.

A composição química do *Acidithiobacillus ferrooxidans* é: 44% de proteína, 26% de lipídios, 15 % de carboidratos, 10 % de sais minerais.

2.3.2. Características gerais

Normalmente o *Acidithiobacillus ferrooxidans* encontra-se isolado ou em pares, raramente em cadeias curtas. O crescimento em meio líquido com íon ferroso manifesta-se por uma mudança de cor verde claro ao pardo vermelho, devido à produção de íon férrico. O pH inicial ótimo para a oxidação bacteriana do sulfato ferroso encontra-se no intervalo 1,6 a 2,0 e de forma geral foi estabelecido que a bactéria inibe sua atividade em pH inferior 1,5 ou precisa de períodos de adaptação muito longos. Em pH acima de 2,0 forma-se um filme composto de hidróxido férrico e bactérias (Lundgren, 1980).

Acidithiobacillus ferrooxidans propaga-se em poucas horas, por divisão em duas partes idênticas. Estas crescerão em tamanho e novamente dividir-se-ão e assim por diante, a uma taxa exponencial. Tipicamente, num sistema de trabalho a população bacteriana alcança valores de 10^9 a 10^{10} por ml de suspensão. Entretanto, mesmo a esta densidade elevada não há evidência visível a olho nu de sua presença.

A população bacteriana, ao crescer, atravessa uma fase de latência, uma fase de crescimento logarítmica, uma fase estacionária e uma fase de morte ou decréscimo das células. Quando a célula reproduz-se atinge quase o dobro do tamanho de uma célula simples e divide-se por divisão binária. O tempo de geração do *Acidithiobacillus ferrooxidans* é de 10 a 25 h, quando esta bactéria cresce sobre enxofre elementar e de 5 a 7 horas sobre meio ferroso (Oliver, 1988). Na morte, a célula é hidrolizada e quebrada devido à influência do meio ambiente.

Os *Acidithiobacillus ferrooxidans* crescem em condições autotróficas, obtendo todo o carbono necessário para o processo de biossíntese a partir de CO₂, fixando a energia obtida nos processos de oxidação acima citados na forma de ATP, o qual é universalmente reconhecido como a forma de energia metabólica empregada pela bactéria, para fazer o trabalho de transporte de matéria (substrato e nutrientes são introduzidos no interior da célula e os produtos finais são eliminados), o trabalho mecânico de vibração, locomoção e o trabalho de biossíntese do material celular. Nestes processos, o ATP hidroliza-se para formar ADP, energia e fosfato inorgânico, que volta a se formar no ATP através da fosforilização oxidativa com a energia liberada nos processos de oxidação de Fe II e das formas reduzidas de enxofre (Nemati, 1998).

Durante a oxidação aeróbica de compostos reduzidos de enxofre, vários metal-proteínas estão implicados nesta cadeia respiratória e são proteínas ácido-estáveis que exibem altos potenciais redox. Um caminho da transferência dos elétrons entre a oxidação do ferro e o citocromo oxidase foi proposto baseado nos estudos da interação entre estas proteínas periplasmáticas da transferência dos elétrons.

Durante a lixiviação bacteriana se produz a ligação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com a pirita ou enxofre por meio das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (lipopolissacarídeos). A ligação primária da pirita em pH 2 é intermediada pelo exopolímero-complexado de Fe III numa interação eletroquímica com a carga negativa da superfície da pirita. EPS de células crescidas em enxofre possuem propriedades hidrofóbicas acentuadas e não se ligam à pirita, indicando aumento da especificidade (adaptabilidade) ao substrato (Gehrke, 1998).

Parece haver evidência de que o *Acidithiobacillus* forma uma cápsula quando se liga à superfície de pirita por meio do filme secretado (Rojas Chapana, 1996), partículas coloidais de sulfeto são formadas e armazenadas durante a corrosão da pirita. Recentes estudos têm mostrado que se pode aumentar a dissolução de íons metálicos pela modificação da superfície mineral por meio de agentes ativos de superfície ou pela adição de aminoácidos, principalmente aqueles que têm grupos sulfídricos (Rojas Chapana, 2000).

Várias observações experimentais associadas com o metabolismo do *Acidithiobacillus ferrooxidans*, como a formação de intermediários coloidais de enxofre e a evidência de que os sulfetos metálicos coloidais são solúveis em soluções de aminoácidos e que estes polipeptídios contêm resíduos SH, que reagem espontaneamente com a pirita, sugerem que os grupos bioquímicos de tiol estão envolvidos na lixiviação de sulfetos pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Isto parece ser confirmado pelas observações experimentais, onde a presença de pequenas quantidades do aminoácido cisteína no meio de lixiviação para pirita aumenta a atividade de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e a velocidade de lixiviação (Rojas Chapana, 2000).

Na ausência de bactéria, a cisteína pode oxidar a pirita em níveis semelhantes aos processos normais de lixiviação. Por outro lado parece ser que os grupos sulfídricos de cisteína participam no processo ativo de ligação da pirita, com a formação de enlaces dissulfetos. Esta reação tiol-dissulfeto significa que a cisteína é consumida pela superfície da pirita com a subsequente liberação de espécies de ferro e enxofre. Provavelmente a bactéria poderia levar vantagem deste fenômeno para absorver e oxidar as espécies liberadas.

Acidithiobacillus ferrooxidans encontra-se comumente nas águas ácidas de minas e nos rejeitos minerais numa variedade de condições ambientais. Estes microorganismos são facilmente isolados nas águas de minas.

Os meios de cultura empregados para o *Acidithiobacillus ferrooxidans* são compostos, principalmente, por sais inorgânicos que fornecem o N, P, K, como nutrientes, além de Mg, Ca, e outros elementos de traço (Spencer, 2000). A fonte de energia pode ser o Fe II ou uma das formas reduzidas do enxofre, desde sulfetos até tiosulfatos.

O nitrogênio amoniacal é a fonte mais adequada de nitrogênio para o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Em ausência de qualquer adição de compostos nitrogenados, o desenvolvimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* diminui, mas não cessa.

O nutriente fósforo é essencial como constituinte dos nucleotídios e seus derivados: fosfolípidios, de algumas enzimas no metabolismo energético. A fixação

de CO₂, o crescimento a assimilação e a oxidação de diversas fontes de energia ocorrem em extensão muito limitada se o fornecimento de fosfato for deficiente. Por outro lado, os fosfatos podem ser inibidores na oxidação de alguns substratos, especialmente sulfetos metálicos. Este efeito, supõe-se, que é devido às reações de precipitação entre os ânions fosfato e o substrato. Esta influência do fosfato é limitada pela acidez do meio, pois em pH 1,8 a precipitação não ocorrerá (Karavaiko, 1977).

O ânion sulfato, além de constituir a única fonte de enxofre para a biossíntese do *Acidithiobacillus ferrooxidans*, participa de maneira importante em várias funções enzimáticas, e foi demonstrada a necessidade de sulfato na biossíntese de aminoácidos. Também foi sugerido que o íon sulfato atuasse na oxidação do Fe II.

O magnésio é um elemento de traço necessário para a atividade de algumas enzimas no *Acidithiobacillus ferrooxidans*, em quantidade 1000 vezes menor que na do sulfato.

Frenay (1985), na sua revisão bibliográfica encontrou os seguintes valores máximos de tolerância pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* para diferentes cátions metálicos: Fe (160g/L), Zn (119 gr/L), Ni (72 g/L) Cu (55 g/L), Mn (33 g/L), Co (30 g/L), As (17 g/L), U₂O₃ (12 g/L), Al (10 g/L), Mo (2,9 g/L), Cr (0,8 g/L), Hg (0,1 g/L), Ag (0,05 g/L).

Os ânions de arsenieto, seleneto e telureto são tóxicos em concentrações de 50 a 100 mg/L e o molibdênio como molibdato é tóxico na concentração de 5 mg/L. Os ânions cloreto e nitrato inibem o *Acidithiobacillus* em concentrações de 6 e 2 g/L, respectivamente. Os fluoretos e cianetos, na concentração de 25×10^{-5} M, inibem totalmente oxidação do Fe II.

2.3.3. Importância

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria importante nas operações industriais da biohidrometalurgia. É usualmente dominante na população bacteriana mista que é usada nos processos de lixiviação para a extração de metais como cobre e urânio de seus minérios. Recentemente, estes consórcios bacterianos passaram a ser

usados para a bio-oxidação de minerais arsenopiríticos de ouro refratário, antes da recuperação de ouro por cianetação. Durante o processo de bio-oxidação de concentrado de minerais sulfetados que contêm ouro, ocorre a solubilização do ferro, arsênico e enxofre.

O uso comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* tem aumentado o interesse pela genética e biologia molecular da bactéria. Os estudos mais recentes têm focalizado a genética molecular das vias associadas com o metabolismo do nitrogênio, carbono, fixação de dióxido e componentes dos mecanismos produtores de energia (Rawlings, 1994).

A oxidação biológica de espécies inorgânicas sulfetadas pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* tem mostrado ser uma etapa significativa na biolixiviação de sulfetos minerais e no controle (ou tratamento) da drenagem ácida. As mesmas bioreações também têm aplicações benéficas na dessulfuração de carvões e na remoção de sulfeto de hidrogênio dos efluentes gasosos.

O sulfeto de hidrogênio é um componente indesejável no gás natural, biogás e nas correntes de gás. Sua remoção é requerida por razões de saúde, segurança e risco de corrosão dos metais durante o transporte e distribuição. Os tratamentos convencionais são de alto custo comparados com os tratamentos microbiológicos. Estes operam à temperatura ambiente e não têm necessidade de calor, eliminando os custos com energia e de reações catalíticas que incrementam o custo de operação.

A contaminação da água por atividades relacionadas à mineração origina-se principalmente da oxidação de sulfetos em solos minerais, rejeitos minerais, minerais, e reservas do carbono, etc. Os sulfetos são oxidados por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a ácido sulfúrico que lixívia as toxinas dissolvíveis incluindo os metais pesados dos solos. Este efluente ácido carregado de metais, chama-se drenagem ácida, destrói a vida vegetal e a vida aquática nas águas superficiais e contamina aquíferos subterrâneos. É um problema ambiental mundial importante da mineração.

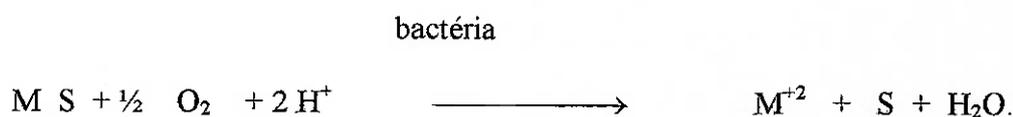
De forma semelhante, os tratamentos para controlar a drenagem ácida de minas e depósitos de rejeitos de minérios sulfetados não têm tido muito êxito. Os esforços estão encaminhados para a remoção de poluentes. O processo de tratamento para ferro ferroso contido na drenagem ácida requer a oxidação e a subsequente

precipitação. Entre os diferentes processos empregados para o tratamento da oxidação de drenagem ácida, a utilização de *Acidithiobacillus ferrooxidans* tem mostrado ser o mais eficiente. Ele trabalha em consórcio de outros microorganismos, algas, fungos e plantas nos pântanos construídos para purificar a drenagem ácida antes de ser liberada ao meio ambiente (Wildeman e Laudon, 1989).

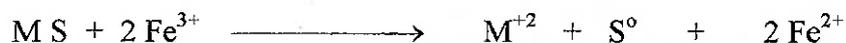
2.4. Mecanismo de lixiviação

A lixiviação microbiana de minerais sulfetados implica na oxidação do ferro e enxofre. *Acidithiobacillus ferrooxidans* pode usar íon ferroso ($2 \text{Fe}^{2+} + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$) ou enxofre ($\text{S}^0 + 1 \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$) como fonte de energia (Espejo et al., 1987; Susuki, 2001). Por outro lado, os microorganismos tiram vantagem de qualquer princípio físico-químico que favoreça o seu crescimento (Susuki, 2001). Assim, na lixiviação bacteriana, desempenham um papel importante a lixiviação direta e a indireta, como as reações físico-químicas que fortalecem a ação dos microorganismos (Susuki, 2001).

Os mecanismos de bio-oxidação (direto e indireto) são importantes para descrever a solubilização do sulfeto mineral (Harvey et al., 1997), sendo que ambos podem operar simultaneamente, de forma complementar. Pelo mecanismo direto, a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* adere-se tenazmente à superfície mineral, promovendo a bio-oxidação. As bactérias aderidas à superfície do minério tendem a mudar o potencial de oxidação da superfície, e despolarizam-na pela oxidação de S e de Fe (Taxiarchou et al., 1994, Devasia et al., 1993):



Na segunda, o ferro desempenha um papel importante nas reações de lixiviação, pois a solução ácida de íon férrico é um agente eficiente de lixiviação de metais. Esta etapa poderia ser representada pela lixiviação química de minérios por íons férricos seguida da oxidação bacteriana dos íons ferrosos formados:



bactéria



De forma semelhante, a oxidação bacteriana da pirita, pirrotita e arsenopirita pode proceder diretamente ou indiretamente (Taxiarchou, 1994; Ubaldini, 1997 e 2000). Os mecanismos diretos incluem catálises das reações da oxidação pela ação bacteriana direta e por conseguinte exigem o contato físico entre as bactérias e a superfície de partícula de sulfeto em condições aeróbicas; os mecanismos indiretos incluem a oxidação dos sulfetos, principalmente pela ação do íon férrico bacteriano produzidas na solução.

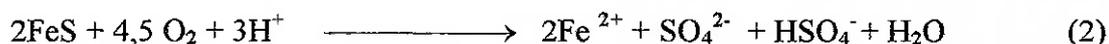
O mecanismo de biolixiviação de pirita, pirrotita e arsenopirita pode ser resumido como segue:

Mecanismo direto:

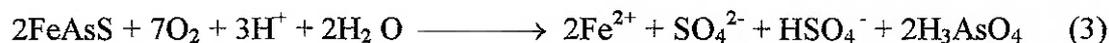
bactéria



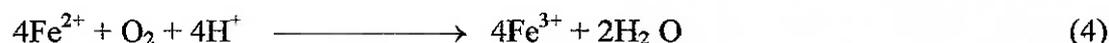
bactéria



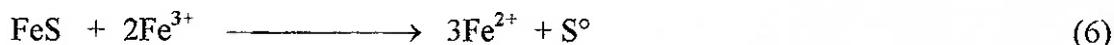
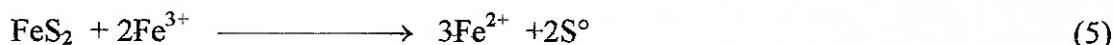
bactéria



bactéria



Mecanismo indireto:

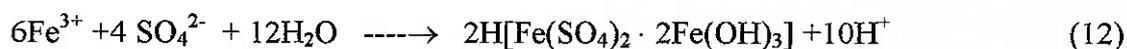
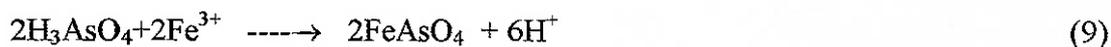


O sulfeto ferroso é re-oxidado pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Eq. 4) e regenera mais sulfato férrico para lixiviação química adicional de sulfeto, enquanto o enxofre metálico é oxidado adicionalmente por *Acidithiobacillus*:

bactéria



Simultaneamente, reações secundárias de precipitação podem ocorrer (dependendo do pH e composição da solução), levando à formação de arsenieto férrico, hidróxido férrico, sulfeto férrico básico e jarositas:



A contribuição de cada mecanismo de lixiviação depende das características do minério e das condições de operação (Konishi et al., 1991). A interação entre a

célula e a superfície mineral mostra-se dependente de vários parâmetros físicos e bioquímicos.

A ligação de bactérias para cada mineral de sulfeto depende do tipo de substrato de crescimento, concentração de substrato e características do mineral (Claassen, 1993). Este processo de adesão também depende das propriedades bioquímicas do microrganismo e das condições de crescimento. Assim os microorganismos podem aumentar a velocidade de lixiviação de metais devido a processos físico-químicos, principalmente às interações galvânicas entre minerais.

A regulação dos sistemas de oxidação de ferro e enxofre poderia ser importante para entender quando os mecanismos de lixiviação poderiam ter natureza indutível ou constitutiva. O crescimento sobre íon ferroso induz à síntese de rusticiania (Cox and Boxer, 1986), enquanto, o crescimento sobre enxofre induz à síntese da proteína ligante de enxofre sobre a flagella (Ohmura et al., 1996). Por outro lado a composição da proteína da superfície bacteriana muda de acordo com o substrato de cultura (Ohmura et al., 1996). Alguns componentes da membrana externa, como as proteínas, poderiam ter um papel importante na adesão e na oxidação do sulfeto mineral.

Por outro lado, a adaptação é uma parte crucial da conduta metabólica, na qual a bactéria não somente é capaz de reconhecer uma nova fonte de substrato, mas também responde às mudanças da concentração do meio. A adaptação desempenha papel importante durante a resposta a várias condições estressantes (elevada concentração de substratos, substâncias tóxicas e carência de nutrientes essenciais).

2.4.1. Aspectos físico-químicos da ação bacteriana

Um número de parâmetros físicos e bioquímicos afeta a capacidade da bactéria para oxidar substrato ferroso ou algum outro substrato e incluem pH, Eh, temperatura, adaptação, toxicidade dos metais, concentração de substrato, interações galvânicas e estrutura química dos minerais.

2.4.1.1. pH

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* é capaz de crescer em ambiente ácido, onde o pH varia entre 1,5 e 4,5, tendo como fonte de energia o ferro ferroso. Entretanto Tuovinen (1986) encontrou fases lag de vários meses antes que atividade fosse expressada a um pH tão baixo como 1,3.

Recentemente foram estudados os efeitos do pH no crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Valores na faixa de pH de 1,5 a 4,5 não influenciam o crescimento bacteriano, mas valores de pH menores que 1,5 ou maiores que 4,5, afetam negativamente o crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Smith (1988) e Pesic (1996), onde a atividade do *Acidithiobacillus* foi independente do pH no intervalo de 1,9 a 2,4. Valores de pH próximos a 1,0 e 4,5 inibem fortemente o crescimento.

Como acidófilo, a resistência ao pH tem sido buscada nas peculiaridades estruturais e composicionais da parede celular ou da membrana citoplasmática. O *Acidithiobacillus* contém grandes quantidades de ácidos graxos de ciclopropano. Tem sido sugerido que estes constituintes estão dentro das funções da permeabilidade da membrana celular (Padan, 1984; Cox, 1979).

Acidithiobacillus ferrooxidans tem marcada capacidade para adaptar-se às diferentes condições ambientais e produzir espontaneamente variantes fenotípicas. Estudos recentes de genética sugerem que isto é devido à transposição de seqüências móveis de DNA (Shafia, 1988). Alguns dos componentes da superfície deste microrganismo estão provavelmente envolvidos na adaptação a seu ambiente ácido e as interações de bactéria -mineral (Guiliani, 2000).

2.4.1.2. Adaptação bacteriana

A adaptação de microrganismos aos substratos minerais incrementa significativamente a velocidade da atividade bacteriana. O cultivo sucessivo com doses crescentes de minério pode aumentar a velocidade de oxidação de sulfeto (Attia, 1989, Modak, 1995). A adaptação da bactéria a doses crescentes de minério aumenta a tolerância às concentrações maiores dos metais sulfetados solúveis

formados durante a biolixiviação.

O mecanismo responsável pelo desenvolvimento da tolerância de metais no *Acidithiobacillus ferrooxidans* ainda não é bem conhecido. É possível que a bactéria não adaptada contenha uma pequena fração de células tolerantes aos metais tóxicos. Estas células tolerantes, pelo cultivo repetitivo na presença de substâncias metálicas poderiam ser selecionadas sobre as outras células. Eventualmente, a população inteira torna-se tolerante e se seleciona acima das outras células. Mas, após as células terem desenvolvido sua tolerância ao metal, deveriam reter sua capacidade na ausência do concentrado durante a sua preservação. Contrariamente a esta hipótese, a literatura menciona que as células adaptadas, em ausência do meio tóxico, perdem sua capacidade para tolerar as substâncias (Modak, 1995). Outra possibilidade é que todas as células de uma população poderiam tolerar elevadas concentrações de sulfeto mineral e oxidar compostos sulfetados, somente depois de um arranjo estrutural do material celular associado com a membrana citoplasmática.

Tem sido reportado que, durante o estudo de usinas pilotos de biolixiviação de ouro tem-se uma considerável diminuição no tempo de residência e um aumento da densidade de polpa, que poderia ser atingido em um período de três a quatro anos. Um dos fatores que poderia contribuir a tal melhoramento é a contínua adaptação de bactéria. É essencial que as bactérias adaptadas, durante seu armazenamento, sejam mantidas sob condições estressantes na presença de sulfetos minerais para assim reter a tolerância adquirida (Modak, 1995).

Os padrões de oxidação do ferro variam com cada espécie isolada, quando são preservadas sobre substratos específicos. O rápido crescimento das culturas crescidas sobre substrato de ferro, mostra períodos curtos de oxidação ferrosa quando comparado com células preservadas sobre concentrados polimetálicos (Menon, 1996).

Usualmente os experimentos de lixiviação com bactéria são executados em meio com excesso de substrato, que não permite uma estimativa da resposta metabólica pelas células. Adaptação é uma parte crucial da resposta metabólica, em que a bactéria não somente é capacitada para reconhecer um novo substrato de

energia, mas também responde as mudanças na concentração. Isto prova o papel crucial da adaptação na resposta aos sinais químicos (Rojas-Chapana, 1998).

2.4.1.3. Indução repressão de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A oxidação de enxofre pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* resulta na expressão de algumas proteínas da membrana externa (OMPs), a níveis mais elevados que os observados durante a oxidação do ferro. Sua alta expressão em substratos de enxofre sugere um papel importante na oxidação de mineral sulfeto (Buonfiglio, 1999). Foi demonstrado recentemente que a proteína localizada no flagelo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* está envolvida na ligação do microrganismo ao enxofre elementar (Ohmura et al., 1996).

A adição de enxofre ao *Acidithiobacillus ferrooxidans* crescido em ferro resultou numa rápida inibição da velocidade de síntese de proteína e de síntese de RNA. A síntese de DNA, fixação do dióxido de carbono e taxa de oxidação ferrosa a curto prazo das bactérias crescidas sobre íons ferroso não foram afetadas pela adição de enxofre, indicando que a adição de enxofre não perturba a energia celular do metabolismo geral (Oliver, 1988).

Por outro lado, a composição da proteína da superfície bacteriana muda de acordo com o substrato de cultura. Células crescidas em enxofre mostram maior adesão ao enxofre do que as células crescidas em ferro, devido à sintetização de uma proteína de superfície de 40-kDa que não foi sintetizada pelas células crescidas em ferro. A proteína 40-kDa tem grupos tiol que formam um enlace dissulfeto com o enxofre elementar mediante forte adesão entre células de *T. ferrooxidans* e o enxofre elementar. A 40-kDa proteína foi localizada sobre o flagelo. A localização da proteína deveria tornar possível as células estarem em contato mais íntimo com a superfície do enxofre elementar (Ohmura, 1996).

Acidithiobacillus ferrooxidans crescido em enxofre ou em mineral sulfeto mostra elevadas atividades oxidativas de enxofre (Suzuki et al., 1990), provavelmente semelhantes ao sistema oxidante do enxofre do *Acidithiobacillus thiooxidans* que usa o O₂ para a oxidação de enxofre (Suzuki, 1999). Contrariamente, as atividades oxidativas do ferro são minimizadas.

A exposição de *Acidithiobacillus ferrooxidans* à presença de altas concentrações de cobre resulta em modificações da superfície química do microorganismo (Das,1997). O ponto isoelétrico da cepa adaptada foi mais alto que o da cepa nativa não adaptada e mostrou-se mais hidrofóbica. A capacidade de adsorção de cobre mostra ser mais elevada.

Estas observações sugerem a presença de um novo componente de superfície celular, que é sintetizado pela cepa adaptada pelas modificações da superfície celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dando células tolerantes ao cobre.

De forma semelhante, os experimentos de respiração demonstraram que a absorção de oxigênio pela cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR não foi inibida na presença de 200 mM cobre. Células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* tratadas e não tratadas com cobre na presença de cádmio, cobre, níquel e zinco mostram mudanças nos padrões da síntese total de proteínas. Também foram detectadas indução/repressão de proteínas no citosólico e nas frações da membrana celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR (Novo, 2000).

2.4.1.4. Interações galvânicas e estrutura química dos minerais

Quando ocorrer a presença de mais de um sulfeto, com potenciais de eletrodos diferentes, o contato entre eles pode gerar pares galvânicos, provocando a dissolução acelerada do que apresentar menor potencial

Na interação, o mineral com elevado potencial elétrico se converte em cátodo e corrói (oxida) o mineral com baixo potencial que se converte em anodo (Ahonen et al., 1986; Berry e Murr, 1978; Fossi, 1990; Karavaiko, 1985).

Um exemplo do par galvânico é a lixiviação acelerada de cobre da calcopirita em contato com a pirita. A pirita com um potencial mais elevado, atua como catodo e a calcopirita com um potencial mais baixo se converte num anodo que se dissolve. A pirita também pode corroer a esfalerita (ZnS), que tem um potencial mais baixo. O efeito estimulante da pirita na lixiviação de cobre da calcopirita ou na lixiviação de zinco da esfalerita pode-se demonstrar em experimentos de misturas minerais

pulverizadas com ou sem *Acidithiobacillus ferrooxidans* ou *Acidithiobacillus thiooxidans* (Ahonen et al., 1986; Lizama e Suzuki, 1991).

O mineral com potencial inferior sempre tem o grau mais elevado de colonização microbiana e de desgaste. Assim, o efeito físico-químico (neste caso, efeito galvânico) é utilizado ao máximo pelas bactérias.

A oxidação dos sulfetos é catalisada por um número de enzimas, as quais incluem: rusticianina, Fe II citocromo c 552 oxireductase, citocromo c 552 e citocromo a.

Rusticianina (Rus), proteína periplásmica de cobre azul, geralmente é considerada ser um componente importante na oxidação do ferro desde que ele esteja presente em concentrações altas (acima de 5% do total de proteínas solúveis) quando *T. ferrooxidans* é crescido sobre ferro enquanto que apenas é detectável em células crescidas em enxofre (Cox, 1986; Espejo, 1988). Crê-se que desempenha um papel importante na oxidação de ferro por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Ela é sintetizada nas condições do crescimento do íon ferroso mas também no enxofre, sugerindo que pode desempenhar um papel importante em ambos metabolismos energéticos (Blake, 2001).

Geralmente é aceito que as bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidam ferro e aumentam a lixiviação de calcopirita. Entretanto, as bactérias suprimem a lixiviação da calcopirita quando sulfato ferroso é adicionado (Hiroyoshi, 1999). Isto é devido ao consumo de íons ferrosos pela bactéria os quais atuam como promotores para a oxidação de calcopirita com oxigênio dissolvido. Co-precipitação de íons cúprico com jarosita formada por oxidação bacteriana do íon ferroso também causa a supressão bacteriana da extração do cobre.

2.4.1.5. Toxicidade de metais e dos reagentes de flotação

Outro aspecto importante da biolixiviação poderia ser a presença ou a dissolução do acúmulo de elementos tóxicos que poderiam influenciar a atividade do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Estes metais pesados poderiam atingir níveis elevados que poderiam desativar ou matar a célula e parar a biolixiviação.

No processo de biolixiviação de minerais refratários de ouro, tem-se a presença de arsênio, que se apresenta em duas formas diferentes AsIII e As V dentro do licor de biolixiviação (Spencer, 2000). De forma semelhante, o crescimento inicial pode ser inibido pela presença de íons metálicos pesados de Cd .

O efeito tóxico do arsênio sobre os seres vivos é bem conhecido. Acredita-se que o As III inativa as enzimas que representam um papel chave no metabolismo microbiano. O As V é menos tóxico que o As III mas sua ação interfere com a fosforilização oxidativa, o que conduz a uma perda de energia na bactéria . Por isto é necessário o desenvolvimento de uma cepa tolerante á presença dos metais tóxicos contidos no minério.

A oxidação de ferro ferroso ou enxofre por *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi seletivamente inibida ou controlada por vários ânions inibidores. A oxidação do ferro foi mais sensível do que a oxidação do enxofre à inibição por cloreto, fosfato, e nitrato em baixas concentrações (abaixo de 0,1 M) e também há inibição por azida e cianeto. A oxidação do enxofre foi mais sensível que a do ferro ao efeito inibitório da alta pressão osmótica. Estas diferenças foram evidentes não somente entre a oxidação do ferro pelas células crescidas em ferro e oxidação de enxofre por células crescidas em enxofre, mas também entre a atividade oxidativa para ferro e enxofre das mesmas células crescidas em ferro. Os experimentos de crescimento com ferro ferroso ou enxofre assim como o substrato oxidável confirmam a alta sensibilidade da oxidação do ferro para a inibição por fosfato, cloreto, azida, cianeto e oxidação do enxofre (Harahuc, 2000).

Os xantatos são compostos orgânicos que produzem efeitos inibitórios sobre o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Estes reagentes são usados no processo de flotação para a recuperação dos minerais sulfetados que se encontram escassamente disseminados no minério. Neste processo os sulfetos adsorvem os xantatos tornando-se hidrofóbicos. As partículas hidrofobizadas aderem às bolhas de ar e são concentradas na interface ar-água. Estes minerais concentrados por flotação, se usados para a lixiviação bacteriana, devem ser lavados por solventes para evitar a toxicidade dos xantatos residuais sobre os microrganismos.

Os concentrados de flotação precisam ser lavados com álcool fervente ou água quente (temperatura > 80 °C). Moagem adicional é também efetiva expondo superfícies frescas de sulfeto. Loon e Madgwick (1995) reportam que a decomposição dos xantatos pelos ácidos poderia ser usada para melhorar a lixiviação bacteriana de minerais de arsenopirita concentrados com isopropil xantato de sódio. Observações posteriores mostraram que a remoção destrutiva de xantato permite aumentar a carga mineral (densidade de polpa) nos processos e também melhora a absorção de oxigênio e o crescimento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* nos bioreatores.

A inibição da velocidade de oxidação ferro ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans* com íons férricos mostra-se dependente da concentração, da temperatura do meio e do meio de crescimento (Kovalenko et al. 1982).

A oxidação do ferro ferroso foi inibida na presença de íons férricos em concentrações baixas (1,0 g/l) e altas (10 g/l). A bactéria foi menos sensível às concentrações desfavoráveis de Fe³⁺ entre 8-26 °C durante a fase lag; a oxidação de Fe²⁺ foi inibida durante a fase exponencial de crescimento somente a 26 °C. Por isso, a afinidade da enzima para o inibidor Fe³⁺ decresce com a queda da temperatura.

2.5. Planejamento experimental

O Planejamento experimental é o processo de planejar um experimento ou uma série de experimentos, nos quais se introduzem mudanças deliberadas nas variáveis de entrada do processo ou sistema, para identificar as variáveis que têm maior influência na resposta de saída (Montgomery, 1996). Estes dados devem ser analisados mediante métodos estatísticos, com o objeto de produzir conclusões válidas e objetivas.

A metodologia estatística dá um enfoque objetivo para a análise do problema, que inclui a coleta de dados sujeitos a erros experimentais. Usando o controle estatístico, os pesquisadores desenvolvem modelos matemáticos que predizem os resultados a partir das variáveis de entrada.

2.5.1. Princípios básicos

Um experimento é um sistema composto de variáveis independentes (fatores de entrada) e variáveis dependentes (respostas de saída). Quando projetamos um experimento, controlamos e mudamos sistematicamente os valores ou as fixações de vários fatores, e medimos e analisamos os efeitos destas mudanças nas respostas.

O objetivo do experimento é entender e prognosticar como mudanças controladas nas variáveis da entrada afetam a resposta obtida ou respostas numa certa faixa experimental.

Os três princípios básicos no projeto de experimentos são: replicação, aleatorização e análise por blocos.

A replicação se refere à repetição dos experimentos básicos. Este conceito tem duas propriedades importantes. A primeira, permite ao experimentador estimar o erro experimental. Tal estimação se converte na unidade básica para determinar se as diferenças observadas nas respostas são estatisticamente significativas. A segunda, permite ao experimentador calcular uma estimação mais precisa do efeito de um fator no experimento, usando a média amostral.

A aleatorização é o fato de que tanto a codificação do material experimental como a ordem em que se realizam as provas individuais ou testes são aleatoriamente definidas, ajudando a "cancelar" os efeitos de fatores estranhos que possam estar presentes.

A análise por blocos é uma técnica que se usa para incrementar a precisão do experimento. Um bloco é uma porção do material experimental, mais homogênea que o total do material. Ao realizar a análise por blocos, fazem-se comparações entre as condições de interesse do experimentos dentro de cada bloco.

Estes princípios básicos de planejamento experimental são uma parte decisiva de todo o experimento.

2.5.2. Classes de projetos:

Dependendo dos objetivos particulares, se têm três tipos.

a. Projeto de seleção

Usam-se para definir quais variáveis de um sistema são significativas. O projeto proporciona só uma quantidade limitada de informação sobre as variáveis individuais num dado sistema. Mas, ao mesmo tempo, requer um número mínimo de testes para um número dado de variáveis.

Os experimentadores usam um projeto de seleção para identificar as variáveis que poderiam afetar a sensibilidade e a seletividade; este tipo de projeto possibilita eliminar variáveis que não têm efeitos significativos.

b. Projeto fatorial

Estes projetos são usados para poucas variáveis (normalmente de três a seis), ajudam a entender como as variáveis interagem reciprocamente para influenciar as respostas e ajudam na quantificações de tais relações.

Os projetos fatoriais incluem ensaios para todas as combinações possíveis, para níveis alto e baixo das variáveis a serem estudadas.

c. Projeto de superfície de respostas

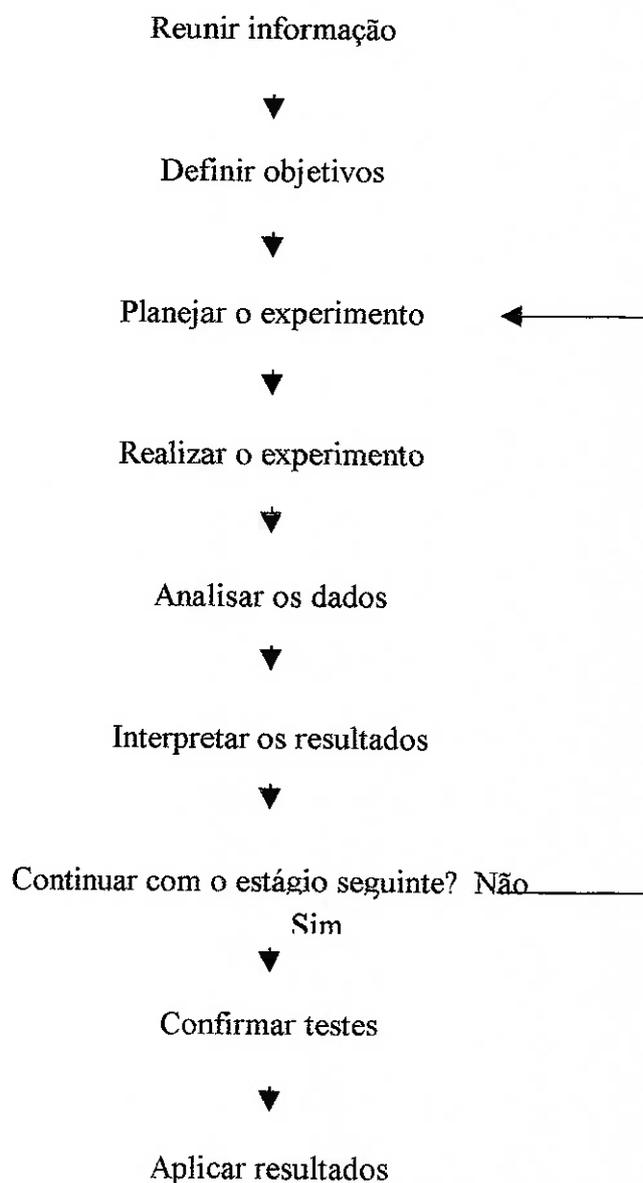
Estes são similares aos projetos fatoriais e possibilitam determinar os efeitos dos fatores e a interação dos mesmos para um número pequeno de variáveis. Entretanto, o projeto fatorial assume que o aumento ou decréscimo dos valores das variáveis de entrada, afeta linearmente as respostas. Em contraste a superfície de resposta mede os efeitos da curvatura das variáveis de entrada. Este projeto deve ter pelo menos três níveis para cada variável independente. Assim, a superfície de resposta necessita mais ensaios que os projetos fatoriais.

Na prática, uma pesquisa pode usar um enfoque seqüencial. Primeiramente, pode-se executar um projeto fatorial, com estimações baixas e altas para cada variável de entrada, com a medida da resposta num ponto central. Em seqüência, se a

curvatura parece estar presente os experimentadores poderão adicionar testes para a parte do ponto central para medir sua curvatura.

A superfície de resposta permite definir os modelos empíricos (polinômios normalmente quadráticos) e descrever como as respostas se comportam em todos os valores ou o ajuste das variáveis numa faixa experimental. A informação da resposta gerada por estes modelos ajuda a visualizar o comportamento das variáveis.

2.5.3. Esquema do planejamento experimental



2.6. Bioreatores

Os bioreatores são sistemas em que são efetuadas conversões biológicas enzimáticas ou microbianas. Os bioreatores incluem recipientes mecânicos em que (a) os organismos são cultivados de maneira controlada e/ou (b) os materiais são convertidos ou transformados através das reações específicas catalisadas pelos microorganismos.

Os bioreatores são semelhantes aos reatores químicos convencionais (Chisti, 1989), diferem na sua configuração porque estão projetados com uma série de características particulares para influenciar as rotas metabólicas mediante o controle de alguns parâmetros críticos (temperatura, pH, alimentação, oxigenação, etc).

2.6.1. Tipos de bioreatores

Existe uma grande variedade de configurações possíveis na construção de reatores para uso em laboratório e industrial, que depende das aplicações biotecnológicas (Facciotti, 1997). O projeto envolve várias considerações particulares, como a cinética da reação, os fenômenos de transporte (transferência de massa e de calor), algumas considerações estruturais e operacionais (Chisti, 1989).

Os modelos dos reatores químicos tradicionais projetados que podem ser usados para o bioreações são:

- Reatores agitados mecanicamente
 - Bioreator de tanque agitado (STR: *stirred tank reactor*)
- Reatores agitados pneumaticamente
 - Reatores *airlift*
 - Coluna de bolhas (*bubble column*)

2.6.2. Bioreator de tanque agitado (figura 1)

O tipo mais comum de bioreator aeróbico usado é o reator de tanque agitado, o qual pode ter configuração interna específica, projetada para fornecer um padrão específico de circulação (Asenjo, 1995).

A capacidade destes reatores é bastante variável. Para experiências de laboratório com volumes menores o recipiente de mistura é feito tipicamente de vidro. Para aplicações industriais que envolvem volumes maiores, o padrão da construção do tanque é de aço inoxidável. A relação altura-diâmetro do recipiente pode variar, dependendo das exigências da remoção do calor.

Os princípios de operação do bioreator tanque agitado são relativamente simples. Como mostra a figura 1, o meio estéril e o inóculo são introduzidos num tanque esterilizado e o suprimento de ar entra tipicamente pelo fundo. Para mistura ótima, as características do tanque não somente contém um sistema de agitação mas também de defletores, que ajudam impedir um efeito de vórtice, que poderia impedir a mistura apropriada. O número dos defletores varia tipicamente de quatro a oito. Enquanto a bioreação progride, as bolhas produzidas pelo suprimento de ar são quebradas pelo agitador enquanto viajam para cima. Em um reator de fluxo contínuo de tanque agitado, o substrato é alimentado continuamente no sistema e o produto é continuamente retirado e separado, do organismo produzido, que é reciclado. Da mesma forma que nos reatores químicos convencionais, os bioreatores podem ser colocados em série ou em paralelo.

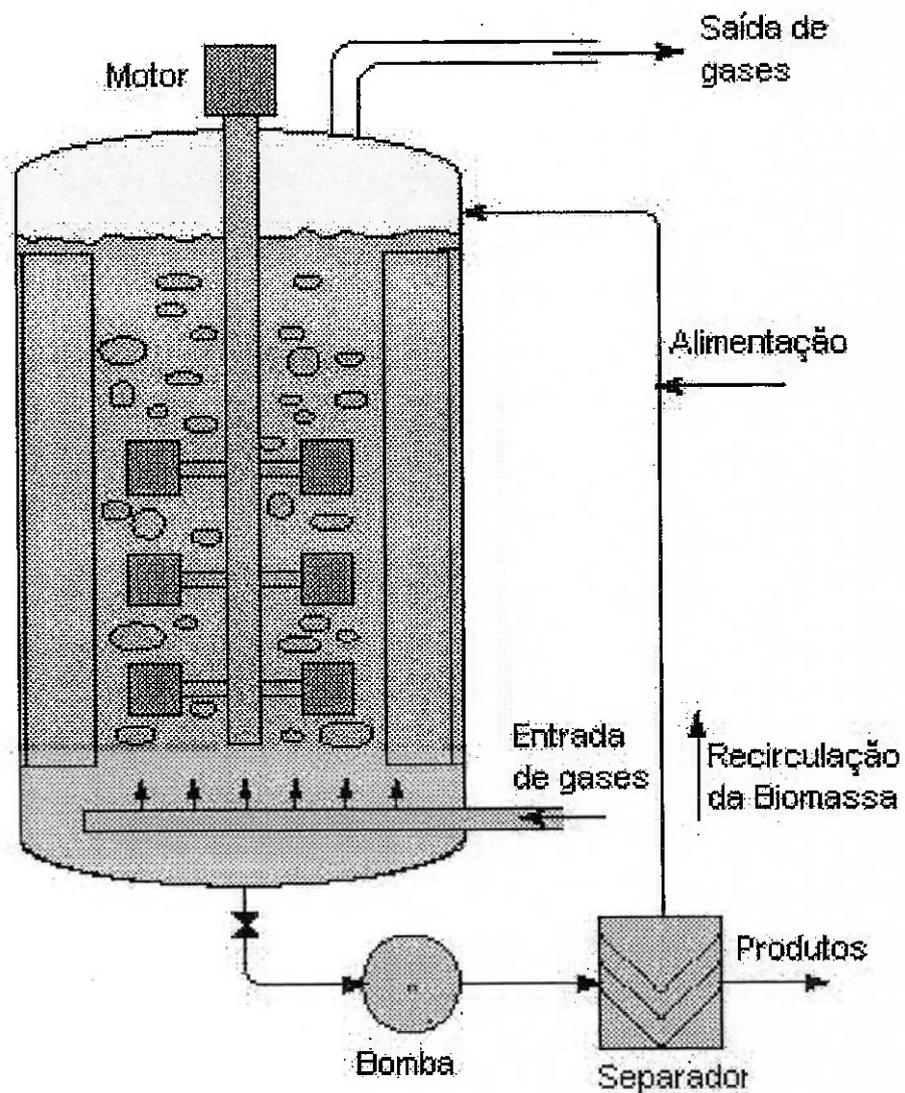


Figure 1. O bioreator de tanque agitado usa defletores e uma agitadora para obter mistura ótima.

2.6.3. Bioreator Airlift

Muitos tipos de bioreatores airlift são atualmente usados (Chisti, 1989). O ar é tipicamente alimentado através de um anel de dispersão no fundo de um tubo central que controle a circulação do ar e do meio. O fluxo de ar dentro do tubo, forma bolhas ascendentes, e o gás de exaustão se desprende no alto da coluna. O líquido desgasificado flui então para baixo e o produto é drenado do tanque. O tubo pode ser projetado para servir como trocador de calor interno, ou pode ser adicionado um trocador de calor no meio da circulação.

A eficiência de circulação do bioreator depende muito da configuração principalmente da relação das áreas do *riser* e do *downcomer* (diâmetro do tubo interno com respeito ao diâmetro do tubo externo).

Apresenta várias vantagens em relação aos outros bioreatores convencionais:

- São equipamentos simples de fácil construção e operação, além de não terem partes moveis e são recipientes simples dentro dos quais o ar é injetado.
- As tensões de cisalhamento são menores, o que dá grande flexibilidade. O sistema pode ser usado para crescimento de células animais ou vegetais.
- Eficiente descarga das bolhas.
- Grande área específica de contato interfacial, com baixa entrada de energia.
- Fluxo bem controlado e mistura eficiente.
- Tempo de residência definido para todas as fases.
- O aumento da solubilidade oxigênio aumenta a transferência de massa nos grandes tanques sob pressões elevadas.
- Grande remoção de calor comparado aos tanques agitados convencionais.

As principais desvantagens são:

- Investimentos iniciais mais elevados devido aos processos de grande escala.
- Grande necessidade de saída de ar e de pressões mais elevadas, particularmente para a operação de grandes escala.

- Fricção baixa para os diâmetros hidráulicos ótimos dos tubos vertical de ascensão e de descida.
- Eficiência baixa da compressão do gás.
- Impossibilidade de manter níveis constantes de substrato, dos nutrientes e do oxigênio para os organismos que circulam através do bioreactor e para as mudanças das circunstâncias.
- Separação ineficiente de gás/líquido quando se forma espuma.
- Elevado consumo de energia.

Entretanto, estas desvantagens podem ser minimizadas por um bom projeto. Por exemplo, se somente um único ponto servisse como fonte de alimentação, o organismo experimentaria os ciclos contínuos do crescimento elevado, seguidos pela morte, tendo por resultado a produção de subprodutos indesejáveis, baixos rendimentos e taxas elevadas de mortalidade. Um projeto com pontos múltiplos de alimentação elimina este risco, especialmente em operações de grande escala. Os mesmos riscos são inerentes a um único ponto de entrada para o oxigênio, o qual deve ser adicionado em vários lugares dentro do recipiente, com a maioria do ar entrando pelo fundo, para circular o líquido através do reator.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Reagentes:

- Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato férrico pentahidratado ($(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- Fosfato ácido de potássio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Reagente de Bradford
- Albumina de soro bovino da Sigma
- Fenantrolina
- Hidroxilamina (HONH_2Cl)
- Sulfato de amônio ferroso

Todos os reagentes são de grau p.a.

A maioria de reagentes foram fornecidas por Casas Americanas.

Equipamentos:

- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 11.
- Para as centrifugações semi-preparativas foi empregada centrífuga Fanem Excelsa modelo 206 MP.

- Os cultivos dos microrganismos foram realizados em agitador orbital Tecnal, TE-420 com regulador de temperatura.
- As medidas de pH foram executadas em pHmetro Hanna HI 9321.
- As medidas de Eh foram executadas em pHmetro Micronal 730.
- Bioreator Airlift.

3.1.1. Microorganismo e Meio de cultura

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (linhagem LR, isolado de um lixiviado de urânio, Garcia 1992) usada neste estudo, foi isolada e gentilmente doada pelo Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior do Instituto de Química, Unesp.

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi crescido num meio basal de sais de T&K (Tuovinen & Kelly, 1973). A composição do meio foi : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0,4 g l⁻¹; K_2HPO_4 , 0,4 g l⁻¹; e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g l⁻¹, contendo sulfato ferroso como fonte de energia ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33,3 g l⁻¹); o pH é ajustado através da adição de ácido sulfúrico.

3.1.2. Caracterização do minério

Neste trabalho foi utilizada uma amostra de um concentrado de flotação obtido da Cia. Mineira de São Bento, Sta. Bárbara, MG. O concentrado é constituído principalmente de pirrotita e arsenopirita como minérios principais de sulfeto com aproximadamente 27 % e pirita como minério secundário. Os principais minerais de ganga são quartzo, siderita com traços minerais de ankerita, dolomita, e mica. Todos os sulfetos se apresentam como fragmentos irregulares liberados. As inclusões nos diferentes sulfetos são escassas e consistem de inclusões de arsenopirita em pirrotita, pirrotita inclusa em pirita e pentantlita disseminada em pirrotita.

A cianetação direta do concentrado de São Bento dá uma recuperação de ouro de 49,9%.

A tabela 2 informa suas características mais importantes.

Tabela 2 - Análise mineralógica e química do concentrado (São Bento)

Item	Unidades	Teor
pirita	%	10,1
arsenopirita	%	26,9
pirrotita	%	26,7
ganga	%	36,3
ouro	g/t	21,53
sulfeto	%	24,1
enxofre Total	%	24,9
ferro	%	36,1
arsênio	%	8,7
carbonato	%	5,1
sílica	%	5,7
chumbo	ppm	165

O concentrado apresenta granulometria de 85 % - 325 malhas (45 μ m), como mostra a tabela 3.

Tabela 3.- Análise granulométrica do minério

<u>Peneira</u>		<u>retido</u>	<u>retido</u>	<u>passante</u>
Malhas Tyler	μ m	%	<u>acumulado</u>	%
			%	
200	75	1,4	1,4	98,6
270	53	9,3	10,7	89,3
325	45	6,9	17,6	82,4
- 325	--	82,4	100,0	--0

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo do *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR)

A mesma cepa (Tf-LR) foi usada em todos os experimentos. A cultura bacteriana foi mantida sobre meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1973), usando íon ferroso como fonte de energia, a pH 1,7. O crescimento máximo das células foi obtido em 72 horas sobre agitador orbital a 150 rpm e 32,5 °C (foi monitorado pela determinação do ferro II).

Em todos os experimentos onde o inóculo foi requerido, foi usado um inóculo de 5 % ou 10 % (v/v) de uma cultura ativa.

3.2.2. Obtenção da suspensão concentrada de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A bactéria mesofílica *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) foi crescida sob meio T&K com sulfato ferroso como fonte de energia. A suspensão celular foi primeiro passada através de papel filtro Whatman 1 ou centrifugada a 1.500 rpm para remover os precipitados. O filtrado ou sobrenadante foi outra vez centrifugado a 4.200 rpm por 30 minutos. O “pellet” foi re-suspendido numa solução de ácido sulfúrico a pH 2,0 e mantido num refrigerador para permitir assentar qualquer precipitado. O sobrenadante foi outra vez centrifugado. A lavagem com ácido sulfúrico foi repetida até que as células ficassem livres de ferro (confirmado pelo teste de cor). As células finalmente foram suspendidas em 10 mL de solução ácida a pH 2,0 e armazenadas a 4 °C (Devasia, 1993). Elas mantêm atividade pelo menos durante um mês.

3.2.3. Procedimento de bio-oxidação

Os ensaios de biolixiviação foram conduzidos em erlemmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, agitados em agitador orbital a 150 rpm e 32,5 °C. Os ensaios de biolixiviação foram iniciados a pH 1,7. O pH foi corrigido durante o processo. O progresso da biolixiviação foi monitorado pela medição regular de ferro

(ferro II e total) e pH. O ferro presente no meio líquido foi determinado usando o método da fenantrolina.

O minério requer contato prévio com solução ácida 0,1M de H_2SO_4 por aproximadamente 24 horas. A solução foi decantada e os sólidos re-suspensos em água nova para remover algum resíduo solúvel de arsênio. Após a decantação da água de lavagem, os sólidos foram transferidos ao meio na concentração desejada.

Em alguns casos, o crescimento bacteriano foi monitorado pela dosagem da proteína celular.

3.3. Ensaio preliminares de bio-oxidação em frascos agitados

3.3.1. Adaptação bacteriana

A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (FfLR) foi adaptada ao minério por cultivo sucessivo em meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1973) na presença de concentrações decrescentes de sulfato ferroso.

As bactérias ativadas foram adaptadas a diferentes concentrações de minério. Durante este período, a bactéria foi separada do meio e re-cultivada em concentrações crescentes de minério. Ao final de cada adaptação, a bactéria foi submetida a testes de atividade oxidativa. Os sólidos minerais (concentrado de arsenopirita) foram inoculados com 5 % (v/v) de solução bacteriana adaptada.

O seguinte esquema de trabalho foi adotado:

- A bactéria foi sucessivamente adaptada ao minério por cultivo sucessivo em meio T&K na presença de concentrações crescentes de minério e decrescentes de ferro (9 g/L) .
- A adaptação foi feita em erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio
 - a) Meio T&K + $\frac{1}{2}$ (Fe^{2+}) + 1%v/v concentrado + inóculo linhagem (5%)
 - b) “ + $\frac{1}{4}$ (Fe^{2+}) + 2,0%v/v + inóculo anterior (5 %) (a)
 - c) “ + $\frac{1}{8}$ (Fe^{2+}) + 4,0% + “ (b)

- d) “ + sem (Fe^{2+}) + 8,0 % + “ (c)
- e) “ + sem (Fe^{2+}) + 12,0 % + “ (d)
- f)”.....+ sem (Fe^{2+}) + 15,0 % + inóculo anterior (10 %) (e)

➤ Durante os ensaios foram acompanhados os valores de pH, Fe^{2+} , Fe_{to} .

Primeiramente a adaptação foi levada em erlemmeyer de 250ml até atingir 12 % de sólidos. Em seqüência foi feito um cultivo repetitivo em erlenmeyer sobre 15 % de sólidos. Os sólidos minerais foram previamente lavados com ácido e inoculados com 10 % (v/v) de solução bacteriana adaptada.

3.3.1a. Testes de atividade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

A influência mineral no processo de bio-oxidação é um dos parâmetros críticos da biolixiviação, principalmente o modo como a concentração do substrato mineral interfere no processo. Por esta razão, é importante entender o efeito da exposição contínua do *Acidithiobacillus ferrooxidans* ao mineral sulfetado, em relação à influência de sua atividade oxidativa.

O efeito da presença de sólidos sobre a capacidade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre o íon ferroso foi testado usando uma suspensão de células adaptadas crescidas no meio mineral. Frascos contendo meio fresco de cultura (T&K) e sulfato ferroso, em ausência de substratos sólidos, foram inoculadas com 5 % da solução das células adaptadas e incubadas num agitador orbital a 150 rpm e 32,5 °C. Durante a incubação foram monitoradas a oxidação do íon ferroso e pH.

3.3.2. Mecanismos de biolixiviação

A biolixiviação de sulfetos explica-se por dois mecanismos diferentes: direto e indireto, que se desenvolvem simultaneamente. Para um processo de biolixiviação eficaz, tanto a atividade bacteriana das células na fase sólida quanto das células na fase líquida são significativas.

As medidas indiretas de atividade microbiana são muito úteis para estudar a

interação do *Acidithiobacillus* com a superfície mineral (Yeh et al., 1986). Alguns deles envolvem o monitoramento dos íons ferroso e férrico ou da proteína total. Estes métodos são particularmente apropriados e convenientes para estabelecer a contribuição do ataque direto na dissolução de minérios (Devasia et al., 1993).

A medida da proteína total pelo método de Folin-Lowry tem sido usada para medir a adesão de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Karan et al., 1996). Um método alternativo extensamente usado, de fácil aplicação, é o método de Bradford, que mostra grandes vantagens: é 4 vezes mais sensível que o método Lowry e mais rápido (Bradford, 1976).

A dosagem da proteína celular pode ser uma ferramenta útil para a avaliação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de outros microrganismos acidofílicos relacionados com a lixiviação. Além disso, os resultados experimentais indicam que pode ser uma fonte de informação fisiológica apropriada para o estudo da interação superfície-célula e para a avaliação da atividade metabólica da célula.

Estudou-se a contribuição da % de sólidos, pH, e da presença de íons férricos e reagentes de flotação na interação célula-superfície mineral em relação à atividade metabólica, considerando que o *Acidithiobacillus ferrooxidans* utiliza íon ferroso, enxofre elementar e minerais sulfetados como fontes de energia para a sua atividade metabólica. Alguns componentes da membrana celular (como as proteínas da membrana externa) poderiam ter um papel importante na adesão e oxidação do sulfeto mineral.

Para estudar a interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com a superfície sólida foram determinadas as densidades das células aderidas e das células livres em solução durante o processo de biolixiviação, considerando-se que as mudanças na proteína celular podem estar associadas com as mudanças metabólicas ocorridas durante o processo de biolixiviação.

3.3.2.1 Ensaio da interação bacteriana sobre a superfície mineral

Para a análise cinética da biolixiviação é importante conhecer a conduta da adesão da bactéria à superfície mineral e as cinéticas da lixiviação do íon férrico. Por

esta razão, foram feitos experimentos para estudar a contribuição da porcentagem de sólidos, do pH e da presença de íons férricos na interação célula-sólido com relação à atividade metabólica.

Prepararam-se duas séries de 7 frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 80 mL de meio básico T&K (Tuovinen & Kelly, 1973), sem sulfato ferroso, 20 mL de água destilada. Posteriormente adicionaram-se 1 ou 5 g de concentrado mineral. Foram incubados a 32,5 °C num agitador rotativo, a 150 rpm. O pH de cada frasco foi ajustado todos os dias com ácido sulfúrico concentrado.

Os experimentos foram iniciados com a adição da mesma quantidade de inóculo, concentrado por centrifugação. A quantidade da proteína inicial no inóculo foi de aproximadamente 7,0 mg/L. Cada dia, um frasco de cada série foi analisado. O mineral foi separado do sobrenadante, 10 mL do sobrenadante foram centrifugados a 4.200 rpm para a remoção das células bacterianas. Estas foram suspensas em uma solução ácida próxima de pH 2,0.

As amostras minerais foram vigorosamente agitadas, para remover as bactérias não aderidas. O procedimento usado para determinar a proteína em fases líquidas e sólidas proposto por Karan (1996) foi adotado. A proteína celular bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi determinada pelo método de Bradford depois de hidrólises em solução de NaOH 0,5 M por 100 °C e 10 min. Usou-se soro de albumina bovino como padrão de referência.

Fe II e Fe total na solução foram determinados pelo método colorimétrico da orto-fenantrolina num espectrofotômetro Perkins Elmer Lambda 11 em luz visível.

3.3.2.2 Influência dos reagentes de flotação sobre o *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

O efeito da presença de compostos orgânicos sobre a atividade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi estudado usando uma suspensão de células não adaptadas. Frascos contendo 100 ml de meio fresco de cultura (T&K) com sulfato ferroso, em ausência de substrato sólido foram inoculadas com 0,460 ml de suspensão celular com densidade óptica de 2,198 a 600 nm e incubados num agitador

orbital a 150 rpm e 32,5 °C.

Foram adicionadas concentrações crescentes dos agentes de flotação amilxantato, etilxantato e isopropilxantato (0; 0,5; 0,10; 1,0; 2,0 g/L).

Durante o período de cultivo, a oxidação do íon ferroso, pH e Eh foram monitorados. A densidade óptica foi medida em 0, 38 e 60 horas para avaliar o crescimento bacteriano das células livres.

3.3.2.3 Influência dos reagentes de flotação sobre a capacidade de aderência do *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Para avaliar os efeitos dos reagentes de flotação sobre a capacidade de aderência do *Acidithiobacillus ferrooxidans* à superfície mineral, foram feitos ensaios na presença de concentrações crescentes de xantato.

A amostra mineral foi lavada com solução ácida, pH 1,3, lavada duas vezes com acetona e secada a 65 °C. Neste experimento, o *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi adicionado ao erlenmeyer após uma hora de contato entre o concentrado mineral (1 g) e os reagentes de flotação (0; 0,1; 1,0; 2,0 g/l de amil, etil e isopropil xantatos).

Após 2 horas, alíquotas de 10 mL foram filtradas para separar os sólidos minerais. As células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram hidrolizadas numa solução alcalina de 0,1 M NaOH após filtração e lavagem ácida (pH 1,3) numa membrana filtrante Durapore 0,45 µm. A proteína foi avaliada pelo reagente de Bradford.

O grau de aderência é:

$$\% \text{ Aderência} = \left(\frac{\text{Proteína inicial} - \text{Proteína final}}{\text{Proteína inicial}} \right) \times 100$$

3.4. Ensaio preliminares em bioreator airlift

A bio-oxidação de ouro é primariamente determinada pela condição mineralógica do concentrado (Mehta, 1982; Claassen, 1993; Torma, 1988; Lizama, 1988, 1989; Taxiarchou, 1994) e pela influência das condições de operação: conteúdo máximo de sólidos, atividade da bactéria, oxigenação, pH, tempo de residência (Tremolada, 1990; Urenha, 1992; Modak, 1995).

Estudou-se o efeito das principais variáveis de operação no crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* e na velocidade de biolixiviação num ensaio por lotes consecutivos com um sistema de tubos de airlift. Foram analisados a influência da porcentagem de sólidos, tamanho do inóculo, tempo de residência e vazão de ar no bio-reator Airlift.

Os experimentos foram executados com o objetivo de determinar as condições ótimas para a biolixiviação num processo descontínuo. Também foi estudada a influência das várias espécies químicas produzidas na solução durante o processo de biolixiviação.

3.4.1. Efeito da presença de reagentes de flotação na biolixiviação

A influência dos reagentes de flotação sobre a bio-oxidação de minerais flotados (com ou sem pré-tratamento) foi estudada para determinar sua influência no processo de biolixiviação.

O pré-tratamento do mineral com solução ácida de biolixiviação remove os agentes de flotação e as espécies oxidadas. Após o pré-tratamento do mineral, o biolixiviado foi decantado e os sólidos foram re-suspendidos em água fresca uma e outra vez para remover os resíduos solúveis de arsênio.

Os ensaios foram executados à vazão de ar de 8 l/min e 18 % de concentração de sólidos. O inóculo, usado numa proporção de 20 a 40% (V/V), foi obtido de uma cultura adaptada a 15 % de sólidos minerais.

A temperatura foi mantida a 33 °C, o pH inicial (1,7) foi monitorado para mantê-lo próximo do valor inicial, pela adição diária de H₂SO₄.

Amostras de 50 mL de suspensão foram tomadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos, os sedimentos sólidos ressuspensos em HCl 5 M e agitados para dissolver os sais precipitados de arsênio. O sobrenadante foi filtrado em membranas Millipore e seco a 75 °C para determinar a massa celular.

3.4.2. Ensaios iniciais em bioreator airlift

Para definir os parâmetros de biolixiviação foram realizados ensaios exploratórios sob diferentes condições experimentais com monitoramento do tempo de lixiviação, da massa celular, do pH, do Fe e do As. A informação obtida deste experimento foi utilizada então para identificar os pontos críticos do processo, as relações existentes entre eles e permitirá determinar a direção dos ajustes destes fatores durante o processo de biolixiviação.

A vazão de ar foi de 8 a 12 L/min (vazões menores permitem a sedimentação dos sólidos). A concentração de sólidos foi variada de 15 a 18 %. O inóculo foi de 10 a 30 % (v/v) obtido de um cultivo adaptado sobre 15 % de suspensão mineral. A temperatura da cultura foi mantida a 33 °C. O pH inicial (1,7) foi monitorado para mantê-lo próximo de seu valor inicial pela adição diária de H₂SO₄.

O pré-tratamento do mineral requer o acondicionamento com solução biolixivante ácida para remover os agentes de flotação e as espécies oxidadas. O biolixiviado foi decantado e os sólidos re-suspensos em água fresca para remover algum resíduo solúvel de arsênio, seguido de decantação e lavagem (Chapman, 1993). Antes de levar ao processo de oxidação bacteriana, os concentrados da flotação necessitam ser lavados com ácido sulfúrico pH 1,87 e com água destilada (Sampson, 1999).

3.5. Caracterização das variáveis de biolixiviação

A avaliação dos parâmetros críticos e suas possíveis interações que influenciam a velocidade de oxidação de um concentrado sulfetado de pirita aurífera refratária foi feita pela metodologia do planejamento experimental

Os experimentos foram conduzidos segundo um planejamento estatístico fatorial de dois níveis, com três pontos centrais. A partir disto foram planejados um número mínimo de ensaios para determinar os efeitos principais e a interação entre as variáveis influentes do processo. A informação gerada pelo estudo preliminar permitiu determinar as variáveis críticas, identificar os níveis apropriados e assim descobrir as interações entre as variáveis que influenciam o processo.

Para preparar o inóculo bacteriano, a bactéria foi sucessivamente adaptada ao minério por cultivos sucessivos em meio T&K livre de ferro, na presença de concentrações crescentes de minério.

3.5.1. Preparo das amostras minerais

O pré-tratamento do mineral requer o condicionamento com a solução biolixivante ácida para remover os agentes de flotação e as espécies oxidadas. O biolixiviado foi decantado e os sólidos ressuspensos em água fresca para remover algum resíduo solúvel de arsênio, seguido de decantação e lavagem (Chapman, 1993). Antes de serem levados ao processo de oxidação bacteriana, os concentrados da flotação necessitam ser lavados com ácido sulfúrico pH 1,87 e com água destilada (Sampson, 1999).

3.5.2. Bioreator *Airlift*

O reator airlift foi especialmente projetado para processos biológicos e está caracterizado pela sua elevada transferência de massa e uma eficiente mistura. A mistura e a suspensão de sólidos são induzidas pela aeração constante.

Essencialmente o reator é composto de duas seções verticais: canalização vertical de ascensão (riser) e tubo de descida (downcomer).

O ar é pulverizado no fundo da canalização vertical e as bolhas de ar ascendem ao topo do reator, onde elas podem escapar, o fluxo da água desgasificada continuará no tubo de descida. Como consequência da diferença induzida na densidade o fluxo circulatório ocorrerá. A representação esquemática do reator é mostrada na figura 2.

O bioreator utilizado neste trabalho foi emprestado pelo IPT. Ele consta de dois tubos concêntricos feitos de acrílico.

Este bioreator foi escolhido por apresentar várias vantagens em relação a outros bioreatores convencionais. Eles são equipamentos simples, de fácil construção e operação, além do mais não têm partes móveis e são recipientes dentro dos quais o ar é injetado, promovendo agitação intensa evitando-se pontos de forte cisalhamento (Asenjo, 1994). O tempo de fase lag para o crescimento de bactérias é muito mais curto que em recipientes *shaker*. A mistura intensa e o ar sob pressão originam uma agitação forte, o que melhora o processo de oxigenação, porque o parâmetro limitante da cinética de bio-oxidação é a concentração de oxigênio. A abrasão melhora as superfícies ativas à bio-oxidação das partículas finas do concentrado.

Características do bioreator

Volume máximo: 12 L

Altura / Diâmetro: 1035 : 115 = 9,0

$Area_{riser} / Area_{downcomer} = 0,35$

Tubo exterior

Altura : 690

diâmetro : 115

Tubo interior (*riser*)

Altura : 690

diâmetro interno : 57

diâmetro externo: 62

Separador de gases

Altura : diâmetro = 295 : 220

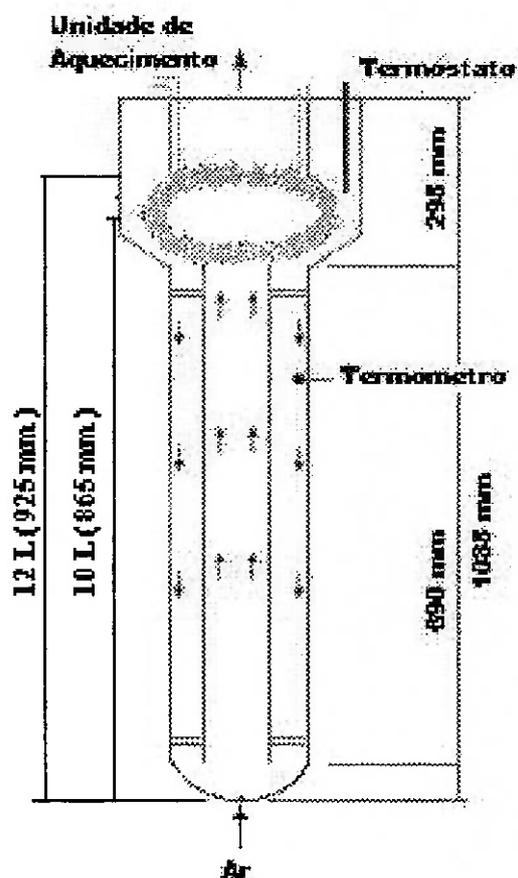


Figura 2. O desenho simples de um bioreator concêntrico com tubo de corrente ascendente com fluxo anular de corrente descendente produzida pela agitação com ar sob pressão.

3.5.3. Planejamento estatístico de experimentos

Para obter um entendimento geral de como as variáveis afetam o processo de bio-oxidação, utilizou-se o planejamento experimental estatístico.

Os experimentos iniciais foram conduzidos seguindo um planejamento estatístico de dois níveis. A partir disto foram planejados um número mínimo de ensaios para determinar os efeitos principais e a interação entre as variáveis que influenciam o processo. A informação gerada pelo estudo de caracterização, permitirá determinar as variáveis críticas, identificar os níveis apropriados e descobrir as interações entre as variáveis que influenciam o processo.

Os ensaios de bio-oxidação foram conduzidos em escala de laboratório num reator Airlift de 12 L. A oxidação da arsenopirita e piritita e a recuperação de ouro foram avaliadas pela variação combinada das variáveis propostas.

3.5.4. Definição dos parâmetros a serem analisados

Sobre a base do estudo dos ensaios preliminares foram consideradas as seguintes variáveis independentes controláveis: porcentagem de sólidos; vazão de ar e tempo de residência. Estes fatores foram considerados importantes para o processo de bio-oxidação tomando-se em consideração os resultados reportados na literatura.

3.5.5. Definição das faixas de trabalho dos parâmetros escolhidos

% de sólidos: A % de sólidos afeta significativamente a velocidade de oxidação; por outro lado a adaptação celular pode aumentar a velocidade de oxidação. A bactéria foi adaptada a 15 % de sólidos minerais. Para evitar a dependência de adaptação nos testes de biolixiviação, foram escolhidos 16 e 18 % de sólidos como níveis de trabalho explorados nos ensaios preliminares de bio-oxidação

vazão de ar: A vazão de ar foi um fator limitante na bio-oxidação. Vazões menores que 6 L/min produziam a sedimentação de sólidos no bioreator airlift. Por outro lado, o equipamento disponível no laboratório (compressor)

não tinha a capacidade necessária para testar vazões maiores que 12 L/min. Para garantir uma mistura ótima escolheu-se 8 L/min e 12 L/min.

Tempo de residência: Geralmente o tempo de biolixiviação de minérios refratários de ouro é de 3 a 5 dias (Deng, 2000), por outro lado o ouro encontra-se associado à pirrotita e arsenopirita e em menor grau à pirita. Com os testes preliminares de oxidação observaram-se níveis baixos de arsênio e não se notaram diferenças significativas acima de 7 dias, escolheram-se tempos de biolixiviação entre 5 e 7 dias.

3.5.6. Projeto experimental selecionado

Para caracterizar o sistema usou-se o planejamento fatorial a dois níveis (2^3). Isto permitiu avaliar os efeitos das variáveis controláveis sobre a oxidação de pirita, pirrotita e arsenopirita e a extração de ouro. Foram estudadas oito combinações possíveis das variáveis controláveis. Os níveis utilizados foram encontrados em testes prévios. Os níveis de cada variável são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Codificação de variáveis

Fatores	Nível inferior	Nível superior
Porcentagem de sólidos	16 %	18 %
Vazão de ar	8 l/min	12 l/min
Tempo de residência	5 dias	7 dias

Temperatura constante 32,5 °C, pH constante 1,70 e volume 10L.

3.5.7. Análise de resultados do processo

Os resultados do monitoramento foram avaliados através das variáveis dependentes de resposta que vêm a ser a solubilização de ferro e arsênio e a recuperação de ouro.

A análise estatística destes dados experimentais foi executada fazendo uso de programas estatísticos principalmente os programas STATGRAPHICS e MINITAB (Box, 1978; Montgomery, 1996).

3.5.8. Descrição de um ensaio típico de biolixiviação

Para o estudo das variáveis os testes foram iniciados no bioreator *Airlift* de 12 L por bateladas. Em geral foram colocados 1,6 - 1,8 kg de mineral dentro do meio de cultura. A temperatura de operação de 32,5 °C; pH de 1,70. O ar injetado na base do bioreator *Airlift* foi de 8-12 l/min.

A cultura ativa de *T. ferrooxidans* utilizada provém de um bio-reator *Airlift* contendo os nutrientes básicos livres de Fe com 15 % de mineral (adaptado ~ 6 meses) .

Amostras foram tomadas regularmente do bio-reator com monitoramento do ferro, do arsênio, da concentração da massa celular e do pH, o qual foi ajustado com solução de ácido sulfúrico.

No fim do ensaio, o ferro e o arsênio foram avaliados para determinar o grau de oxidação da pirita e da arsenopirita. As suspensões minerais foram dissolvidas em HCl 5 M, em seguida foi analisado o conteúdo de Fe e As.

O grau de extração de ouro após tratamento foi determinado por ensaio de cianetação dos resíduos oxidados.

A massa celular foi determinada pela filtração de 40 ml de solução lixiviante em membranas Millipore de 0,22 µm, as quais foram lavadas e secadas a 60 °C por 2 horas (Chen, 2001).

3.5.9. Ensaio de cianetação direta

Finalizados os ensaios de bio-lixiviação, todos os resíduos e mais um lote de concentrado sem nenhum tratamento prévio foram lavados abundantemente com água destilada. Realizou-se então a estabilização do pH entre 11-12. Após a estabilização adiciona-se KCN na concentração final de 2g/l (0,1 M). O processo de

cianetação foi feito à temperatura ambiente por 24 horas, utilizando-se um mesa orbital a 250 rpm.

Os ensaios foram realizados da seguinte forma:

- Num erlemmeyer adicionam-se 210 ml de água destilada e em seguida 70 g de concentrado de ouro a fim de obter 25 % de sólidos (peso/volume), numa diluição líquido- sólido de 3/1.
- Adiciona-se hidróxido de sódio 2 M até atingir pH 11,0.
- Finalmente adiciona-se o cianeto de potássio numa concentração de 0,2 %.

A análise de cianeto livre e o controle do pH foram feitas a cada 6 horas.

Ao final de cianetação analisou-se o rejeito pelo método de copelação a fim de determinar os teores de ouro remanescentes neles.

3.6. Análise de Ferro

Nas análises de ferro em solução, foram determinados Fe II e Fe total pelo método colorimétrico da ortofenantrolina num espectrofotômetro de faixa visível Perkins Elmer Lambda 11.

A determinação de Fe II foi feita pelo método colorimétrico da ortofenantrolina, que forma um complexo de cor laranja vermelho e que, em excesso, elimina a interferência do Cu II e Ni II, no caso de estarem presentes (Tremolada, 1990).

Na determinação de Fe total adiciona-se primeiro a hidroxilamina a fim de reduzir todo o Fe III, o qual compõe o ferro total da solução. Após é adicionada a fenantrolina e se determina o Fe total, lendo-se as absorvâncias numa faixa de 510 nm.

Antes de começar as determinações o espectrofotômetro é zerado contra um branco que contém o meio de trabalho sem a presença de Fe , os valores lidos são avaliados com a curva de calibração (Tremolada, 1990).

1. Preparação da solução de fenantrolina

125 gramas de acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) são colocados num becker com 40 mL de água destilada, agita-se a solução e adiciona-se em pequenas quantidades ácido acético glacial até atingir 390 mL de solução. Uma vez dissolvido totalmente o acetato de amônio, a mistura é levada a um balão volumétrico de 500 mL, completando-se com água destilada. Colocam-se, 10 g de fenantrolina num becker contendo água destilada acidificada (1 a 2 mL de HCl 35 %) e se agita. Uma vez dissolvida, a fenantrolina é levada a um balão volumétrico de 500 mL, e completado com água destilada.

Ambas soluções são misturadas e são guardadas numa garrafa de cor âmbar.

2. Preparação da solução de hidroxilamina

10 g de clorohidrato de hidroxilamina (HONH_2Cl) são dissolvidas em 100 mL de água destilada. A seguir, a solução é guardada numa garrafa de cor âmbar.

3. Preparação da solução padrão de Sulfato de Amônio ferroso (0,1N)

Emprega-se esta solução ao se fazer a curva de calibração, absorvância contra concentração de Fe II.

9,8035 g de sulfato de amônio ferroso são levados a um balão volumétrico de 250 mL. Adiciona-se 200mL de água destilada e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Agita-se tudo até que os componentes se dissolvam, completando-se com água destilada.

4. Curva de calibração

Prepara-se uma serie de padrões a partir de sulfato de amônio ferroso com intervalo de 0,2 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Elabora-se a curva de absorvância a 510 nm contra concentração de íon ferroso. A solução padrão diluída a 1/10 num balão

volumétrico com água destilada forma os volumes de solução apresentados na tabela sempre adicionando-se com água até um volume total de 2,5 mL. A curva é elaborada em duplicata. A curva de calibração é mostrada na tabela 5.

Tabela 5 - Curva de calibração

Volume sol de Ferro II (mL)	Água (mL)	Fenantrolina (mL)
0,00	2,10	0,4
0,01	2,09	0,4
0,02	2,08	0,4
0,04	2,06	0,4
0,08	2,02	0,4
0,16	1,84	0,4
0,24	1,76	0,4
0,32	1,68	0,4

5. Análise de Ferro

Procedimento:

Num tubo de ensaio colocar 0,1 mL de amostra a determinar, diluída até uma concentração de Fe II ou Fe total de 100 ppm (100mg/l);

- Para dosar Fe II, adicionar 0,4 mL de solução de fenantrolina (observar preparação). Fazer agitação do tubo e adicionar 2,0 mL de água destilada
- Para dosar Fe total, adicionar primeiramente 0,1 mL de solução de hidroxilamina. Fazer agitação do tubo e adicionar 0,4 mL de solução de fenantrolina, agitar, completar com água destilada até volume de 2,5 mL.

Ler a absorvância a 510 nm no espectrofotômetro de faixa visível Perkins Elmer Lambda 11 contra um branco.

3.7. Dosagem de proteína total

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford, M. M., 1978. Esse método tem como base a reação do corante Comassie Brilliant Blue G-250, com as ligações peptídicas de proteínas, utiliza-se albumina sérica bovina como padrão.

3.8. Medida de Proteína celular

Para determinar a proteína da fase líquida, células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram coletadas, após filtração da cultura bacteriana. O meio filtrado foi centrifugado a 4200 rpm por 30 minutos. Seguido de uma lavagem solução de ácido sulfúrico de pH 2 para ter células livres de ferro, as quais logo foram hidrolizadas em solução de 0,5 M de NaOH num banho de água fervente.

Para estimar a proteína da fase sólida, a amostra mineral contendo os micro-organismos aderidos foi lavada 3 ou 4 vezes com solução de ácido sulfúrico pH 2,0. As amostras minerais foram hidrolizadas em 0,5 M de NaOH num banho fervente por 10 minutos. O meio hidrolizado foi filtrado. As soluções de extrato de proteína foram dosadas com reagente Bradford.

Após 2 minutos a absorvância foi medida a 595 nm num espectrofotômetro Perkins Elmer Lambda 11.

Para estabelecer a interferência das espécies minerais sobre a estimação da proteína, diferentes procedimentos foram adaptados (Karan, 1996). 1 g de amostra mineral foi inicialmente sujeita à hidrólise alcalina em hidróxido de sódio 0,5 M por 20 minutos. A solução hidrolizada do minério foi filtrada e quantidades conhecidas de albumina bovina foram adicionadas e dosadas com reagente de Bradford.

Para minimizar a interferência dos constituintes minerais, foram usadas a diluição assim como a adição de H₂O₂.

3.9. Determinação do arsênio

O arsênio diluído (As_d) foi determinado no sobrenadante das amostras centrifugadas. Alíquotas (0,2 ml) de sobrenadantes foram misturadas com 1,8 ml de HCl 5 M e então diluídas a HCl 0,3 M para espectrometria de absorção atômica.

O arsênio total (As_{HCl}) nas suspensões líquidas foi medido através de espectrometria de absorção atômica após digestão ácida da suspensão lixiviante (HCl 5 M, 30 min à temperatura ambiente) e diluição a HCl 0,3 M.

As metodologias descritas foram usadas por Tuovinen, 1994 e Taxiarchou, 1994.

4. Resultados e discussão

4.1. Adaptação bacteriana

A adaptação de micro-organismos aos substratos minerais aumenta significativamente a velocidade da atividade bacteriana. O cultivo sucessivo a doses crescentes de minério pode aumentar a velocidade de oxidação do sulfeto (Attia,1989, Modak,1995). A adaptação da bactéria a doses crescentes de minério aumenta a tolerância da bactéria a concentrações maiores dos metais sulfetados solúveis formados durante a biolixiviação.

O efeito do aumento progressivo da concentração de minério sobre a oxidação do íon ferroso pela célula Tf-LR não adaptada é mostrado nas figuras 3 a 6, que apresentam de forma gráfica os resultados exibidos nas tabelas 6 a 9

4.1.1. Adaptação bacteriana ($\frac{1}{4}$ Fe II + 2 g de minério)

Na figura 3 mostra-se a concentração do ferro, como função do tempo, na presença de 2 g de minério, inoculado com 10 % (V/V) de bactéria adaptada durante duas semanas, à presença de 1 g de minério. O tempo requerido para completar a oxidação do ferro no meio básico T&K foi de 74 horas a 32,5 °C. A quantidade do íon ferroso presente no meio diminui lentamente nas primeiras 30 horas, apresentando uma fase lag prolongada na fase inicial. Após este período ele diminui rapidamente. Contrariamente, a concentração de ferro III aumenta inversamente à concentração de ferro II.

A geração do íon ferro III foi inibida nos estágios iniciais (30 horas). Em estágios posteriores esta inibição não foi muito evidente. Entretanto foi evidente que nos estágios iniciais de adaptação teve-se uma fase lag maior para o aumento e diminuição dos íons férrico e ferroso.

Isto parece poder completar-se com o comportamento das bactérias adaptadas que mostram perda da sua atividade oxidativa na medida que as bactérias ficam aderidas ao minério ao apresentar pouco poder oxidativo, podendo indicar uma

Tabela 6 - Efeito da concentração inicial de 2 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (h)	Fe II (g/L)	Fe III (g/L)	Fe total (g/L)
0,0	1,68	0,11	1,78
20,2	1,58	0,52	2,09
25,5	1,53	0,64	2,16
42,5	1,18	1,56	2,74
50,2	0,59	2,43	3,02
66,0	0,43	3,44	3,86
70,5	0,39	3,21	3,59

Desvio Padrão: 0,015; R: 0,99994

Tabela 7 - Efeito da concentração inicial de 4 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (h)	Fe II (g/L)	Fe III (g/L)	Fe total (g/L)
0	0,85	0,05	0,91
2,75	1,42	0,11	1,52
17,75	2,33	0,08	2,41
24,00	3,07	0,37	3,44
46,75	3,76	0,76	4,52
69,25	4,33	0,66	4,99

Desvio Padrão: 0,015; R: 0,99994

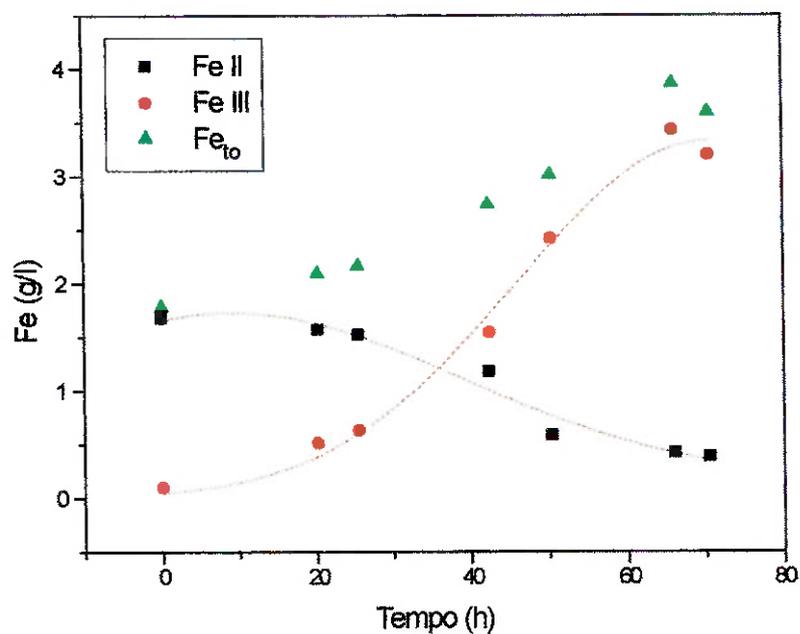


Figura 3. Efeito da concentração inicial de 2 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana do ferro pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado a 1 % de minério ($\frac{1}{4}$ de Ferro II (2,25 g/L), pH 1,7 temperatura 32,5 °C e 150 rpm).

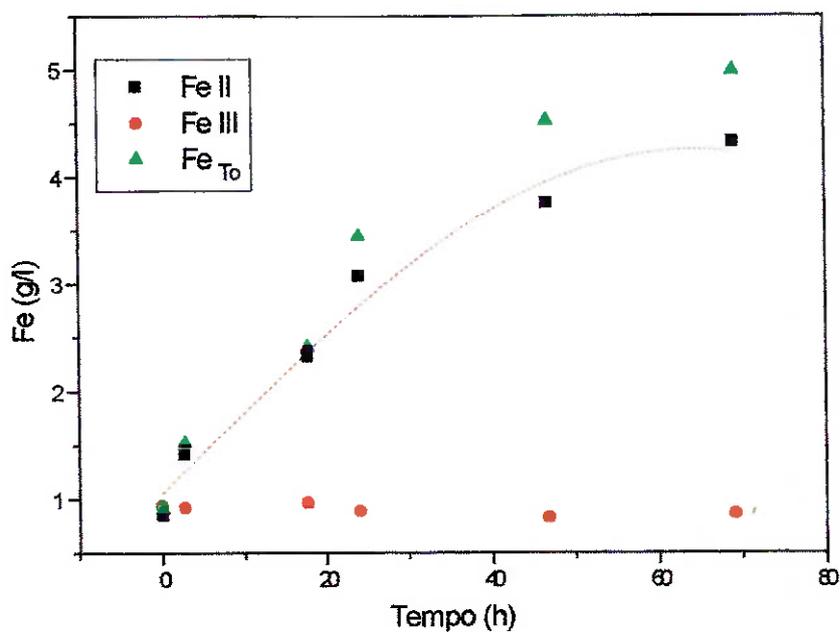


Figura 4. Efeito da concentração inicial de 4 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana do ferro pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado a 2 % de minério ($\frac{1}{8}$ de Fe II (1,125 g/L), pH 1,7; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

atividade bacteriana maior na superfície mineral. Como mostram as figuras 4, 5 e 6, onde os níveis de Fe III permanecem muito baixos ou constantes.

4.1.2. Adaptação bacteriana (1/8 Fe II + 4 g de minério)

Observa-se que, na presença de 4 g de minério, a cepa fica mais tolerante e foi capaz de crescer eficientemente (figura 4), como mostra a curva de biolixiviação (rápida solubilização de ferro).

É interessante observar que os níveis de Fe III permanecem baixos, atingindo níveis iguais ou inferiores a 0,5 g/l durante o último estágio da biolixiviação. Contrariamente, a concentração do Fe II mantém-se em níveis elevados. Entretanto a formação de Fe III permanece inibida após 72 horas de biolixiviação.

Em concentrações maiores de minérios pode-se observar a acumulação do Fe II como mostram as figuras 5 e 6, onde a perda da atividade oxidativa se faz mais evidente. Interessantemente, a carência da formação de Fe III torna-se mais evidente na medida em que aumenta a concentração do minério e o tempo de residência, o que pode indicar a falta de atividade oxidativa por parte das células bacterianas.

4.1.3. Adaptação bacteriana (8 % e 12 % de minério)

Na figura 5 (tabela 8), o bacilo adaptado a 4 % de minério foi submetido à presença de 8 % de concentração de minério, a biolixiviação da bactéria adaptada foi completada em 120 horas e a curva de bio-oxidação apresenta um perfil quase linear que pode ser um indício de inibição, provavelmente pela presença de metais tóxicos (As III e As V). Tais observações são significativas para as condições de biolixiviação, desde que as concentrações dos metais dissolvidos são continuamente aumentadas. Entretanto, pode-se observar recuperação do crescimento no ciclo posterior de adaptação.

A figura 6 (tabela 9) mostra a biolixiviação a 12 % de minério de uma cepa previamente adaptada à presença de 8 % de minério. Nesta figura mostram-se os perfis da dissolução do Fe dos concentrados sulfetados. A cepa adaptada mostra melhor desempenho na presença de 12 % de minério. Foi observada completa

Tabela 8 - Efeito da concentração inicial de 8 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (h)	Fe II (g/L)	Fe III (g/L)	Fe total (g/L)
0	0,49	0,17	0,66
18	1,78	0,13	1,90
24	2,54	0,36	2,90
28	2,95	0,20	3,15
42	3,05	0,38	3,43
50	4,34	0,39	4,74
65,75	5,22	1,38	6,60
93	7,83	0,57	8,40

Desvio Padrão: 0,015; R: 0,99994

Tabela 9 - Efeito da concentração inicial de 12 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (h)	Fe II (g/L)	Fe III (g/L)	Fe total (g/L)
0	0,67	0,28	0,94
25	3,71	0,33	4,05
41,5	5,39	0,37	5,75
49,5	5,92	0,27	6,19
69,5	7,53	0,37	7,89
89,25	8,19	0,48	8,67
95,75	8,74	0,36	9,10
100,75	8,83	0,48	9,31
115,25	9,80	1,61	11,41

Desvio Padrão: 0,015; R: 0,99994

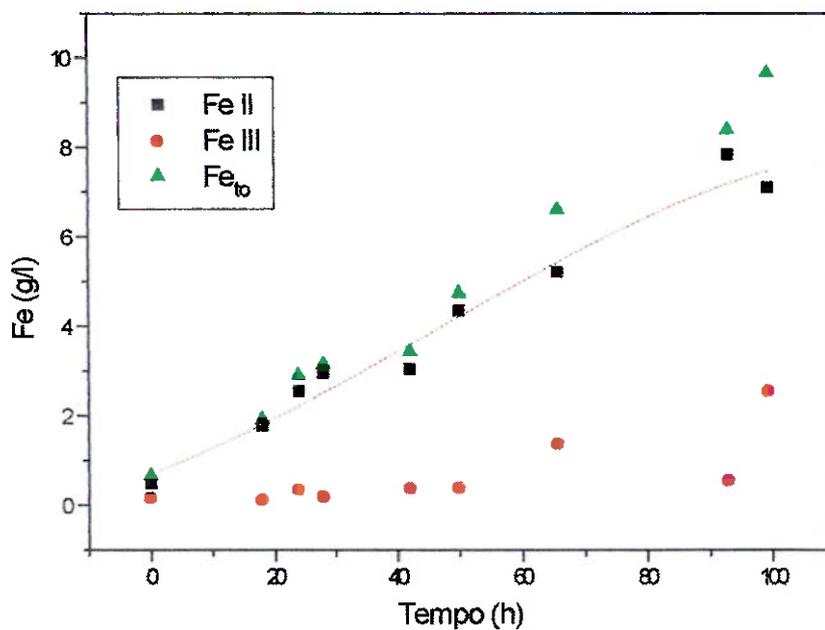


Figura 5. Efeito da concentração inicial de 8 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana do ferro pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado a 4 % de minério (pH 1,7; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

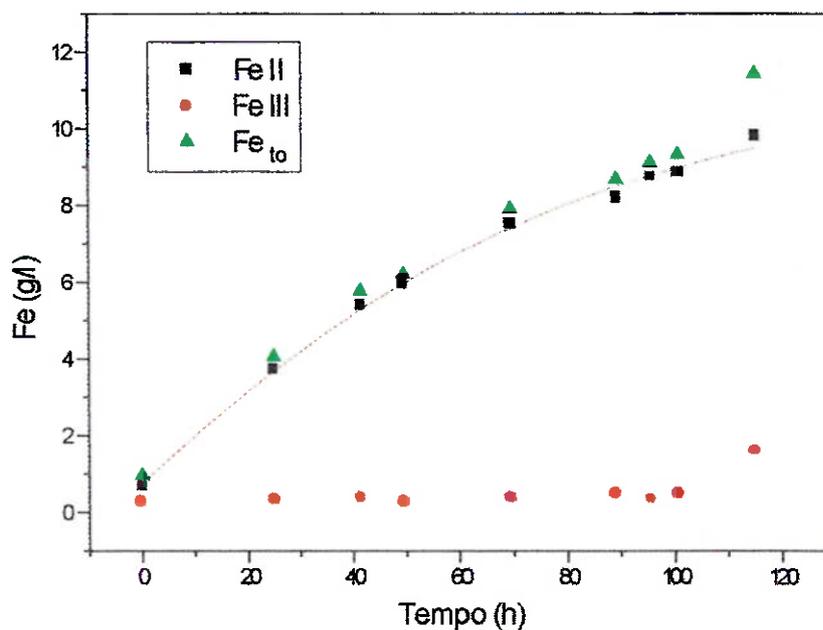


Figura 6. Efeito da concentração inicial de 12 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana do ferro pelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado a 8 % de minério (pH 1,7; temperatura 32,5 °C e 150 rpm).

inibição da oxidação do Fe III. Somente uma pequena porcentagem de ferro foi oxidada após todo o período de incubação. O aumento à tolerância dos metais tóxicos da cepa Tf-LR é mostrado nesta figura, a cepa adaptada é incapaz de oxidar ferro, na presença de 12 % de minério. A diferença entre o Fe II e Fe III foi muito significativa indicando que a ligação da bactéria com a superfície mineral parece ser o requisito indispensável para a solubilização de ferro. Assume-se que o crescimento não está limitado por outros componentes do sistema. Entretanto dever-se-ia ressaltar que a adaptação bacteriana a concentrações menores de minério mantém ainda a capacidade oxidativa comparada com a adaptação em concentrações maiores, onde apresenta pouco ou nada de seu poder oxidativo.

Os resultados mostrados nos gráficos de adaptação apresentam perda progressiva da atividade oxidativa, que se faz mais evidente nos estágios de adaptação posteriores.

Na biolixiviação de sulfetos múltiplos, mais de um tipo de íon metálico acumula-se na solução. As cepas pré-adaptadas ao minério parecem apresentar melhor desempenho durante os ciclos de adaptação, como se mostra nos gráficos anteriores.

O cultivo repetido da célula em concentrações maiores de minério parece aumentar a sua tolerância, como pode ser evidenciado pelas curvas de bio-oxidação do minério, figuras 4, 5 e 6.

4.1.4. Adaptação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* a concentrações crescentes de mineral

O cultivo repetitivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* conduz ao aumento da sua tolerância às condições adversas. A figura 7 (tabela 10) mostra que, depois de vários períodos sucessivos de cultivo, a célula adaptada melhora a eficiência de lixiviação, atingindo valores máximos de oxidação mineral. Inicialmente os processos de lixiviação apresentam só solubilização e ausência de oxidação.

O método adotado para o desenvolvimento de células tolerantes ao minério foi baseado no cultivo repetitivo na presença de elevadas concentrações de minério e

Tabela 10 – Efeito do cultivo repetitivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre 15 % de substrato mineral

Tempo	1er ciclo		2do ciclo		3er ciclo	
	Fe II (g/L)	Fe (to) (g/L)	Fe II (g/L)	Fe (to) (g/L)	Fe II (g/L)	Fe (to) (g/L)
0	0	0	0	0	0	0
3	7,01	7,14	8,58	8,74	9,61	10,08
6	10,40	11,28	11,17	11,56	12,88	13,11
10	13,40	13,78	13,78	14,98	12,71	15,93
21	20,88	20,98	20,61	23,25	18,17	23,66

Tempo	4to ciclo		5to ciclo	
	Fe II (g/L)	Fe (to) (g/L)	Fe II (g/L)	Fe (to) (g/L)
0	0	0	0	0
3	10,03	10,36	12,26	12,52
6	13,11	12,88	15,56	22,47
10	17,34	21,92	19,69	26,33
21	23,17	26,77	17,92	27,41

Tempo (dias)	Ferro (g/L)				
	1 ciclo	2 ciclo	3 ciclo	4 ciclo	5 ciclo
0	0	0	0	0	0
3	7,14	8,74	10,08	10,36	12,52
6	11,28	11,56	13,11	12,88	22,47
10	13,78	14,98	15,93	21,92	26,33
21	20,98	23,25	23,66	26,77	27,41

Desvio Padrão: 1,00826; R: 0,99836

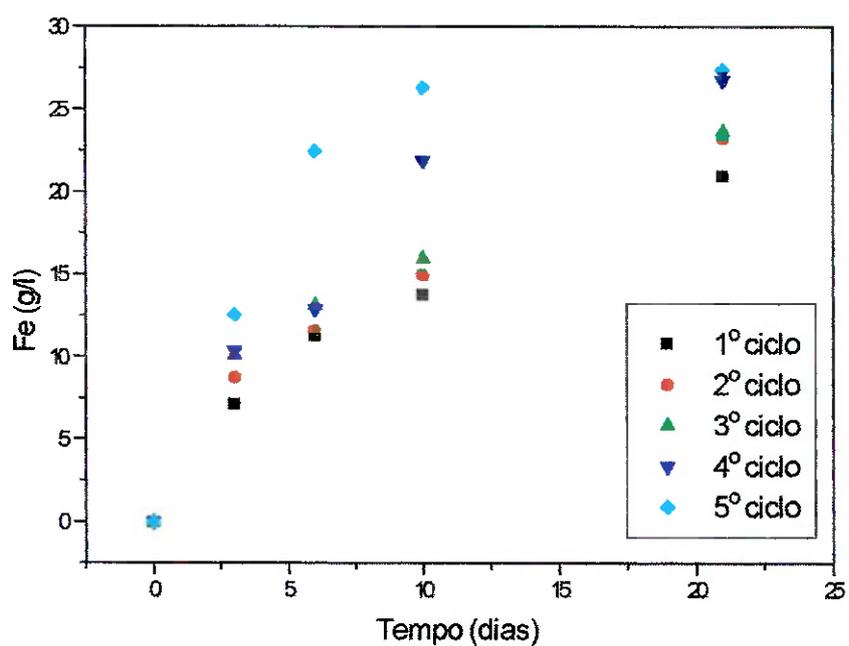


Figura 7. Efeito do cultivo repetitivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre 15 % de substrato mineral sobre a biooxidação bacteriana utilizando um inóculo previamente adaptado a 12 % de substrato mineral. Inóculo 10 % (v/v), temperatura 32,5 °C, pH 1,7 e 160 rpm (símbolo fechado Fe_{t_0}).

não envolve manipulação genética. O período de adaptação bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans* levou aproximadamente 6 meses.

O resultado com *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostra queda da atividade oxidativa para a oxidação do íon férrico, com o aumento da concentração do minério, o qual sugere que o mecanismo celular, quando exposto a cátions metálicos, é especificamente afetado pelos diferentes níveis de cátions. Adicionalmente, a cepa de *Acidithiobacillus* apresenta diferentes níveis de tolerância com relação aos diferentes metais a que é exposta (Mehta, 1982).

As observações anteriormente mencionadas têm aplicações práticas importantes no uso de cepas tolerantes nos processos de biolixiviação. Num processo típico de biolixiviação, iniciado com uma célula não adaptada, a célula poderia ser exposta a concentrações crescentes de metais dissolvidos durante o progresso da bio-oxidação. Ao final do processo de biolixiviação, a tolerância aos metais sulfetados do minério é desenvolvida, dependendo da duração da operação. Os níveis dos metais lixiviados na solução em contato com a cepa utilizada atingiriam valores mais elevados, o que poderia facilitar a biolixiviação nestas mudanças ambientais.

A completa adaptação poderia ser atingida após vários ciclos de operação. Por exemplo no caso do Tf-LR o tempo requerido para adaptação foi de 5 ciclos em concentrações progressivas de minério. Tem sido reportado que, durante o estudo de usinas piloto de ouro, tem-se considerável diminuição no tempo de residência e aumento da densidade de polpa, num período de 3 a 4 anos (Chapman et al, 1993). Um dos fatores que poderia contribuir para tal melhoramento é a contínua adaptação da bactéria. Tais bactérias são coletadas ao final da operação de lixiviação ou recicladas em operações contínuas para uso adicional em operações subseqüentes. É essencial que as células, durante seu armazenamento, sejam mantidas sob condições estressantes, na presença dos sulfetos minerais, para assim reterem a tolerância adquirida (Shrihari, 1993).

As células pré-adaptadas ao concentrado anterior solubilizam mais ferro que as células não adaptadas. Parece que as células presentes no meio de adaptação aderem-se à superfície mineral e são relativamente mais eficientes na solubilização destes. A adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* ao enxofre e à superfície mineral

tem sido reportada em vários trabalhos (DiSpirito et al, 1983; Espejo & Romero, 1987; Yeh et al, 1987).

4.2. Mecanismos

4.2.1. Atividade oxidativa

A biolixiviação de sulfetos minerais é conduzida por dois mecanismos diferentes: direto e indireto, que se desenvolvem simultaneamente. No mecanismo direto, a biolixiviação ocorre como resultado da ligação das células ao minério, liberando íon ferroso para a solução. Na solução, o íon ferroso é oxidado a íon férrico pelas células presentes no líquido. O íon férrico lixivia o minério (mecanismo indireto) através da reação química. Assim, para uma biolixiviação eficiente, tanto a atividade bacteriana das células da fase sólida, como as células da fase líquida são importantes. Por isto é importante entender o efeito da continua exposição do *Acidithiobacillus ferrooxidans* ao minério sulfetado com relação à influência da atividade oxidativa do íon ferroso.

Este aspecto foi estudado usando uma cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) adaptada a concentrações crescentes de minério. As figuras 8 e 9 mostram de forma gráfica a oxidação do íon ferroso pelas células crescidas na fase líquida e pelas células ligadas ao concentrado mineral, valores apresentados nas tabelas 11 e 12. Pode-se observar que, com a continua exposição das bactérias ao concentrado de sulfeto, as células perdem progressivamente sua capacidade de oxidar ferro no meio ferroso. A célula não adaptada oxida o íon ferroso em aproximadamente 48 horas enquanto que as células expostas a maiores concentrações de minério apresentam uma fase lag maior antes de oxidar o ferro. É interessante observar que as células ligadas ao mineral concentrado requerem um período de tempo muito maior para desenvolver-se (figura 9) que as células da fase líquida para o mesmo tempo de exposição.

As células têm duas fontes de energia, a oxidação do íon ferroso na fase líquida e o enxofre (sulfeto) nos substratos minerais. Na ausência do íon ferroso no

Tabela 11 – Efeito da capacidade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* adaptado a 1 %, 2 % e 4 % de minério.

Controle		Células adaptadas				
Tempo (h)	Fe III (g/L)	Tempo (h)	Fe III (g/L)	1%	2%	4%
0	0,35	0	0,39	0,23	0,35	
6	0,47	18	--	0,26	0,61	
18	0,76	20,75	0,52	--	--	
24	1,62	24	0,78	0,42	0,30	
28,5	2,30	28	--	0,65	0,44	
32,5	3,30	42	2,77	1,57	1,39	
41,5	4,98	46,5	4,42	--	--	
47,5	5,93	50	--	3,32	2,04	
54	6,50	65,75	--	5,9635	5,33	

Desvio Padrão: 0,015; R: 0,99994

Tabela 12 - Efeito da capacidade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* adaptado a 8 % e 12 % de minério

Tempo (h)	Fe III (g/L)	Células adaptadas			III
		Controle	8 %	12 %	
0	0,33	0,36	0,09	0,55	
6	0,53	0,62	0,24	0,58	
15	0,98	--	--	--	
27	2,51	1,11	0,43	0,56	
35	3,34	1,70	0,36	0,69	
41	4,58	--	--	--	
47,5	5,90	3,27	0,50	0,87	
53	6,49	4,21	--	0,87	
57,5	6,62	4,78	--	--	
67	--	5,76	--	--	
71,5	--	--	1,55	1,45	
76,5	--	--	1,76	1,48	
82	--	--	2,58	1,86	
95,5	--	--	5,71	2,64	
97,5	--	--	6,31	3,39	
121,5	--	--	--	5,96	

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

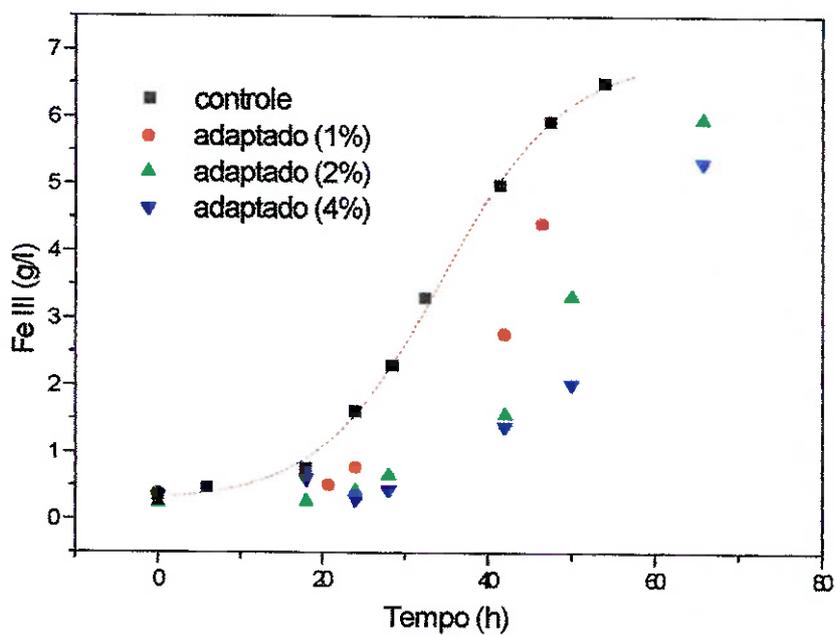


Figura 8. Efeito da capacidade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado à presença de 1 %, 2 % e 4 % de minério (pH 1,7; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

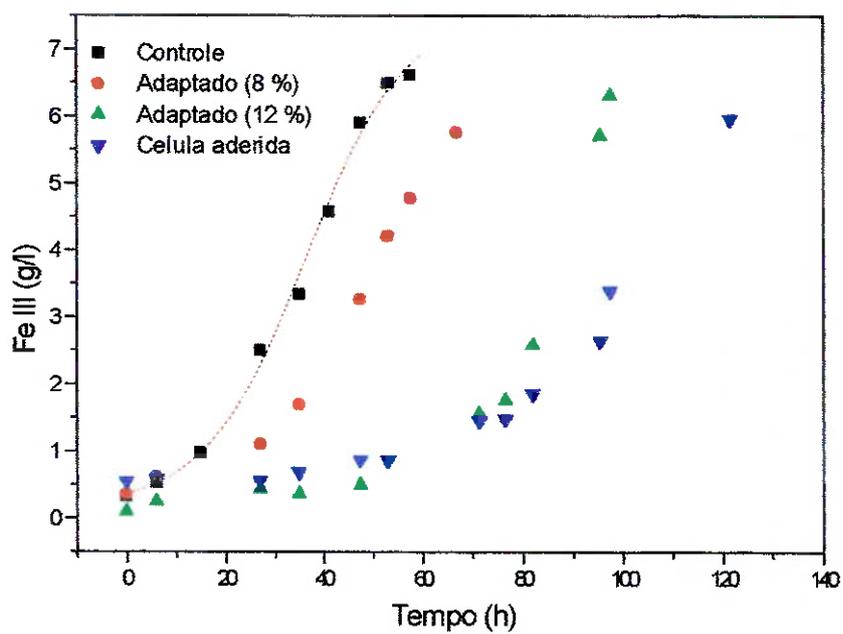


Figura 9. Efeito da capacidade oxidativa do *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente adaptado à presença de 8 % e 12 % (fase líquida, fase sólida) de minério (pH 1,7; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

meio, durante os estágios iniciais da lixiviação, a bactéria é forçada a aderir-se à superfície mineral para utilizar a oxidação do enxofre. Comparando as velocidades de oxidação do íon ferroso pelos *Acidithiobacillus ferrooxidans* crescidos sobre ferro e enxofre, verifica-se que o crescimento sobre enxofre inibe o sistema de oxidação do íon ferroso (Espejo, 1987, Murthy et. al, 1992).

Alternativamente, o sistema de oxidação do ferro poderia ser inibido pelo excesso de sulfato, enxofre ou sulfetos. Há a possibilidade de que os sistemas de oxidação do ferro ou de alguns destes componentes não são expressados durante o crescimento sobre sulfetos minerais durante a biolixiviação. Ao mudar as células crescidas no meio mineral, há um período lag indicativo da indução de alguns componentes do mecanismo de oxidação do ferro. Várias diferenças na composição das proteínas entre células preparadas nos meios do íon ferroso e o meio do enxofre (sulfeto) sugerem mudanças na membrana do organismo (Kingma & Silver, 1980, Devasia et. al, 1993).

4.2.2 Interação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com a superfície mineral.

O mecanismo direto requer contato entre a bactéria e a superfície sulfetada mineral. No mecanismo indireto, a bactéria gera Fe III, que atua como lixivante para a solubilização dos metais do minério. Entretanto ambos os mecanismos podem operar simultaneamente. Outro importante efeito da biolixiviação poderia ser a dissolução de íons dos metais tóxicos (se sua acumulação atinge um nível determinado poderia influenciar a atividade do *Acidithiobacillus ferrooxidans*). Os metais pesados poderiam atingir níveis elevados, que poderiam desativar ou matar a célula e parar a biolixiviação.

Neste experimento foi avaliada, a conduta de bio-oxidação do ferro durante a biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de minério. Os resultados revelam que há uma diferença significativa entre a bio-oxidação para os diferentes concentrados

Os resultados da bio-oxidação de 1 % e 5 % de concentrado de minério são mostrados nas figuras 10, 11, 12 e 13 e tabelas 13, 14, 15 e 16. Uma porção considerável da bactéria foi verificada estar associada com o minério de arsenopirita.

Tabela 13 - Crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

Tempo (h)	Bactéria	
	livre (mg/l)	aderida (mg/g)
0	8,96	0,00
4	--	0,17
25	16,49	1,17
44	18,47	2,11
72	16,00	2,66
92	14,73	3,17
119	23,72	1,96
144	42,65	1,35
168	42,41	1,40

Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 14 - Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)
0	0,01	0,05	0,05
4	0,01	0,06	0,07
25	0,09	0,25	0,35
44	0,34	0,50	0,84
72	0,77	0,19	0,95
92	1,08	0,49	1,57
119	0,76	0,87	1,63
144	0,03	2,99	3,03
168	0,01	2,94	2,95

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 15 – Crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

Tempo (h)	Bactéria	
	livre (mg/l)	aderida (mg/g)
0	8,96	0
4	8,20	--
25	8,52	0,11
44	13,77	1,30
72	9,96	1,13
92	11,15	0,40
119	31,43	0,47
144	53,15	0,80
168	65,40	3,45

Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 16 – Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)
0	0,01	0,14	0,15
4	0,07	0,22	0,29
25	0,48	0,01	0,49
44	1,27	0,16	1,43
72	2,13	0,15	2,28
92	2,48	0,07	2,55
119	3,72	0,13	3,85
144	2,64	0,04	2,68
168	0,49	4,31	4,80

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

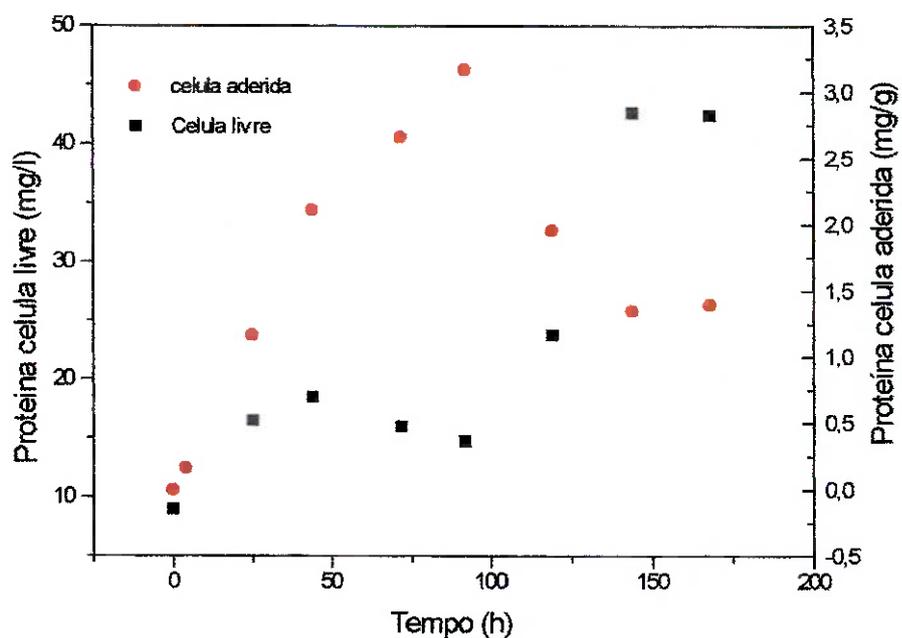


Figura 10. Crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

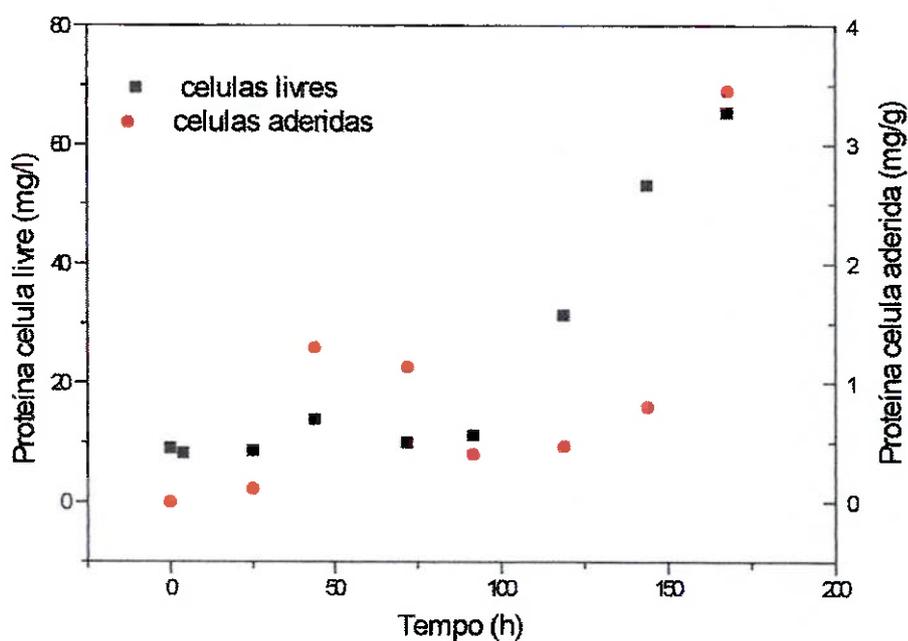


Figura 11. Crescimento do *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

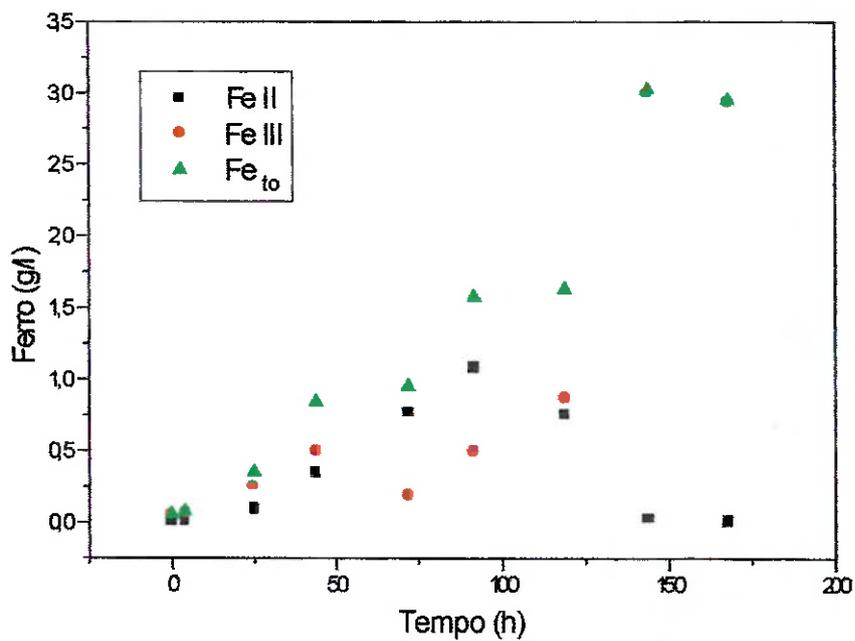


Figura 12. Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

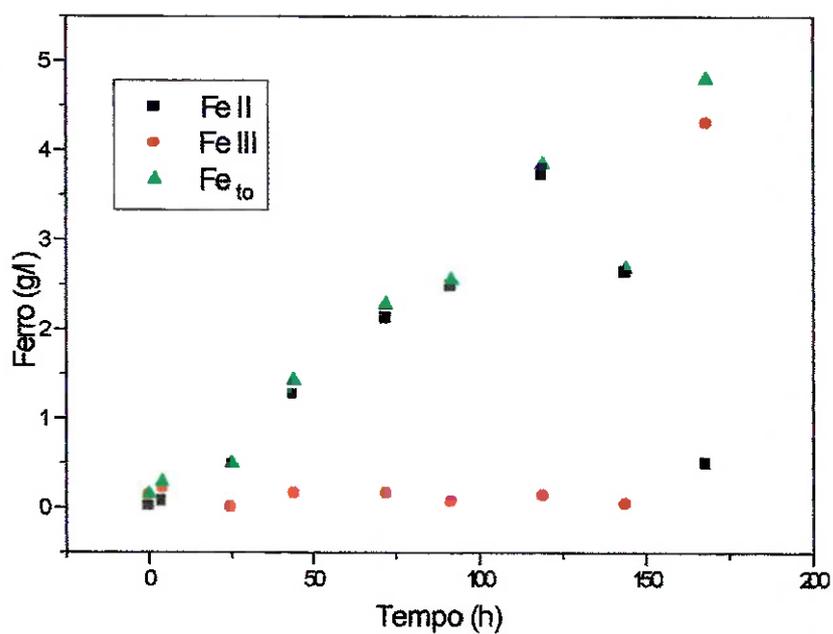


Figura 13. Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério (pH 1,9; temperatura 32,5 °C e 150 rpm)

A análise protêica revela a presença de um grande número de células aderidas ao substrato mineral depois da hidrólise alcalina da amostra mineral. A bactéria que não está ligada à superfície mineral não tem acesso ao substrato mineral e participa apenas do mecanismo indireto de oxidação.

Na figura 10, as células aderidas ao minério mostram um crescimento máximo no estágio inicial. O mesmo ocorre com o ferro solubilizado, que também atinge seu nível máximo (figura 13 e tabela 14), enquanto que as células livres apresentam pouco crescimento, atingindo crescimento máximo no estágio final da biolixiviação. Interessantemente, estes mesmos perfis observam-se nas curvas de solubilização e oxidação do ferro. Adicionalmente, a velocidade de dissolução decresce quando aumenta o tempo de biolixiviação.

Durante a biolixiviação, observou-se um progressivo decréscimo do íon ferroso, que corresponde à oxidação bacteriana. Observa-se o aumento de ferro total, mostrando que a concentração do ferro serve como um indicador do grau de lixiviação.

A maior quantidade de células aderidas à matriz sulfetada nos estágios iniciais, pode dever-se a que a bactéria prefere utilizar primeiro o sulfeto presente no minério porque o sulfeto poderia ser mais energético que o ferro. Adicionalmente, o sistema de oxidação de ferro poderia ficar inibido pela presença dos elementos sulfetados no estágio inicial da biolixiviação, o que poderia resultar num processo de desativação inicial, que poderia envolver o bloqueio de algum sítios ativos ligados à oxidação férrica. Isto parece ser confirmado pelos níveis baixos de Fe III no estágio inicial da bio-oxidação, apresentando uma fase lag prolongada (figura 12 e tabela 14).

Por outro lado o minério utilizado é composto principalmente por pirrotita e arsenopirita e, em menor proporção, por pirita. Esta mistura poderia mostrar interações galvânicas na solução e poderia converter-se numa fonte geradora de energia que seria utilizada pelas bactérias: O mineral com elevado potencial elétrico se converte em catodo e corrói o mineral com baixo potencial, que se converte em anodo. A pirita com potencial mais alto poderia atuar como catodo e os outros minerais como anodos (Ahonen, 1986; Fossi, 1990).

Na curva de bio-oxidação, figura 11, o crescimento do microorganismo foi inibido nos estágios iniciais (100 horas). Em estágios posteriores (150 horas) esta inibição não foi muito evidente. As células livres inicialmente mostram um crescimento inibido e apresentam uma fase lag prolongada, enquanto que as células aderidas mostram velocidade de crescimento lento até 50 horas, seguida de queda, provavelmente pela presença de metais tóxicos. O tempo requerido para completar a oxidação do ferro foi de aproximadamente 170 horas. Interessantemente, a concentração de íon férrico permanece constante no meio até 140 horas.

O balanço entre os íons ferroso e férrico na solução foi o resultado de duas reações, a oxidação do íon ferroso pela bactéria e a redução do íon férrico pelo mineral. Depois de poucos dias de lixiviação, a capacidade oxidativa das bactérias foi muito mais alta que a capacidade redutora do concentrado devido à carência de substrato sólido, como se mostra na figura 13 (tabela 16), o que indicaria um alto número de bactérias na fase líquida no estágio final da biolixiviação, figura 11.

Os resultados apresentados sugerem que a velocidade de lixiviação e a atividade oxidativa da bactéria são influenciadas significativamente pelo crescimento bacteriano na fase sólida e na fase líquida.

Os resultados também revelam que a velocidade de oxidação do ferro varia, dependendo da quantidade de substrato sólido presente no meio lixivante.

4.2.3. Efeito da concentração inicial do íon férrico

Estudou-se a influência do íon férrico na interação da célula-superfície sólida, durante a lixiviação bacteriana, na presença de diferentes quantidades de íon férrico (0, 25 e 250 ppm). As figuras 14A, 15A e 16A (tabelas 17A, 18A e 19A) mostram a conduta das células aderidas e livres em relação aos conteúdos de íons férricos.

As bactérias que não se ligam à superfície mineral apresentam baixo crescimento na presença de níveis altos de íon férrico durante a fase inicial de biolixiviação. Na fase final apresentam maior crescimento. Interessantemente isto parece refletir-se na proporção de oxidação do ferro.

A adição de íon férrico ao sistema lixivante reforça a proporção de extração durante a biolixiviação, enquanto inibe o crescimento inicial das células livres. Por

Tabela 17A - Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm no crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bactéria		
Tempo (h)	livre (mg/l)	aderida. (mg/g)
0	7,50	0,00
19	16,29	0,72
43	26,55	1,49
68	25,66	0,91
91	36,80	0,84
114	42,99	0,41
137	47,58	0,20

Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 17B - Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm na velocidade de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

sim bactéria				bactéria			
Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)	Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)
0	0,06	0,01	0,06	0	0,02	0,01	0,03
25,5	0,13	0,01	0,14	19	0,02	0,14	0,17
50	0,34	0,06	0,40	43	0,71	0,06	0,77
69	0,68	0,10	0,78	68	0,64	0,32	0,96
97	0,78	0,20	0,98	91	0,62	0,72	1,33
120	0,86	0,05	0,91	114	0,07	1,62	1,69
144	0,87	0,31	1,18	137	0,04	1,81	1,85

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 18A - Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm no crescimento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bactéria		
Tempo (h)	livre (mg/l)	aderida (mg/g)
0	7,82	0
3	5,10	--
24	11,38	0,76
65	9,56	0,95
89	20,34	0,90
104	54,84	0,77
134	62,43	0,31
149	60,31	0,38

Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 18B - Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm na velocidade de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

sim bactéria				bactéria			
Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)	Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)
0	0,09	0,27	0,36	3	0,01	0,14	0,15
25,5	0,30	0,05	0,35	24	0,05	0,33	0,38
50	0,49	0,04	0,54	42	0,55	0,57	1,12
69	0,70	0,12	0,81	65	0,68	0,77	1,45
97	0,88	0,13	1,02	89	0,74	1,10	1,84
120	1,09	0,06	1,14	104	0,16	2,10	2,26
144	1,09	0,03	1,12	134	0,08	2,29	2,37
				149	0,04	2,56	2,60

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 19A - Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm no crescimento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bactéria		
Tempo (h)	livre (mg/l)	aderida (mg/g)
0	7,82	0
24	12,85	0,75
42	--	1,74
65	11,42	1,60
89	19,55	1,95
104	45,82	1,55
134	49,71	1,11
149	58,37	0,17

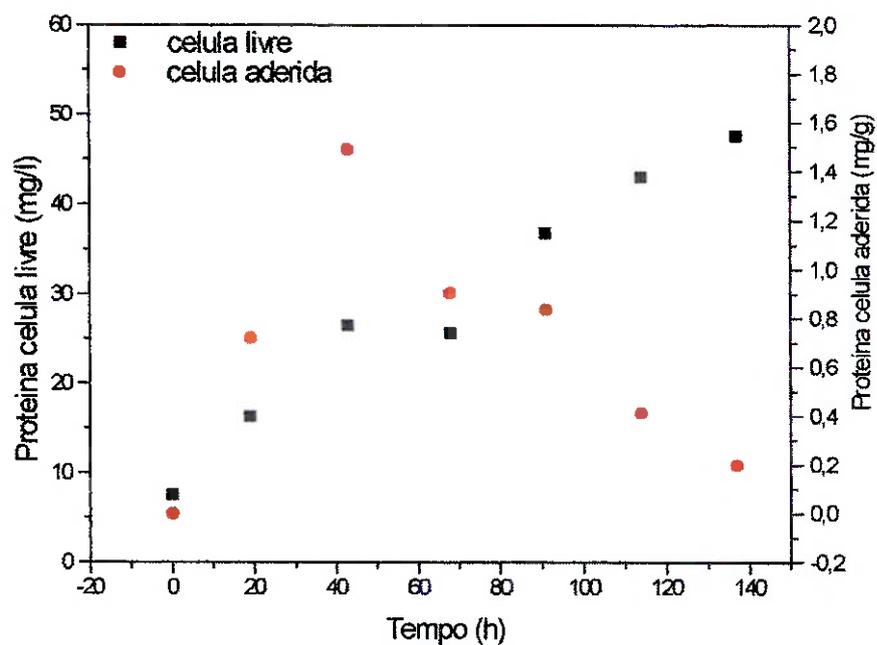
Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 19B - Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm na velocidade de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

sim bactéria				bactéria			
Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)	Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III (g/l)	Fe to (g/l)
0	0,09	0,28	0,36	0	--	--	0,25
25,5	0,30	0,05	0,35	3	0,04	0,49	0,52
50	0,49	0,04	0,54	24	0,21	0,46	0,67
69	0,70	0,12	0,81	42	0,86	0,58	1,44
97	0,88	0,13	1,02	65	0,98	0,55	1,53
120	1,09	0,06	1,14	89	1,12	1,17	2,30
144	1,09	0,03	1,12	104	1,11	1,53	2,64
				134	0,18	2,81	2,99
				149	0,05	2,16	2,21

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

A



B

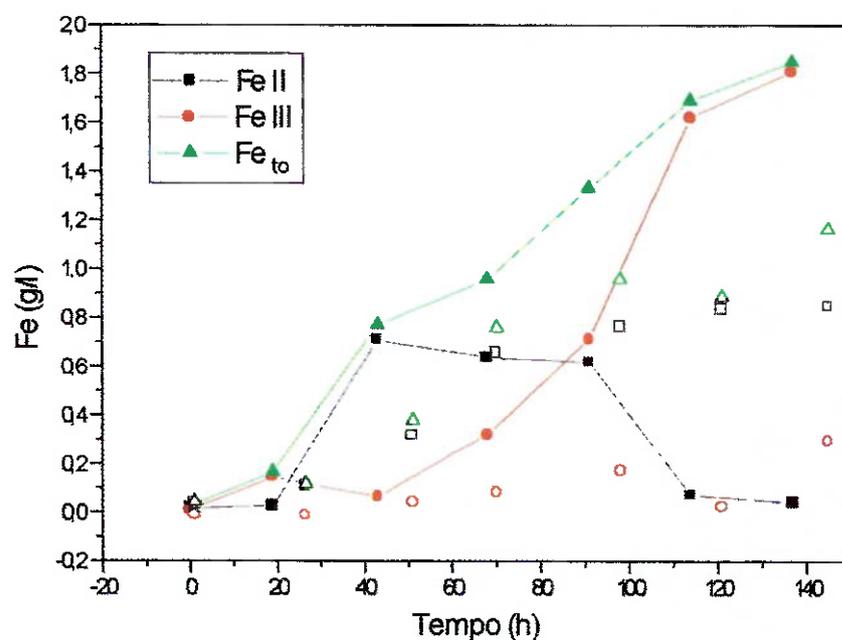
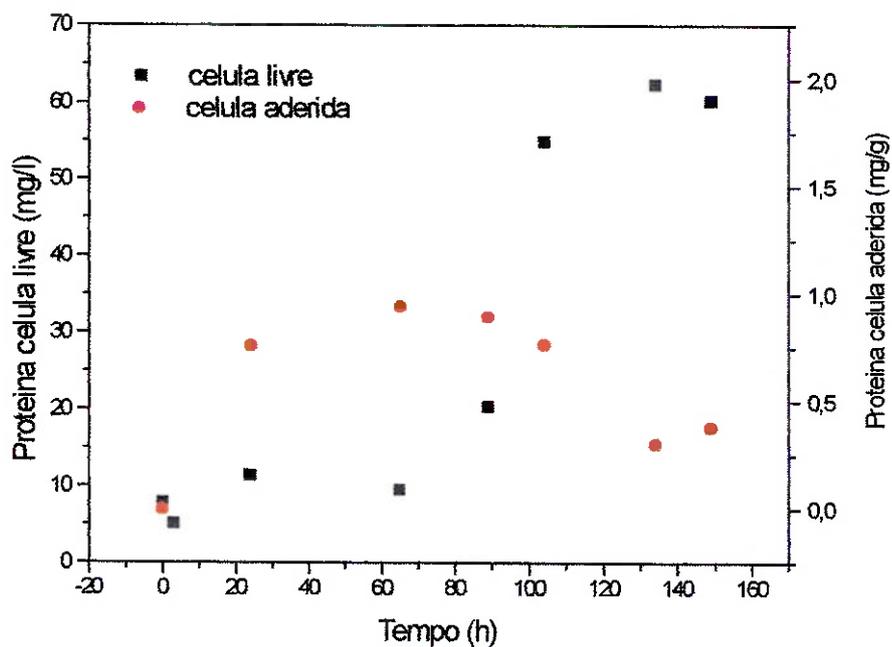


Figura 14. Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a uma proporção de carga sólido-líquida inicial de Mo/V (10g/L). Inóculo (7 mg/l), temperatura 32,5 °C, pH 1,8 e 150 rpm (símbolo aberto sem célula).

A



B

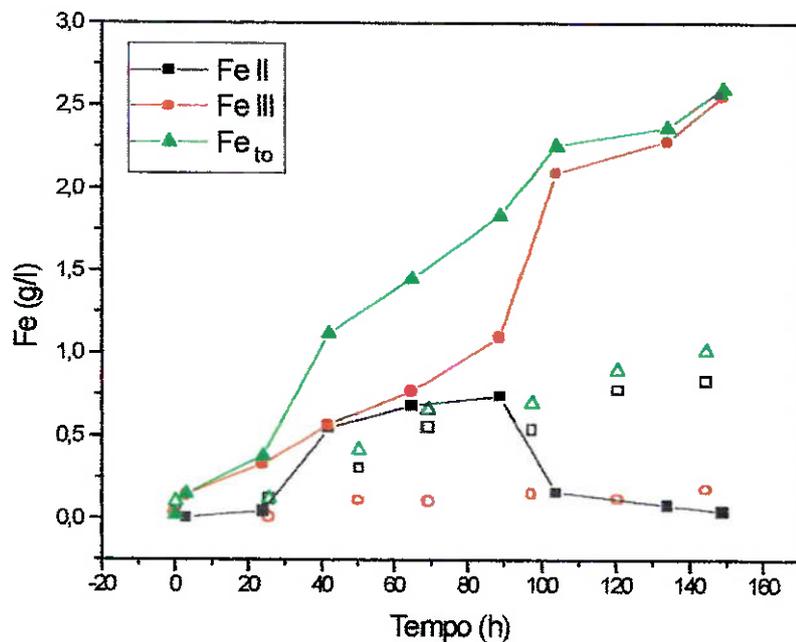
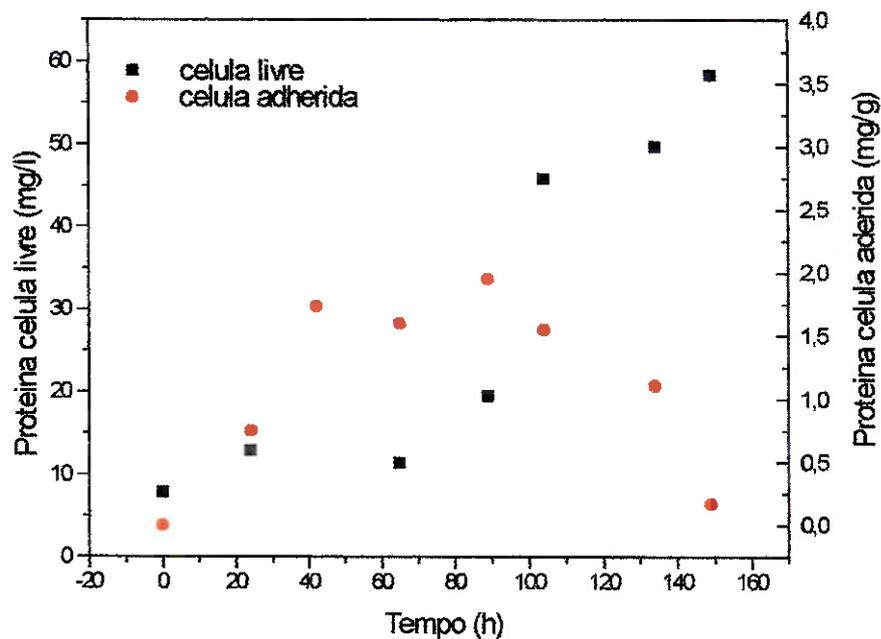


Figura 15. Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a uma proporção de carga sólido-líquida inicial de Mo/V (10g/L). Inóculo (7 mg/l), temperatura 32,5 °C, pH 1,8 e 150 rpm.

A



B

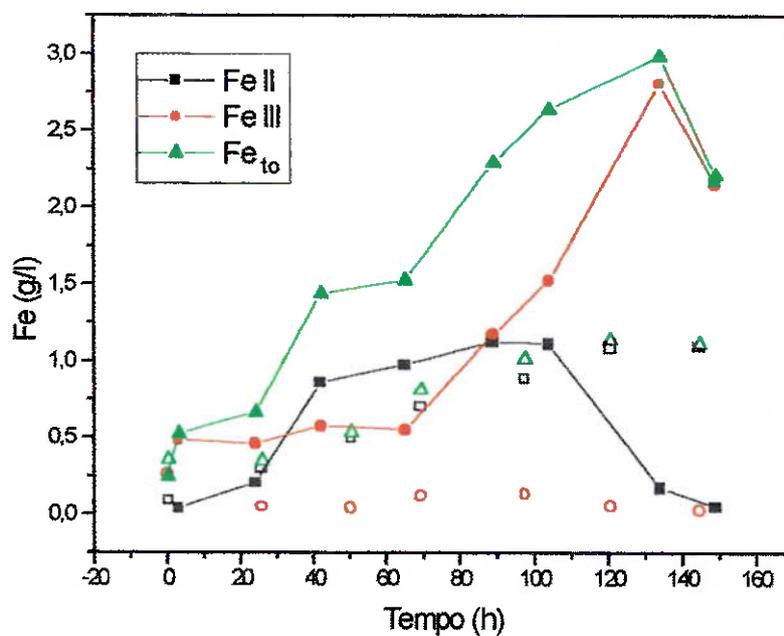


Figura 16. Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a uma proporção de carga sólido-líquida inicial de Mo/V (10g/L). Inóculo (7 mg/l), temperatura 32,5 °C, pH 1,8 e 150 rpm.

outro lado, o número de bactérias ligadas à superfície mineral foi maior na presença de concentrações elevadas de íon férrico. Contrariamente, a proporção da oxidação foi menor.

A figura 15A e tabela 18A mostra que, na presença de 25 ppm de íon férrico, as células aderidas apresentam crescimento máximo depois de 60 horas. No mesmo período, as células livres apresentam pouco crescimento, o que indica um período inicial de inibição e crescimento baixo. Isto é provavelmente devido à presença do íon férrico. Depois de 60 horas, as bactérias livres apresentam um crescimento mais rápido, alcançando a fase estacionária em 138 horas. Esta conduta parece ser refletida nos níveis do íon férrico, que mostram aumento rápido no último período de lixiviação. A dissolução do ferro na solução é atingida no tempo máximo de 90 horas.

Da mesma maneira, na figura 16A (tabela 19A), as células aderidas, na presença de 250 ppm de íon férrico, apresentam um crescimento máximo após 80 horas. Entretanto, as bactérias livres permanecem em níveis mínimos. Esta conduta parece ser refletida na solubilização e oxidação de ferro II. O crescimento das células livres não foi tão evidente na fase inicial. Depois de 60 horas, mostra um crescimento lento, alcançando a concentração máxima em 150 horas. Da mesma maneira o conteúdo de ferro III mostra um perfil similar, com um valor máximo de lixiviação em 130 horas, como se mostra na figura 16B.

A grande quantidade de células ligadas à matriz sulfetada na fase inicial da biolixiviação pode ser devida à inibição que poderia produzir um processo inicial de desativação da atividade oxidativa levando ao bloqueio de alguns pontos ativos. Isto parece ser confirmado pelos baixos níveis de Fe III na fase inicial da bio-oxidação, apresentando uma fase lag (figuras 14B, 15B e 16B).

O balanço entre os íons ferroso e férricos na solução foi resultado de duas reações, a oxidação do íon ferroso pelas bactérias e a redução do íon férrico pelo mineral. Depois de alguns dias de lixiviação, a capacidade oxidativa das bactérias era mais elevada do que a capacidade redutora devido à falta de substrato sólido. Isto deve indicar um número elevado de bactérias na fase líquida na fase final de biolixiviação, figura 14A, 15A e 16A.

Estes resultados sugerem que a velocidade de lixiviação e a atividade oxidativa das bactérias são principalmente influenciadas pelo crescimento bacteriano nas fases líquida e sólida.

Os resultados indicam um efeito inibidor no crescimento das células livre. Esta inibição indica baixa oxidação. Isto sugere que, para o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, o crescimento celular depende do conteúdo do íon férrico. Também se observa que esta conduta pode estar relacionada ao estado fisiológico, como evidencia o tempo de retardo maior da bactéria livre. Por conseguinte, há relação entre a concentração do íon férrico e a velocidade de biolixiviação (Susuki et al., 1989). A presença de íon férrico também influi na concentração das bactérias aderidas. A proporção de biolixiviação parece ser aumentada quando o meio contém íons férrico em níveis baixos.

4.2.4. Influência do pH

O *Acidithiobacillus* cresce normalmente em uma gama de pH de 1,5 a 4,5 (Amaro et al., 1991). Os pHs menores apresentariam um problema para a bactéria manter seu pH citosólico perto de 7 (Cox et al., 1979). Para isto, a bactéria gera um gradiente de pH que é quase completamente dependente da bomba de próton por uma membrana próton-impermeável (Amaro, 1991).

A oxidação biológica de ferro e de íon ferroso envolve o movimento de íons de hidrogênio e elétrons. Então, o pH mostra um efeito importante sobre o metabolismo (Oliver et al., 1988). Vários autores concordam que os níveis ótimos para evitar inibição e precipitação são 1,7 e 2,0 (Lundgren e Silverman, 1980).

Por outro lado, a bactéria produz ácido durante seu crescimento. Portanto, é indispensável que o pH do meio seja mantido, para assegurar que o pH não alcance valores inibitórios (valores inferiores a 1,5 inibem a atividade bacteriana).

As figuras 17A e 17B (tabelas 20A e 20B) mostram os resultados da biolixiviação em condições extremas de pH 1,4. Mostram que ambas células, livres e aderidas, apresentam pouco desenvolvimento durante o período de lixiviação. O crescimento das células provavelmente parou depois de 50 h devido a pequenas quantidades de material tóxico na amostra mineral. De forma interessante, as células

Tabela 20 - Efeito do pH inicial 1,4 no crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bactéria		
Tempo (h)	livre (mg/l)	aderida (mg/g)
0	7,5	0
19	14,88	0,61
43	20,54	0,32
68	19,12	0,48
91	20,36	0,41
114	17,00	0,28
137	20,19	0,38
162	34,15	0,90

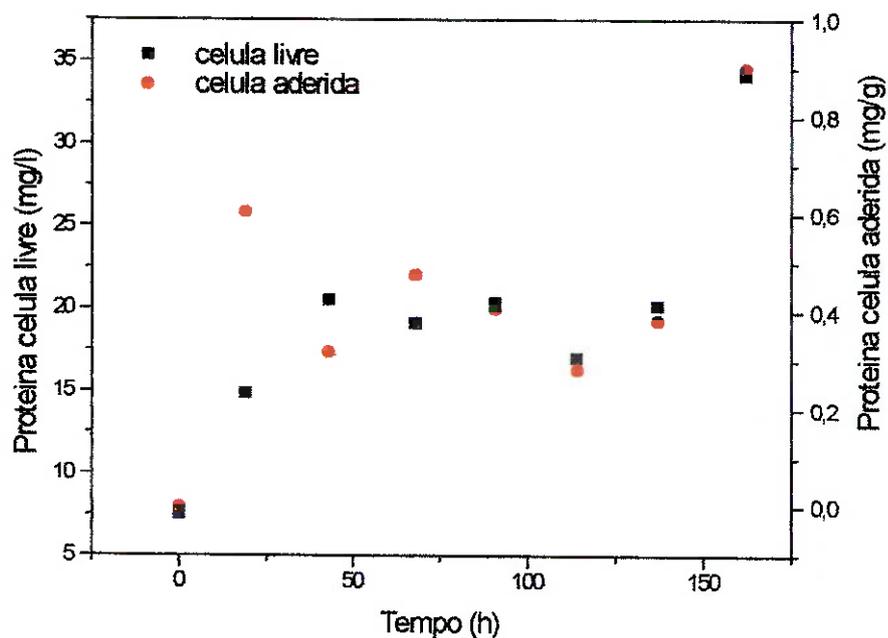
Desvio Padrão: 0,37565; R: 0,99877

Tabela 20B - Efeito do pH inicial 1,4 na velocidade da biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

sim bactéria				bactéria			
Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III g/l)	Fe to g/l)	Tempo (h)	Fe II (g/l)	Fe III g/l)	Fe to g/l)
0	0,07	0,04	0,10	0	0,02	0,01	0,03
25,5	0,48	0,02	0,50	19	0,39	0,12	0,51
50	0,79	0,06	0,85	43	0,57	0,14	0,71
69	0,52	0,13	0,65	68	0,66	0,23	0,89
97	1,09	0,09	1,18	91	1,03	0,19	1,22
120	1,25	0,15	1,40	114	1,03	0,35	1,37
144	1,03	0,44	1,47	137	1,09	0,30	1,38
168	1,45	0,11	1,56	162	0,87	0,80	1,68

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

A



B

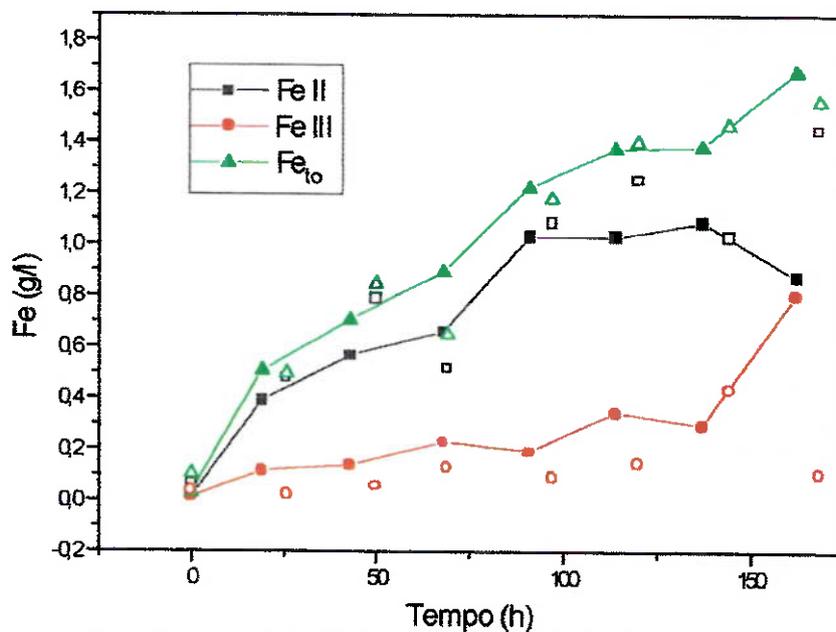


Figura 17. Efeito do pH inicial 1,4 na velocidade da biolixiviação e no crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a uma proporção de carga sólido-líquido inicial de Mo/V (10g/L). Inóculo (7 mg/l), temperatura 32,5 °C, e 150 rpm (símbolo aberto sem célula).

livres mostram um crescimento rápido no período final de lixiviação, que parece ser evidenciado pelo aumento rápido de íon férrico, podendo indicar um aumento da tolerância às condições ácidas.

A contribuição das bactérias à lixiviação foi relativamente baixa, mostrando pouca oxidação. O alto conteúdo de ferro solúvel não depende do crescimento inicial das bactérias porque apresentou alta solubilidade de ferro em meio ácido e uma quantia mínima de ferro oxidado. Isto é comprovado durante a lixiviação em ausência de bactérias, onde a solubilização de ferro é alta em pH baixo e não apresenta oxidação (figura 17B).

Contrariamente aos resultados mostrados na figuras 14A e 14B, onde a operação é feita em pH 1,8, o conteúdo celular é duas vezes superior aos valores achados no pH 1,4. Além disso, mostra desempenho melhor e maior quantidade de crescimento celular. Da mesma forma foi observado, que a fase lag do íon férrico toma um tempo mais curto, próximo a 40 horas.

As experiências têm mostrado que o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, em condições críticas de pH, mostra baixo crescimento. Isto pode ser devido à provável variação na membrana celular dependente da condição estressante.

Estes resultados confirmam que o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* é inibido em pH inferior a 1,5, como foi mostrado em trabalhos anteriores (Lundgren et al., 1980). Eles também confirmam que isto pode acontecer em correlação com o estado fisiológico, comprovado pelo retardo no crescimento das células. Além, disto pode ser refletido nos níveis celulares das bactérias aderidas e livres.

Eles também sugerem que o pH afeta o crescimento da célula e pode estar relacionado com as mudanças na superfície bacteriana, que poderiam ser refletidas na atividade celular de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta relação poderia estar relacionada ao pH intracelular, especialmente quando o pH externo varia (Cox et al., 1979).

Por outro lado, nas condições de alta acidez extracelular, o *Acidithiobacillus ferrooxidans* cresce mais lentamente e mantém seu pH intracelular perto de 7. Além disso, quando o *Acidithiobacillus* sofre alterações de pH durante o seu crescimento,

várias mudanças acontecem nos padrões da síntese de suas proteínas (Amaro et al., 1991). Algumas proteínas associadas à membrana celular mostram uma diminuição em sua síntese depois de uma mudança do pH extracelular.

Deveria ser mencionado que trabalhos prévios mostraram variações fisiológicas na membrana celular associada com a atividade celular (Yeh et al., 1987, Ohmura et al., 1996).

4.2.5. Influência dos reagentes de flotação no crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Para os microrganismos autótrofos, a matéria orgânica é potencialmente inibitória ao crescimento, levando a baixas taxas de dissolução e lixiviação. Diminui a atividade bacteriana afetando a eficiência de lixiviação. O processo de biolixiviação decresce, portanto, na presença de pequenas quantidades de agentes de flotação. Os compostos orgânicos têm um efeito inibitório sobre o crescimento e a oxidação do ferro ferroso pela bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Frattini, 2000).

A influência dos compostos orgânicos sobre a oxidação de íon ferroso foi estudada para determinar sua influência no processo global de biolixiviação. Para isto, realizou-se uma série de ensaios para determinar os níveis inibitórios dos xantatos, em meio basal (T&K), usando sulfato ferroso como fonte de energia.

Os compostos de flotação foram considerados dentro dos estudos de biolixiviação pois o processo de biolixiviação freqüentemente segue a flotação.

Para cada uma das concentrações estudadas de xantato (potássio), o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi diminuído, principalmente na presença do etil xantato (Figuras 18A e 18B e tabelas 21A e 21B).

Em ausência de coletor, a bactéria atinge crescimento máximo num período de 23 horas, enquanto que em baixas concentrações de xantato, principalmente, na presença de amil e iso-propil (concentrações de 50 e 100 mg/l) atinge o máximo crescimento num tempo maior, 38 horas depois de período inicial de inibição, 20 e

Tabela 21A - Efeito dos reagentes de flotação sobre o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Absorbância @ 600 nm						
Tempo (h)	controle (g/l)	amil xantato (g/l)		isopropil xantato (g/l)		etil xantato (g/l)
	0,00	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05
0	0,03	--	--	--	--	--
32	0,41	0,50	0,26	0,22	0,13	0,04
60	--	--	--	--	--	0,02

Tabela 21B - Efeito dos reagentes de flotação sobre o processo de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (h)	controle (g/l)		amil xantato (g/l)		
	0,00	0,05	0,10	0,05	0,10
0	0,01	--	--	--	--
7	1,26	0,82	0,52	--	--
16	3,06	2,70	--	--	--
23	6,36	4,18	0,43	--	--
38	5,47	5,83	2,62	--	--
46	--	--	3,51	0,09	0,09
62	--	--	5,99	0,25	0,06
86	--	--	--	--	--
110	--	--	--	--	--
118	--	--	--	--	--
152	--	--	--	--	0,28
176	--	--	--	0,86	--

Tempo (h)	isopropil xantato				etil xantato			
	(g/l)		(g/l)		(g/l)		(g/l)	
	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05	0,10
0	--	--	--	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	0,73	0,45	--	--
16	--	--	--	--	1,35	--	--	--
23	--	--	--	--	1,27	1,29	--	--
38	0,02	0,26	--	0,44	3,42	1,37	0,18	0,28
46	--	0,79	--	--	5,04	2,33	--	0,28
62	0,23	0,81	0,09	--	6,30	4,42	0,34	--
86	1,38	0,72	0,23	0,57	--	--	1,51	--
110	4,45	0,92	--	--	--	--	5,38	--
118	6,37	0,96	0,23	--	--	--	6,18	--
152	--	1,56	--	0,81	--	--	--	--
176	--	3,63	0,57	--	--	--	--	0,50
182	--	5,85	--	--	--	--	--	--

Desvio Padrão: 0,01586; R: 0,99994

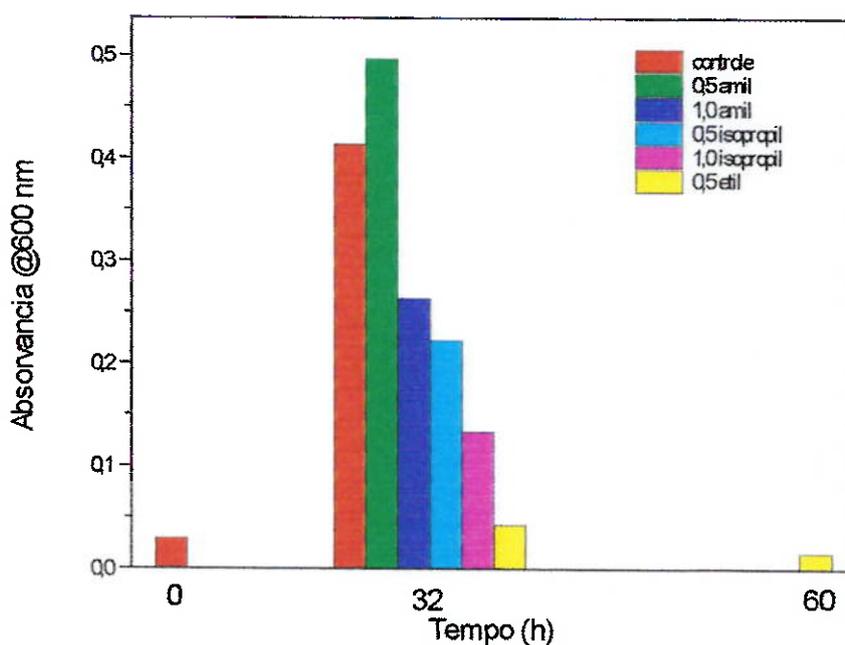


Figura 18A. Efeito dos reagentes de flotação sobre o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Inóculo 0.46 ml de DO 2,2 a 600 nm, temperatura 32,5 °C, pH 1,70 a 150 rpm.

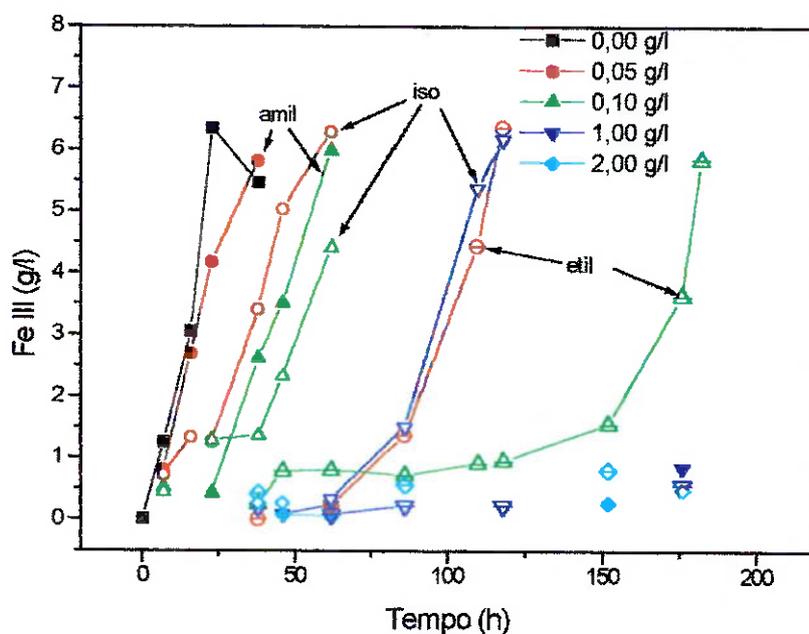


Figura 18B. Efeito dos reagentes de flotação sobre o processo de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Na seqüência amil, iso-propil e etil xantato. Inóculo 0,46 ml de DO 2,2 a 600 nm, temperatura 32,5 °C, pH 1,70 a 150 rpm.

40 horas mais que o meio sem coletor. Durante o período final, as bactérias mostram crescimento rápido indicando tolerância à presença de xantato.

Em baixas concentrações, o amil e o isopropil xantato apresentam menor toxicidade com relação ao etilxantato que, na mesma concentração, mostra elevada toxicidade e apresentam um período inicial de inibição maior (60 horas para 50 mg/l e o dobro do período para 100 mg/l).

Na presença de doses maiores que 1 g/l os reagentes de flotação produzem inibição do crescimento bacteriano. Conseqüentemente, nota-se a ausência de oxidação férrica com exceção do isopropil, que mostra ter menor efeito tóxico.

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostra capacidade de adaptação alta, como mostram os resultados. Dependendo da toxicidade dos compostos ele pode usar sua capacidade metabólica de adaptação que lhe permite sobreviver e adaptar-se às condições variáveis.

Os reagentes de flotação produzem inibição do crescimento bacteriano, principalmente em concentrações maiores que um 1 g/L. Em baixas concentrações produzem uma fase inicial de inibição do crescimento e na fase final, crescimento rápido. Nestas condições, as bactérias parecem desenvolver elevada tolerância aos compostos orgânicos.

4.2.6. Influência dos reagentes de flotação sobre a aderência do *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A aderência bacteriana à superfície mineral desempenha um papel importante na dissolução mineral. Para observar a influência dos reagentes de flotação sobre a capacidade de aderência de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram realizados experimentos com o substrato mineral em presença de quantidades crescentes de compostos orgânicos.

A presença de xantatos pode bloquear a aderência da bactéria (figura 19 e tabela 22). Este fato foi corroborado em baixas e altas concentrações dos reagentes de flotação. Foi observado que depois de duas horas de contato celular a porcentagem de aderência bacteriana diminui.

Tabela 22 - Efeito dos reagentes de flotação sobre a capacidade de aderência de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

amil xantato				
	0,0 g/L	0,1 g/L	1,0 g/L	2,0 g/L
Proteína inicial	0,29	0,29	0,29	0,29
Proteína final	0,22	0,27	0,23	0,24
% aderido	26,37	6,85	20,21	19,18

etil xantato				
	0,0 g/L	0,1 g/L	1,0 g/L	2,0 g/L
Proteína inicial	0,29	0,29	0,29	0,29
Proteína final	0,22	0,25	0,25	0,23
% aderido	26,37	14,38	14,38	19,86

isopropil xantato				
	0,0 g/L	0,1 g/L	1,0 g/L	2,0 g/L
Proteína inicial	0,29	0,29	-	0,29
Proteína final	0,22	0,28	-	0,25
% aderido	26,37	5,82	-	13,01

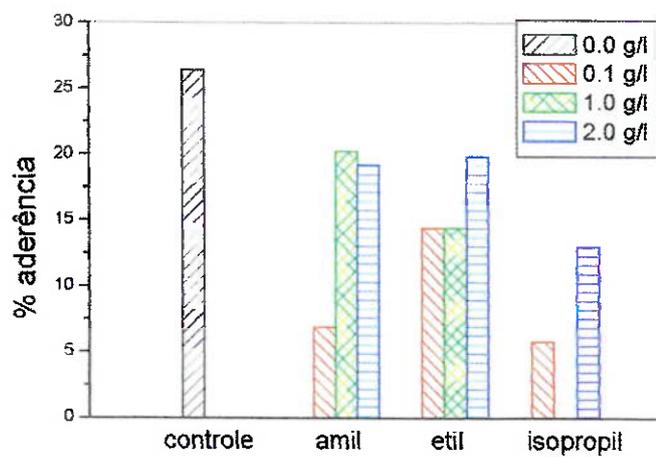


Figura 19. Influencia dos reagentes de flotação sob a capacidade de aderência de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Inoculo 0,45 ml de OD 2,4 λ 600nm, temperatura 32,5 C, pH 1,8 e 150 rpm

A aderência de *Acidithiobacillus* foi diminuída pela presença dos compostos orgânicos, resultando na diminuição da oxidação mineral, como será visto mais adiante.

4.2.7. Influência dos reagentes de flotação no processo de biolixiviação em bioreator Airlift

Na presença de xantato, a superfície de mineral é coberta por uma camada orgânica que pode bloquear a aderência de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Para evitar a toxicidade dos xantatos residuais nos microorganismos, os minérios concentrados por flotação devem ser primeiramente lavados com solventes ou tratados com solução ácida de biolixiviação.

Para avaliar a influência dos xantatos na biolixiviação usou-se a amostra mineral de flotação com e sem tratamento prévio com a solução biolixivante.

Na presença de compostos de flotação (200 mg/kg de mineral), a velocidade de biolixiviação diminui. Contrariamente, na ausência deles aumenta a velocidade de lixiviação bacteriana.

Para 2 dias de pré-tratamento (com solução biolixivante) para 18 % de sólidos para uma vazão de ar menor (8 L/min), melhora o desempenho, diminuindo o período de lixiviação até 4 dias, com elevada solubilização e oxidação, atingindo 30 g/l de ferro solúvel em solução, como mostra a curva de crescimento bacteriano (figura 20B e tabela 23). De forma semelhante, a massa celular atinge níveis maiores até 120 mg/L (figura 20A e tabela 23).

Curiosamente, na presença de mineral flotado (18 %), sem tratamento prévio de solução biolixivante, verifica-se baixa solubilização e lixiviação de ferro num período de 7 dias. Adicionalmente, uma fase lag acentuada é observada, devido à limitação da aderência bacteriana inicial.

Em condições semelhantes, para uma massa celular inicial duas vezes maior que a utilizada na etapa inicial, observa-se a diminuição da massa celular progressiva. Isto pode explicar-se pela dificuldade da aderência das células no mineral, provavelmente devido ao efeito tóxico do reagente de flotação, que poderia

Tabela 23A - Influência da presença de reagentes de flotação na superfície mineral sobre o processo de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (dias)	Pre-tratado		Não tratado		Não tratado	
	Fe II (g/l)	Fe to (g/l)	Fe II (g/l)	Fe to (g/l)	Fe II (g/l)	Fe to (g/l)
0	7,82	9,24	6,41	9,06	8,33	10,51
1	11,78	13,97	10,53	10,62	--	--
2	16,04	16,04	13,23	13,90	11,58	12,46
3	13,40	20,51	16,19	16,43	--	--
4	12,42	30,92	18,43	19,57	17,59	17,18
5			18,60	21,63	--	--
6			18,81	22,60	19,40	23,09
7			--	--	18,19	24,95

Desvio Padrão do ferro: 1,000826; R: 0,99836

Tabela 23B - Influência da presença de reagentes de flotação na superfície mineral sobre o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tempo (dias)	Massa celular (mg/L)		
	Pre- tratado	Não tratado	Não tratado
0	20	12	34
1	12		28
2	57	16	16
3	117		
4	114	12	
5			24
6		52	58
7		108	

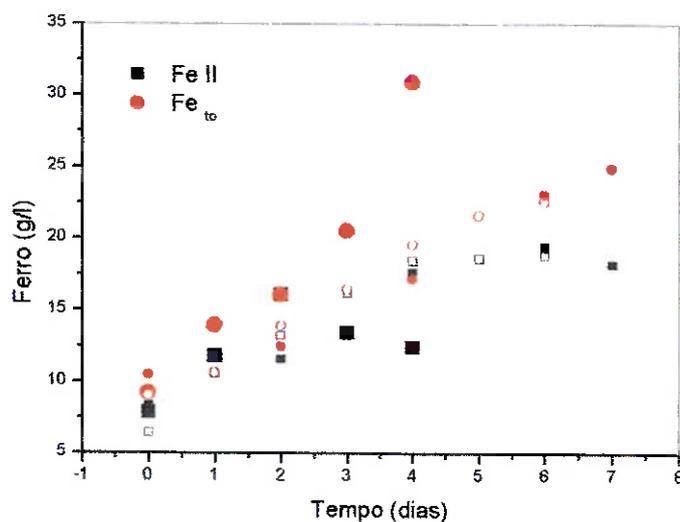


Figura 20A. Influência dos reagentes de flotação sobre o processo de biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Inóculo 30 (símbolo fechado), 45 % (v/v), vazão de ar 8 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7; Símbolo: maior, mineral pre-tratado; menor mineral não tratado.

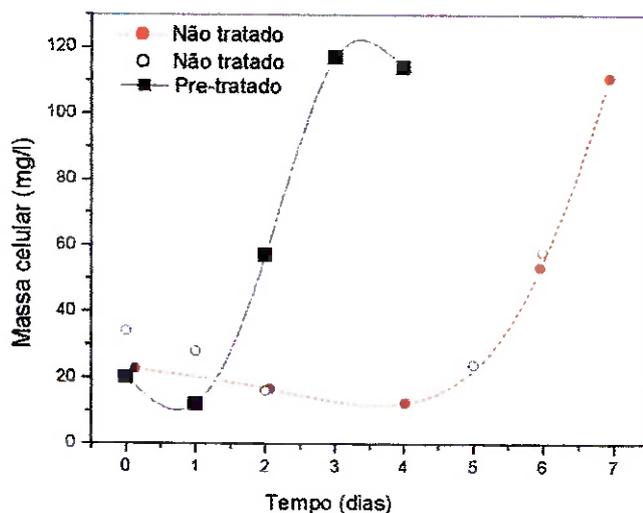


Figura 20B. Influência dos compostos de flotação sobre o crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Inóculo 30, 45 % (v/V), pH 1,7, % de sólidos 18, temperatura 32,5 °C, vazão de ar 8 l/min.

induzir mudanças na superfície celular (figura 20A e tabela 23B), impedindo a aderência na superfície mineral.

A redução na aderência entre a bactéria e a superfície mineral parece ter um efeito adverso sobre a velocidade da dissolução mineral durante o processo de biolixiviação (figura 20B). Isto poderia sugerir que a oxidação direta é o principal mecanismo para a dissolução mineral.

Por outro lado, na etapa final, observam-se quantidades mínimas de oxidação e rápido crescimento bacteriano, indicando tolerância do *Acidithiobacillus ferrooxidans* à presença de compostos orgânicos de flotação.

O *Acidithiobacillus ferrooxidans* pode experimentar modificações metabólicas dependendo do meio de crescimento (Rojas Chapana, 1998). Modificações na membrana celular ajudam na adaptação às diferentes condições ambientais.

Os resultados mostram que, na presença de reagentes de flotação, o crescimento celular do *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi inibido, a solubilização foi limitada e a atividade oxidativa foi diminuída conduzindo a uma diminuição da lixiviação bacteriana.

4.3. Ensaios preliminares em bioreator Airlift

Foram feitos ensaios exploratórios em reator Airlift em diferentes condições de operação com o objetivo de determinar as melhores condições de trabalho durante a lixiviação bacteriana do concentrado refratário de ouro. Estes ensaios foram planejados sobre a base dos principais fatores que influenciam os processos da biolixiviação conforme reportados na literatura. As variáveis consideradas foram volume de inóculo, concentração de sólidos, vazão de ar e tempo de residência.

Os perfis de lixiviação foram comparados para estabelecer as condições favoráveis de lixiviação. A seleção dos faixas de trabalho foi avaliada pela capacidade de solubilização da cultura bacteriana em função do tempo.

A figura 21 e tabela 24 mostram a curva de biolixiviação em reator Airlift à vazão de ar de 12 L/min, da célula adaptada de *Acidithiobacillus ferrooxidans* à

presença de 15 % de sólidos minerais. A solubilização de ferro na etapa inicial é alta, contrariamente, a solubilização de arsênio é mínima, atingindo no final da lixiviação níveis menores que 5 g/l. No período final observa-se uma elevada atividade oxidativa. O período de lixiviação foi de 14 dias. A adição de amostra mineral no período exponencial final produz um aumento de liberação de ferro, mantendo-se os níveis de oxidação.

De forma semelhante, na presença de 17 % de sólidos, vazão de 10 L/min e com 15 % (V/V) de inóculo (figura 22A e tabela 24A), observa-se que os perfis de solubilização são bastante parecidos. Adicionalmente o período de biolixiviação é muito menor (7 dias), apresentando maior atividade oxidativa na etapa final. O arsênio solúvel mantém-se em níveis mínimos menores a 5 g/L. Pode observar-se que parte do arsênio solubilizado é precipitado.

Por outro lado, o crescimento bacteriano das células livres mantém-se inibido na fase inicial de lixiviação (figura 22B e tabela 25B); após este período, a célula passa por um crescimento rápido que parece ser refletido na atividade oxidativa. A massa celular atinge um valor de quase 70 mg/L.

Da mesma forma, para 17 % de sólidos à vazão de ar de 12 L/min e com 30 % (V/V) de inóculo, observa-se eficiência maior na solubilização e atividade oxidativa durante o tempo de lixiviação (figura 23A e tabela 26A), comparada com vazão de 10 L/min da figura 22A. Interessantemente, a fase inicial de inibição é muito menor, indicando aumento da adaptação da bactéria ao substrato sólido. Por outro lado, apresenta maior crescimento bacteriano. Parece que os níveis de arsênio aumentam rapidamente na etapa final de lixiviação atingindo valores máximos. Neste caso, alcançou-se um valor de 8 g/L (na figura 23A fora obtido um valor próximo de 6 g/l).

A figura 24A e tabela 27A (18 % de substrato mineral, vazão de 12 L/min e 15 % (V/V) inóculo), mostra o mesmo perfil de solubilização dos testes anteriores, por outro lado, apresenta maior solubilização de ferro na fase inicial, já na fase final apresenta maior atividade oxidativa.

Aumentando o fluxo de ar, somado à adaptação bacteriana, obtém-se maior eficiência da lixiviação com alta porcentagem de solubilização e oxidação mineral.

Tabela 24 - Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Fe II (g/l)	Fe to (g/l)	As (g/l)
0	1,03	1,39	--
0,6	2,65	2,77	--
2,6	4,42	5,05	0,34
3,6	6,26	6,56	--
4,6	8,05	8,15	--
5,6	9,83	10,83	0,59
7,6	14,58	18,00	1,22
10	14,09	16,61	1,55
12	13,48	24,50	2,46
13	11,03	28,14	2,29

Desvio Padrão do ferro: 0,01586; R: 0,99994

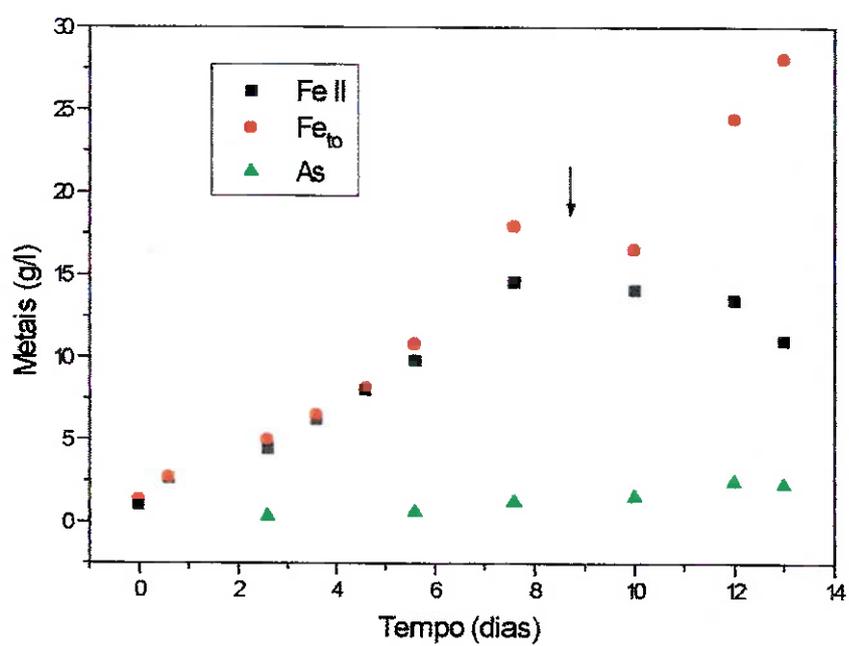


Figura 21. Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 15 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*, com a adição de 150 g. de minério (seta). Inóculo 10 % (v/v), pH 1,7, vazão de ar 12 l/min, temperatura 32 °C.

Tabela 25A - Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Fe II (g/l)	Fe _{to} (g/l)	As _{sot} (g/l)	As _{to} (g/l)
0	3,54	4,46	0,44	--
0,5	5,88	6,38	--	--
1,5	6,97	7,00	0,60	--
2,5	8,07	9,52	--	--
3,5	9,47	14,27	--	3,96
4,5	15,36	22,09	--	--
5,5	17,30	24,52	2,71	4,62
6,5	14,72	21,04	3,44	5,88

Desvio Padrão do ferro: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 25B - Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Células (mg/l)
0	14,50
3,5	30,90
5,5	70,90
6,5	68,20

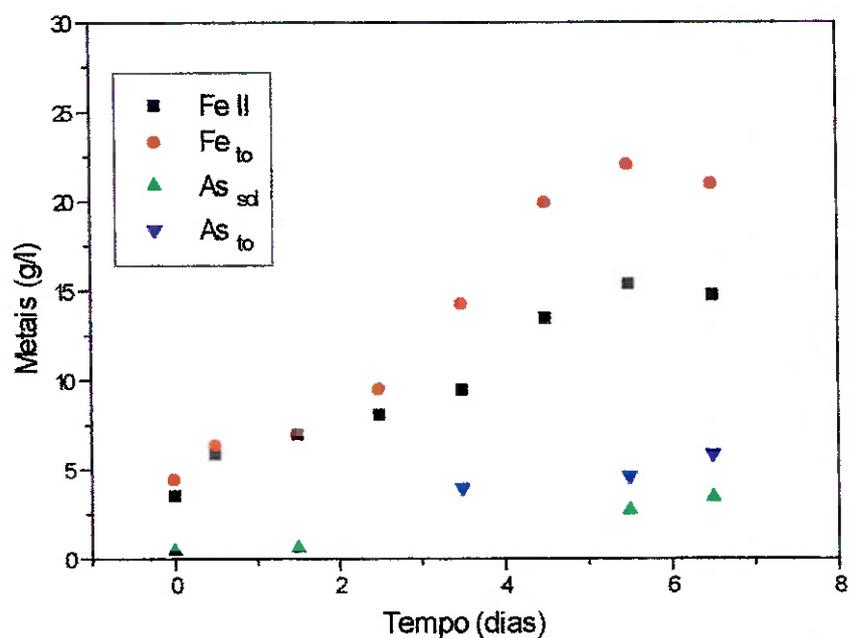


Figura 22A. Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 15 % (V/V), vazão de ar 10 l/min, % de sólidos 17, temperatura 32.5 °C e pH 1,7.

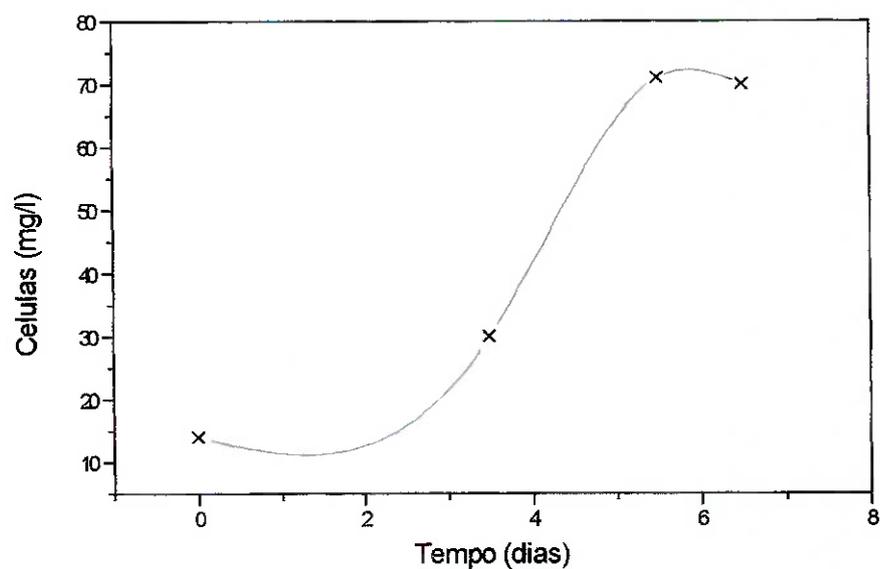


Figura 22B. Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 15 %, vazão de ar 10 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

Tabela 26A - Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo	Fe II (g/l)	Fe _{to} (g/l)	As _{sol} (g/l)	As _{to} (g/l)
0	6,61	9,91	0,55	--
0,5	7,89	9,13	--	--
1,5	10,21	10,56	0,58	--
2,5	--	--	--	--
4	16,61	17,54	0,83	1,79
4,7	--	--	--	--
5,7	13,41	27,66	1,54	5,43
7	12,02	34,49	--	--
7,8	7,24	32,61	2,10	8,20

Desvio Padrão do ferro: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 26B - Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Células (mg/l)
0	18,60
1,5	22,00
4	43,60
5,7	75,00
7,8	70,50

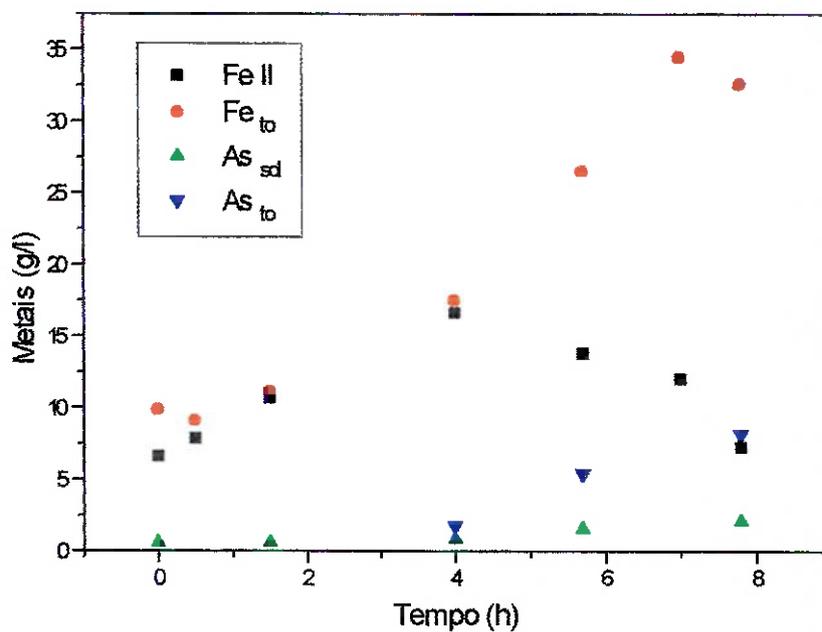


Figura 23A. Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 30 % (v/v), vazão de ar 12 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

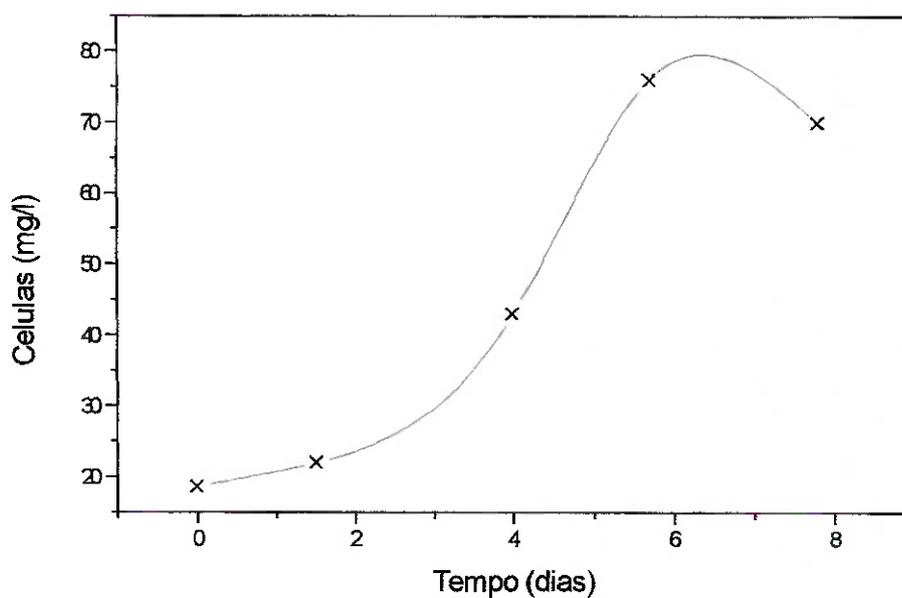


Figura 23B. Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 17 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 30 % (v/v), vazão de ar 12 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

Tabela 27A - Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 18 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Fe II (g/l)	Fe _{to} (g/l)	As (g/l)
0	3,68	4,01	1,01
1	--	--	--
2	8,18	8,34	--
3	14,8	15,44	--
4	18,5	19,51	2,64
5	19,3	21,57	--
6	--	--	--
7	16,76	26,82	4,42

Desvio Padrão do ferro: 0,01586; R: 0,99994

Tabela 27B - Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 18 % de substrato mineral em bioreator *Airlift*

Tempo (dias)	Células (mg/l)
0	15
2	15,5
5	55
6	67
7	70

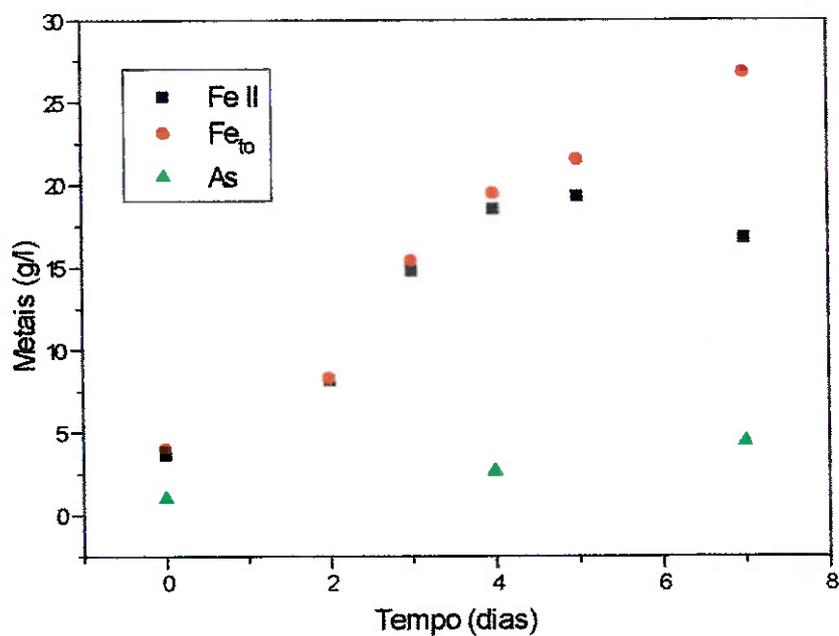


Figura 24A. Perfil de bio-oxidação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 18 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 15 % (v/v), vazão de ar 12 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

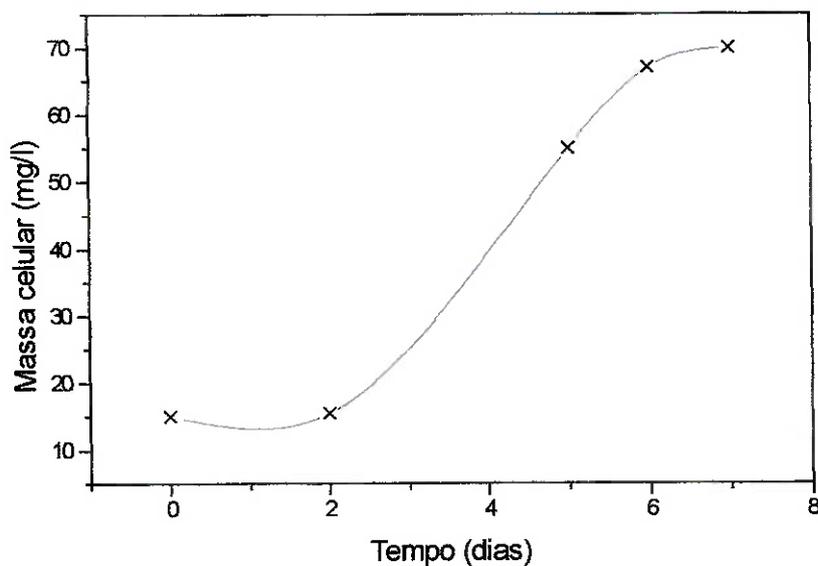


Figura 24B. Perfil de crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em 18 % de substrato mineral em biorreator *Airlift*. Inóculo 15 % (v/v), vazão de ar 12 l/min, temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

A porcentagem de sólidos poderia ser levemente aumentada sempre que a célula bacteriana esteja adaptada para essas condições. O aumento da porcentagem de sólidos 17 para 18 produz uma diminuição nos níveis de solubilização e oxidação do ferro (figuras 23 e 24).

Pelos resultados obtidos observa-se que o perfil de crescimento máximo, está entre 5 e 8 dias, da mesma forma observa-se que o perfil ótimo de bio-oxidação para o ferro está entre 5 e 8 dias, por outro lado os níveis de arsênio não mostram mudança significativa entre 5 e 14 dias (figuras 21, 22, 23 e 24).

Como mostram os resultados, é difícil avaliar isoladamente a influência da vazão de ar e da porcentagem de sólidos porque estão ligadas diretamente às adaptações da bactéria. Para quebrar esta dependência será necessário fazer uso do planejamento experimental, teste fatorial aleatório, que vai permitir determinar quais as variáveis que influenciam o processo e quantificar a sua influência.

O tamanho de inóculo não parece influenciar o processo dentro da faixa utilizada (figuras 21B, 22B, 23B e 24B), mas a adaptação parece ter um papel importante no processo de biolixiviação, como mostram os resultados.

4.4. Planejamento experimental

Usando o planejamento fatorial de experimentos, foram avaliados os fatores que influenciam o processo de biolixiviação sobre a quebra da matriz sulfetada para aumentar a extração de ouro no processo convencional de cianetação.

Foram estudadas oito combinações possíveis das variáveis controláveis, em forma aleatória. Os níveis utilizados, encontrados em testes prévios, são mostrados na tabela 4.

Tabela 28. Planejamento fatorial

Testes aleatórios	Sólidos (%)*	Vazão (L/min)	Tempo (dias)
5	18	12	7
3	16	12	7
6	16	8	7
8	18	8	7
7	18	12	5
4	16	12	5
1	16	8	5
2	18	8	5
9	17	10	6
10	17	10	6
11	17	10	6

* peso/volume

Crescimento bacteriano

Nas figuras 26, 31 e 32, o crescimento bacteriano geralmente mostra maior período lag na presença de maiores conteúdos de sólidos, apresentando diminuição do crescimento bacteriano durante o período inicial da biolixiviação, quando aumenta a porcentagem de sólidos.

Por outro lado observa-se que o aumento da vazão de ar melhora o crescimento bacteriano figuras 27, 29 e 31.

Solubilização do ferro e arsênio.

Em baixas concentrações de sólidos, a solubilização do ferro atinge níveis mais elevados (figuras 25, 27). Contrariamente, em concentrações de sólidos mais elevadas observa-se pouca solubilização (figuras 31 e 32). Por outro lado, o aumento na vazão de ar melhora a solubilização (figuras 25 e 27).

Contrariamente, os níveis de solubilização de arsênio são baixos. Interessantemente, estes níveis só aumentam na etapa final da lixiviação. Por outro

lado, tempo de residência maior influencia favoravelmente a solubilização do arsênio, principalmente em baixas quantidades de sólidos.

Por outro lado, elevada porcentagem de sólidos diminui o crescimento bacteriano e a oxidação de ferro e arsênio.

As tabelas 29 a 39 mostram os dados que serviram de base para a construção das figuras apresentadas.

Tabela 29

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 25)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{To} * (mg/l)	As _{To} (mg/l)	Au %
0	1,87		1,600	18784,7	2352,0	43,04
1	1,60	70				
2	1,84	65		25108,6	2232,0	
3	1,98	200				
4	1,88	130		33185,5	4152,0	
5	1,92	150	1,057	45275,7	5904,0	61,84

* Desvio Padrão: 0,593 R: 0,99873

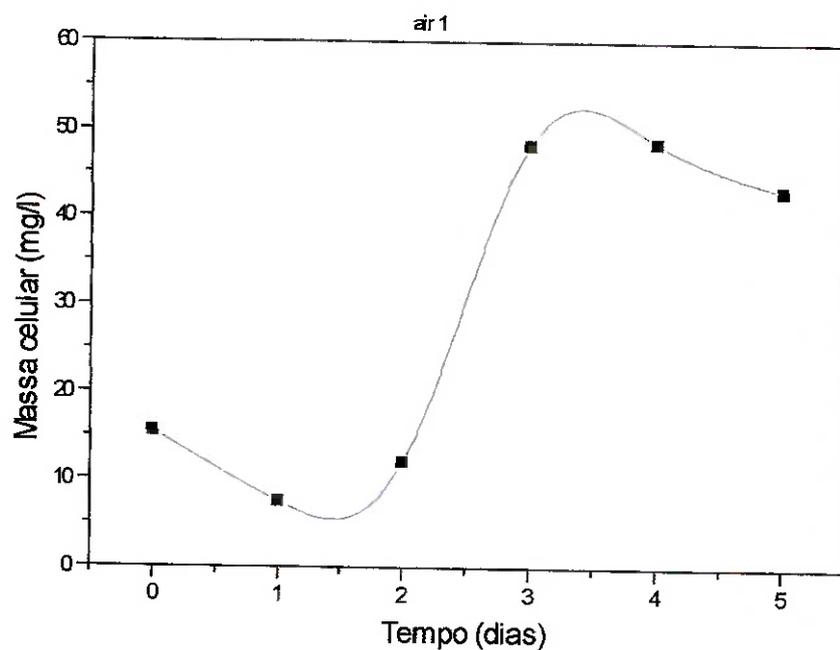
Tabela 30 -

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 26)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{To} * (mg/l)	As _{To} (mg/l)	Au %
0	1,84		1,800	17716,5	2760	43,04
1	1,86	90				
2	1,47	130		18991,4	2172	
3	1,64					
4	1,64	70				
5	1,79	60	1,294	27231,8	3120	60,26

* Desvio Padrão: 0,612 R: 0,99873

A



B

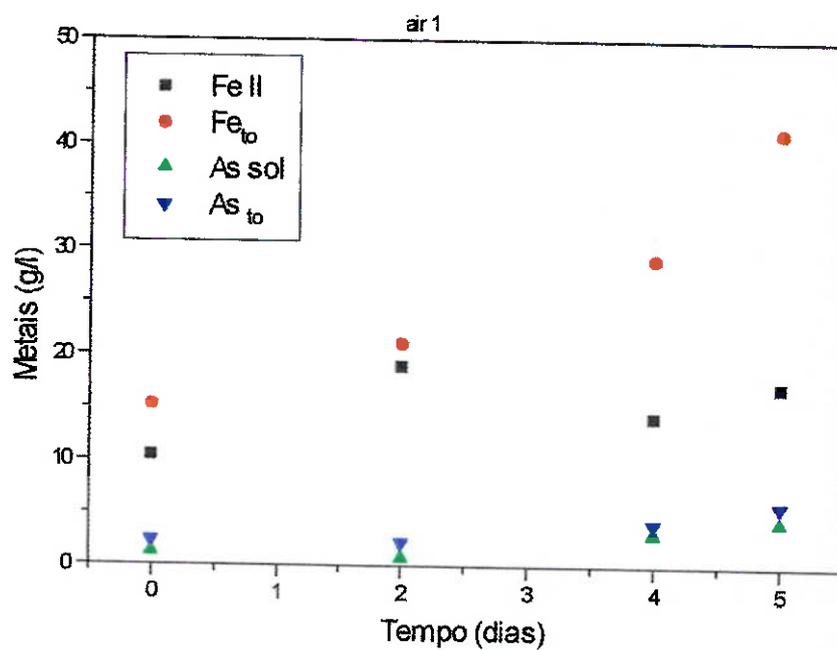
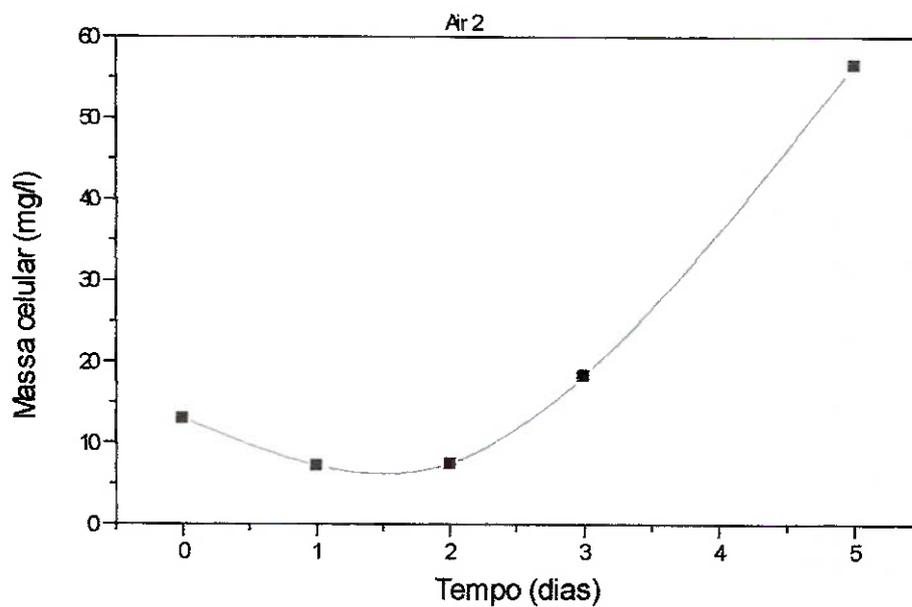


Figura 25. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 16 % (M/V). Vazão de ar: 8 l/min. Tempo de residência: 5 dias.

A



B

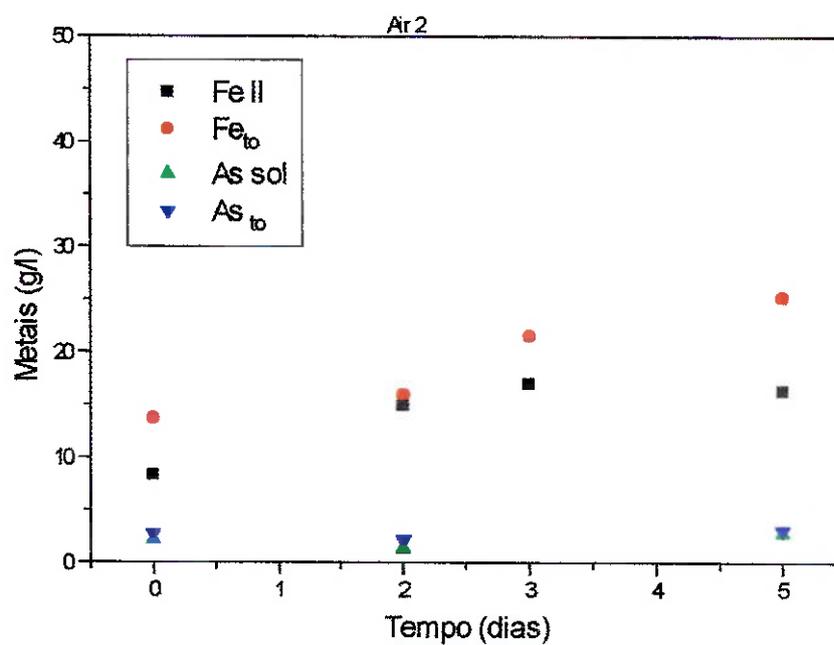


Figura 26. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 18 % (M/V). Vazão de ar: 8 l/min. Tempo de residência: 5 dias.

Tabela 31

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 27)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa Mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,75		1,600	21802,9	1800,0	43,04
1	1,68	90			1680	
2						
3	1,65	160		46197,1	3960,0	
4	1,82	130				
5	1,75	50				
6	1,62	60			6240	
7	1,88	70	1,253	51902,9	7440,0	63,31

* Desvio Padrão: 0,69 R: 0,9976

Tabela 32

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 28)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,76		1,600	11135,5	1296	43,04
1	1,74	90			1644	
2	1,89	110		27922,1	2148	
3	1,84	85				
4	1,91	80		29824,0	3756	
5	1,80	70	1,232	32056,7	3816	57,45

* Desvio Padrão: 0,539 R: 0,99877

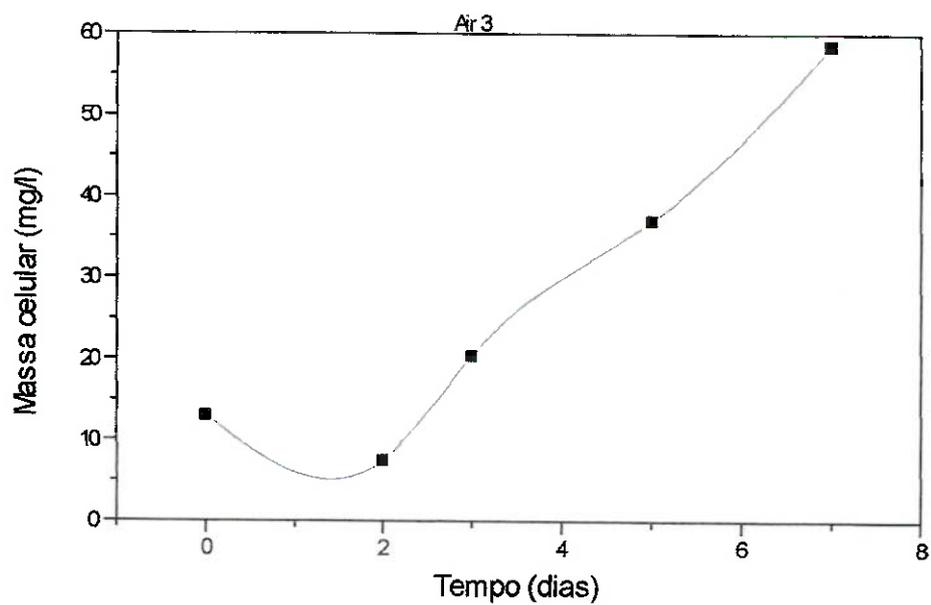
Tabela 33

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 29)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,60		1,800	14525,9	1572	43,04
1	1,60	80				
2	1,74	85		20066,3	2004	
3	1,90	90				
4	1,60	150		34372,1	3744	
5	1,78	70				
6	1,95	80		30899,0	4920	
7	1,77		1,253	31312,5	4776	63,31

* Desvio Padrão: 0,664 R: 0,9978

A



B

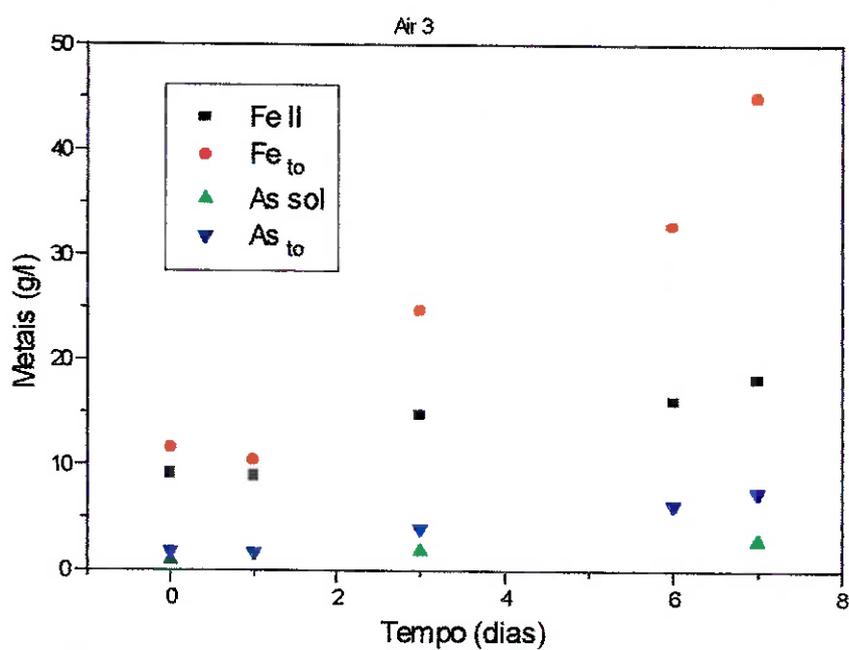
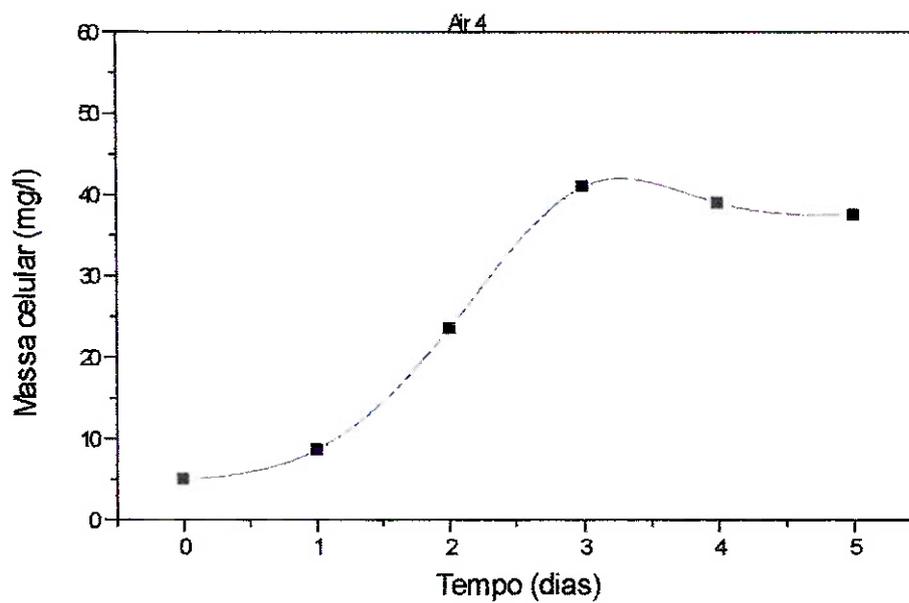


Figura 27. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 16 % (M/V). Vazão de ar: 12 l/min. Tempo de residência: 7 dias.

A



B

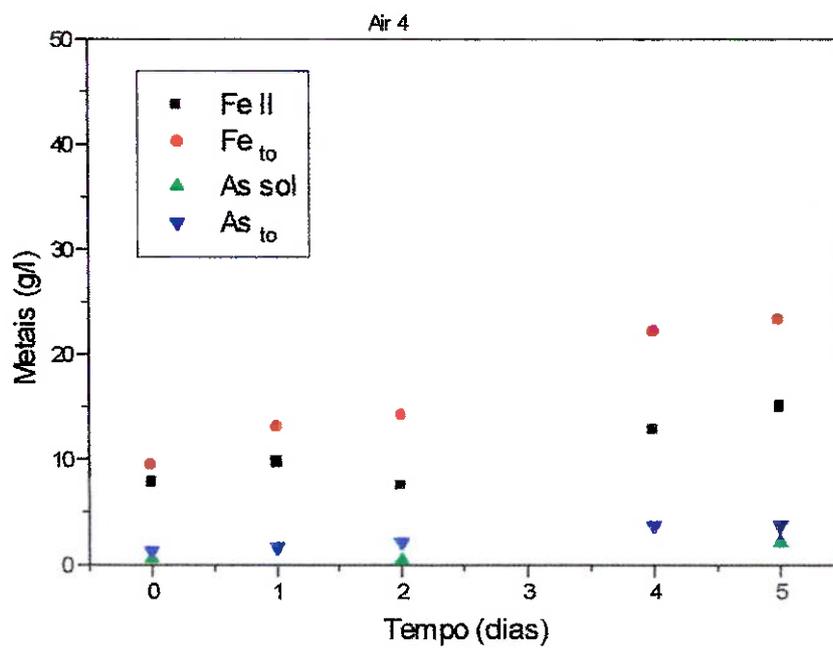
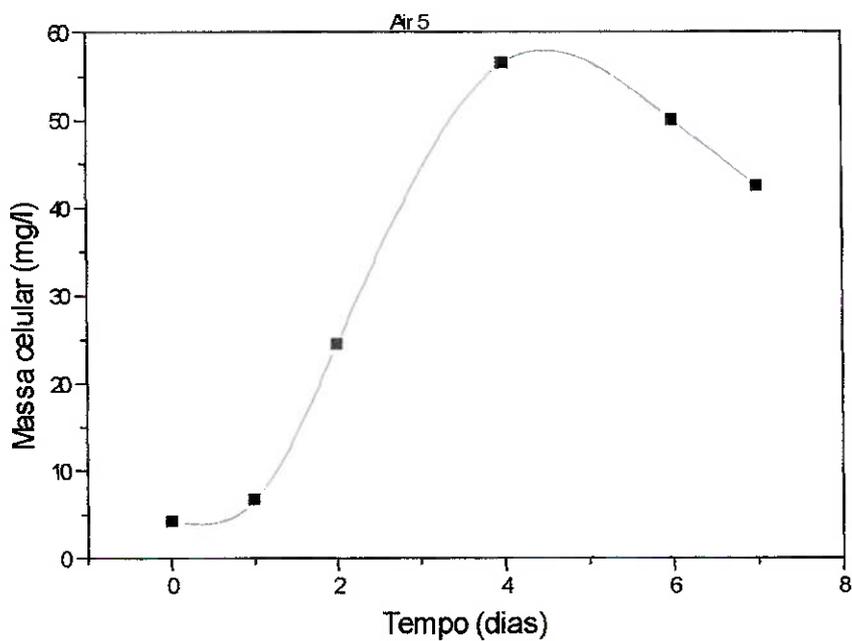


Figura 28. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 16 % (M/V). Vazão de ar: 12 l/min. Tempo de residência: 5 dias.

A



B

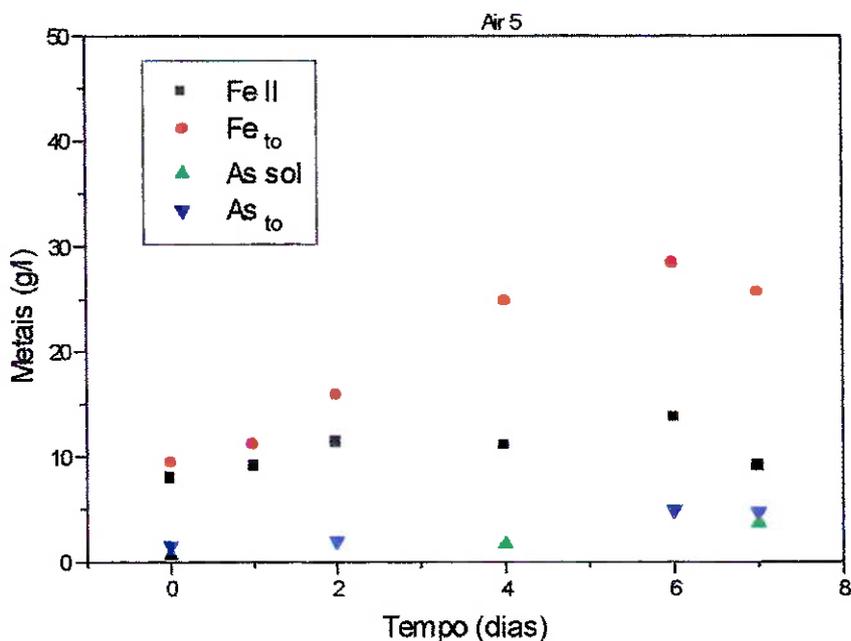


Figura 29. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 18 % (M/V). Vazão de ar: 12 l/min. Tempo de residência: 7 dias.

Tabela 34

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 30)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,60		1,600	15325,4	1680	43,04
1	1,74	50				
2	1,60	80		17254,8	1920	
3	1,86	80				
4	1,83	95		30650,9	2940	
5	1,66	125				
6	1,57	70				
7	1,55	70	1,024	32718,3	4956	61,62

* Desvio Padrão: 0,55 R: 0,9985

Tabela 35

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 31)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,60		1,800	22547,1	1716	43,04
1	1,75	60				
2	1,72	90		23539,4	1848	
3	1,78	150				
4	1,85	80		34206,7	2880	
5	1,76	120	1,343	42227,9	4620	56,48

* Desvio Padrão: 0,596 R: 0,99816

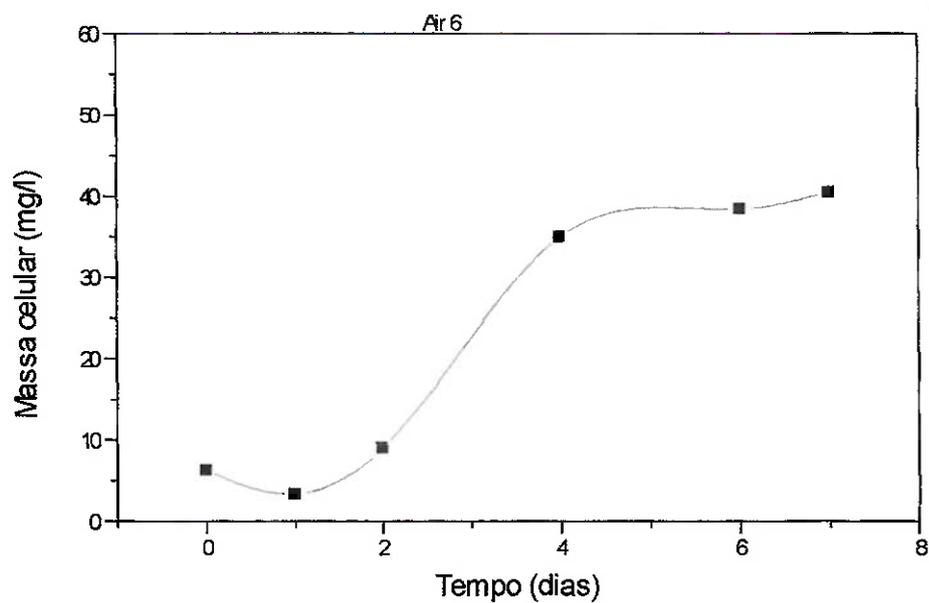
Tabela 36

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 32)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,72		1,800	23787,5	1788	43,04
1	1,75	80				
2	1,72	85		27922,1	2292	
3	1,65	185				
4	1,82	140		41152,9	4080	
5	1,82	140				
6	1,85	60				
7	1,58	70	1,362	41979,8	7260	60,97

* Desvio Padrão: 0,805 R: 0,9965

A



B

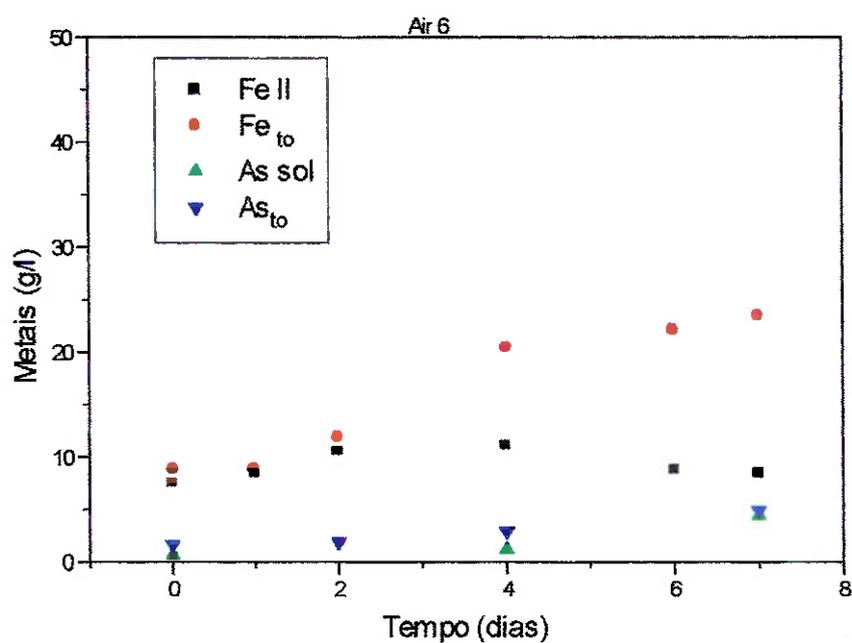


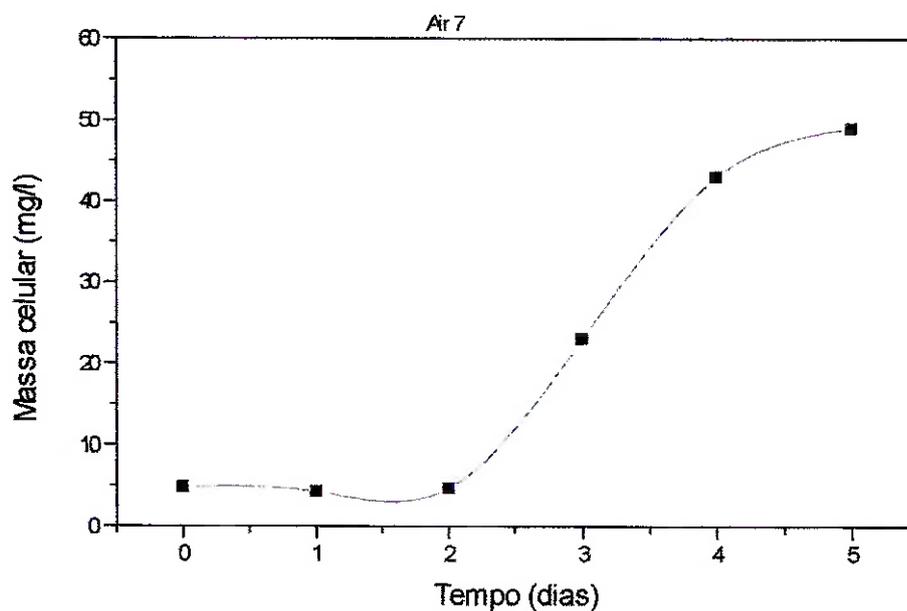
Figura 30. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7.

Porcentagem de sólidos: 16 % (M/V).

Vazão de ar: 8 l/min.

Tempo de residência: 7 dias.

A



B

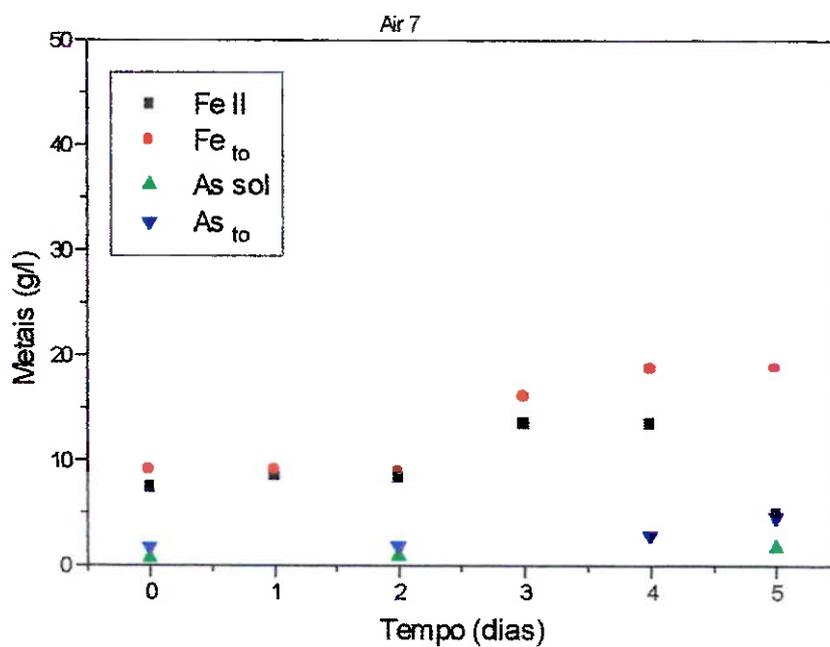
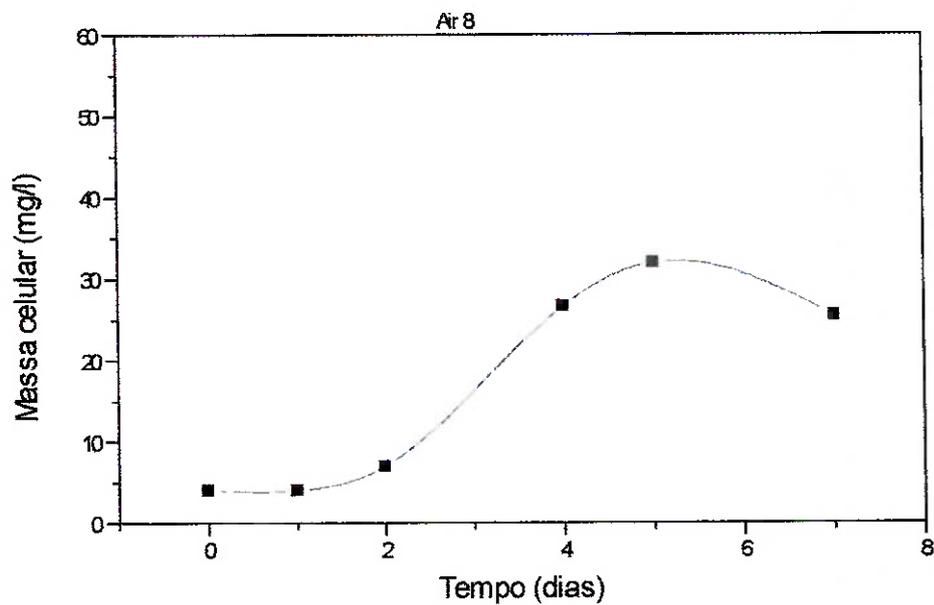


Figura 31. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 18 % (M/V). Vazão de ar: 12 l/min. Tempo de residência: 5 dias.

A



B

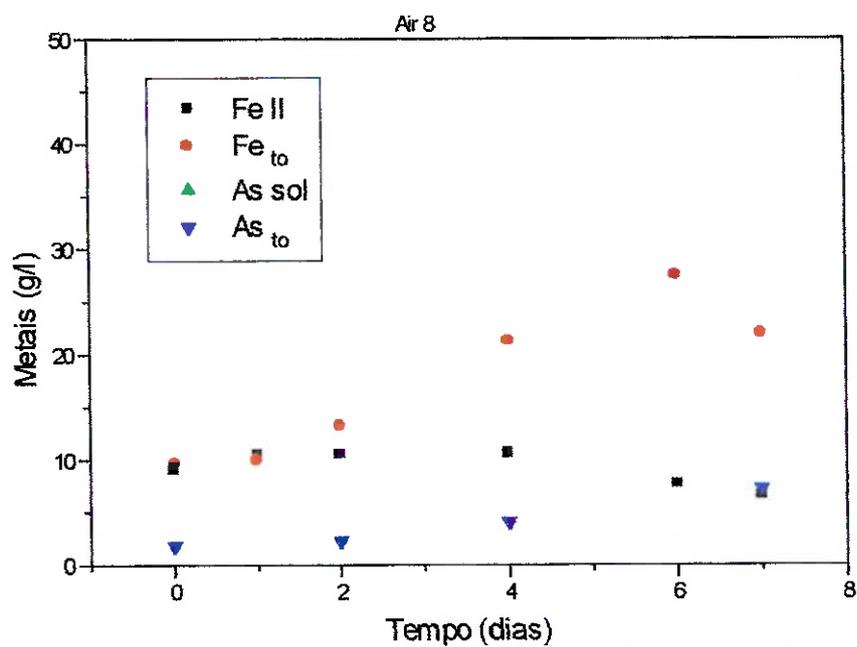


Figura 32. Crescimento e biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift*. Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 18 % (M/V). Vazão de ar: 8 l/min. Tempo de residência: 7 dias.

Tabela 37

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 33A)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,70		1,700	14397,5	1764	43,04
1	1,82	150				
2	1,94	100		22922,1	2292	
3	1,58	105				
4	1,69	94		28711,9	4080	
5	1,74	85				
6	1,83	50		34415,0	5314	61,57

* Desvio Padrão: 0,568 R: 0,99857

Tabela 38

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 33B)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,85		1,700	14904,5	1620	43,04
1	1,90	150				
2	1,72	150		18374,7	2292	
3	1,52	100				
4	1,58	50		26064,0	4080	
5	1,71	50				
6	1,71	60		32965,0	4570	59,00

* Desvio Padrão: 0,533 R: 0,99875

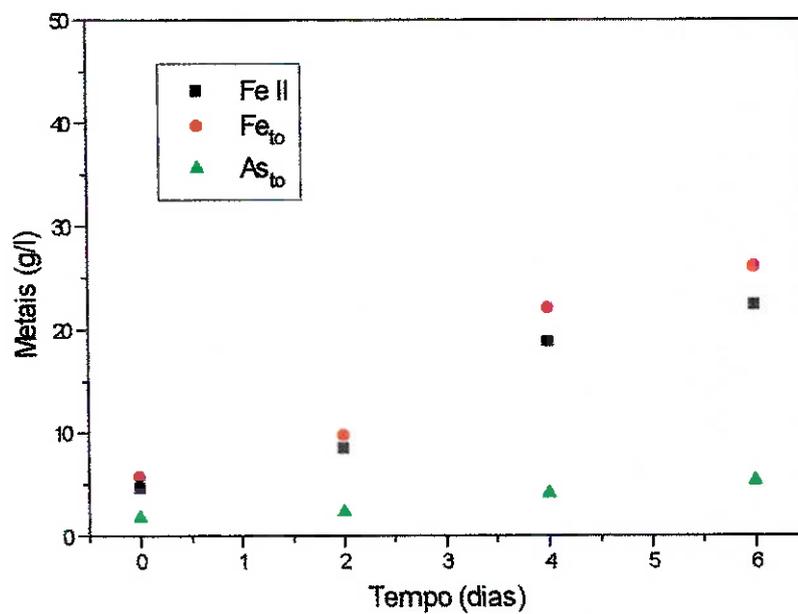
Tabela 39

Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 34)

Dia	pH	H ₂ SO ₄ (5 M) ml	Massa mineral (Kg)	Fe _{T0} * (mg/l)	As _{T0} (mg/l)	Au %
0	1,89		1,700	16514,5	1715	43,04
1	1,81	140				
2	1,74	130		22922,1	2292	
3	1,54	150				
4	1,85	130		28876,9	4080	
5	1,75	90				
6	1,70	70		35862,3	5342	60,35

* Desvio Padrão: 0,540 R: 0,9987

A



B

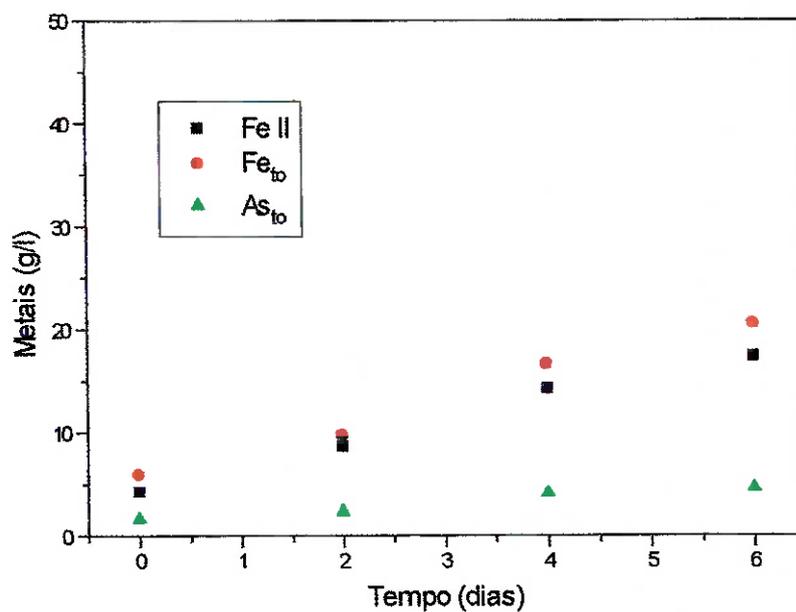


Figura 33. Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlif* (ponto central). Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 17 % (M/V). Vazão de ar: 10 l/min. Tempo de residência: 6 dias.

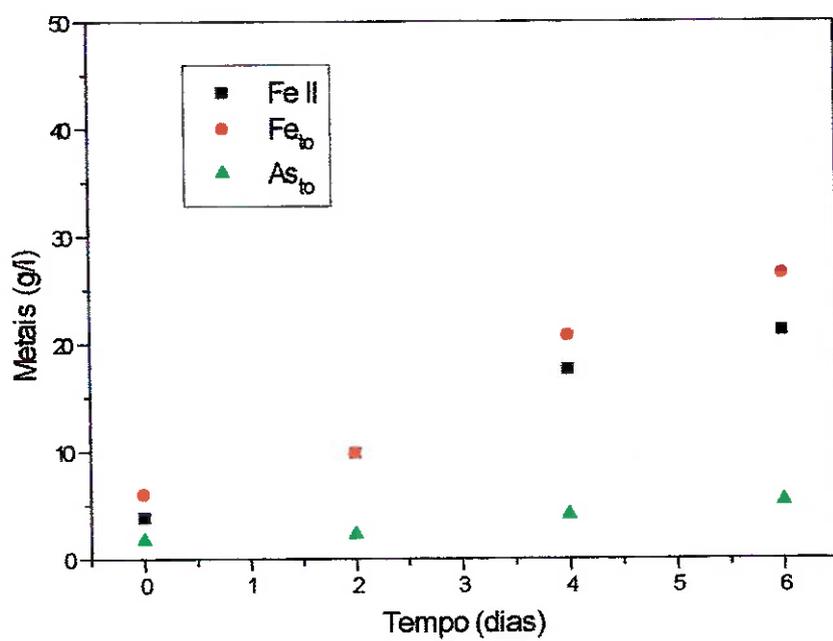


Figura 34. Biolixiviação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em reator *Airlift* (ponto central). Inóculo bacteriano 25 % (V/V), temperatura 32,5 °C, pH 1,7. Porcentagem de sólidos: 17 % (M/V). Vazão de ar: 10 l/min. Tempo de residência: 6 dias.

4.5. Análise do projeto fatorial e caracterização das variáveis

A tabela 40 mostra as oito combinações estudadas e seus resultados (resumo das tabelas 29 a 39). A faixa de extração de ouro varia de 56,48 a 63,31 %, a oxidação de ferro foi bastante elevada (9,7 a 33,4 g/l), a oxidação de arsênio (1,4 a 5,6 g/l) foi muito pouca e a extração de ouro de concentrado não tratado foi 43,04 %. A melhora na extração do ouro com o pré-tratamento da biolixiviação mostra-se bastante significativa.

Os resultados deste experimento estão expressos pela solubilização e oxidação total de ferro e arsênio (g/L) e incluem as quantidades solúveis e precipitadas.

Tabela 40 Resumo dos ensaios de biolixiviação

Testes aleatórios	Sólidos % W/V	Vazão L/min	Tempo dias	Fe total (g/L)	As total (g/L)	Au* %
5	18	12	7	16,80	3,20	63,31
3	16	12	7	30,10	5,64	63,31
6	16	8	7	17,40	3,28	61,62
8	18	8	7	18,19	5,47	60,97
7	18	12	5	19,68	2,90	56,48
4	16	12	5	20,92	2,56	57,45
1	16	8	5	26,49	3,55	61,84
2	18	8	5	9,52	1,36	60,26
9	17	10	6	20,02	3,55	61,57
10	17	10	6	18,06	2,95	59,00
11	17	10	6	19,35	3,63	60,35

*Desvio padrão: 0,38 ppm

Na tabela 40 observam-se elevados níveis de solubilização e oxidação de ferro em todos os ensaios, contrariamente, baixos níveis de oxidação de arsenopirita. Entretanto um elevado grau de oxidação de ferro não é garantia para se obter elevada

extração de ouro como mostram os resultados, isto porque o ouro está incluso tanto na pirita e pirrotita como na arsenopirita.

A tabela 41 mostra os níveis máximos e mínimos das variáveis e as resposta obtidas.

Tabela 41 Codificação de variáveis para análise estatística

Sólidos	Vazão	Tempo	Fe	As	Δ Au
-1	-1	-1	26,49	3,55	18,44
1	-1	-1	9,52	1,36	16,86
-1	1	-1	20,92	2,56	14,05
1	1	-1	19,68	2,90	13,08
-1	-1	1	17,40	3,28	18,22
1	-1	1	18,19	5,47	17,57
-1	1	1	30,10	5,64	19,91
1	1	1	16,80	3,20	19,91
0	0	0	20,02	3,55	18,17
0	0	0	18,06	2,95	15,60
0	0	0	19,35	3,63	16,95

Os resultados obtidos nos testes de biolixiviação foram analisados estatisticamente, usando programas estatísticos (Minitab, Statigraph). Estudou-se a influência dos fatores experimentais sobre a oxidação do sulfeto e a extração de ouro. Principalmente % de sólidos, vazão de ar e tempo de residência.

Os dados da tabela 41 foram usados para a análise estatística dos efeitos. A última coluna da tabela mostra como a resposta de saída (oxidação de sulfeto e extração de ouro) está relacionada com a mudança dos fatores experimentais.

4.5.1. Cálculo dos efeitos

O efeito das variáveis sobre a oxidação de sulfeto e extração de ouro foi estimado estatisticamente. Para avaliar o efeito dos fatores experimentais e de suas interações sobre os resultados obtidos do processo de lixiviação nos remetemos à

tabela 42, elaborada a partir da matriz de planejamento. Estes dados são resumidos na tabela 43.

4.5.1.1 Cálculo dos efeitos para o ferro

A tabela 42 contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos do ferro

Tabela 42 Coeficientes de contraste para o Fe

M	S	V	T	SV	ST	VT	SVT	Fe (g/L)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	26,49
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	9,52
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	20,92
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	19,68
1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	17,40
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	18,19
1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	30,10
1	1	1	1	1	-1	1	1	16,80
19,74	-7,68	3,98	1,47	0,41	1,43	1,68	-7,46	

Tabela 43. Efeitos calculados para o ferro e seus erros padrão (g/L)

M (Média)	19,74 ± 0,273
Efeitos principais:	
S (% sólidos)	-7,68 ± 0,64
V (Vazão)	3,98 ± 0,64
T (Tempo)	1,47 ± 0,64
Interação de dois fatores:	
SV	0,41 ± 0,64
ST	1,43 ± 0,64
VT	1,68 ± 0,64
Interação de três fatores:	
SVT	-7,46 ± 0,64

Os dados da tabela 43 indicam que vazão de ar e o tempo de residência têm efeitos positivos sobre a oxidação do ferro. A oxidação do ferro aumenta com o

aumento de cada fator de um nível inferior a um superior, principalmente há um incremento de 3,98 g/L em média para o aumento da vazão. De forma semelhante se tem um ganho de 1,47 g/L em média para o aumento do tempo de residência.

Contrariamente, a oxidação diminui significativamente, quando a porcentagem de sólidos vai de um nível mínimo (16 %) a um nível máximo (18%), ela desce 7,68 g/L em média.

Por outro lado, as interações de dois fatores parecem ser pouco significativas, enquanto que a interação de três fatores mostra ser bastante significativa, esta produz um efeito negativo na oxidação de ferro, cai 7,46 g/L em média. Curiosamente, o efeito sólido-vazão é o menor de todos os valores calculados, isto parece não ter sentido, considerando que os efeitos dos sólidos e da vazão têm forte influencia sobre o processo de oxidação do ferro.

Analisando o efeito da interação sólido-vazão nos dois níveis do tempo de residência, observa-se que a interação mostra um forte efeito positivo sobre a oxidação de ferro quando o tempo está no nível inferior (sobe 7,87 g/L em média). Contrariamente, quando o tempo de residência está no nível superior, o efeito da interação termina praticamente se anulando, não porque não exista de fato, mas por ser a média desses dois pares de efeitos contrários. A forte interação é indicada pela mudança da direção dos efeitos nos dois níveis estudados.

O cálculo do efeito de interação sólido-vazão (SV) a partir dos valores da tabela 42, nos dois níveis do fator tempo de residência mostra o seguinte comportamento:

Nível (-) do tempo de residência:

$$\text{Efeito } SV_{(-)} = \frac{1}{2} (26,49 - 9,52 - 20,92 + 19,68) = 7,865$$

Nível (+) do tempo de residência:

$$\text{Efeito } SV_{(+)} = \frac{1}{2} (17,40 - 18,19 - 30,10 + 16,80) = -7,045$$

$$\text{Interação do tempo com a interação SV: } \frac{1}{2} [SV_{(+)} - SV_{(-)}] = \frac{1}{2} (-7,045 - 7,865) = -7,46$$

4.5.1.2 Cálculo dos efeitos para o arsênio

A tabela 44, resumida na tabela 45, contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos do arsênio.

Tabela 44 Coeficientes de contraste para o As

M	S	V	T	SV	ST	VT	SVT	As (g/L)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3,55
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1,36
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	2,56
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2,90
1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	3,28
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	5,47
1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	5,64
1	1	1	1	1	1	1	1	3,20
3,46	-0,53	0,16	1,81	-0,53	0,40	-0,12	-1,79	

Tabela 45 Efeitos calculados para o arsênio e seus erros padrão (g/L)

M (Média)	3,46 ± 0,10
Efeitos principais:	
S (% sólidos)	-0,53 ± 0,23
V (Vazão)	0,16 ± 0,23
T (Tempo)	1,81 ± 0,23
Interação de dois fatores:	
SV	-0,53 ± 0,23
ST	0,40 ± 0,23
VT	-0,12 ± 0,23
Interação de três fatores:	
SVT	-1,79 ± 0,23

Na tabela 45, os valores dos efeitos principais indicam que vazão e o tempo de residência têm efeitos positivos sobre a oxidação do arsênio. A oxidação do arsênio aumenta com o aumento de nível, principalmente com o aumento do tempo de residência, que apresenta uma mudança bastante significativa, sobe 1,81 em média. Por outro lado, a solubilização de arsênio permanece virtualmente a mesma quando a vazão de ar vai de um nível baixo a um nível alto.

Contrariamente, a oxidação diminui quando a porcentagem de sólidos vai de um nível mínimo a um nível máximo, desce 0,53 g/L em média.

As interações entre dois fatores não parecem ser significativas para os efeitos sólidos-vazão e vazão-tempo de residência, a solubilização de arsênio desce em média 0,53 g/L e 0,12 g/L respectivamente. Contrariamente o efeito vazão-tempo de residência sobe em média 0,40 g/L. Por outro, a tabela indica que a interação sólidos-vazão-tempo de residência tem um efeito negativo sobre a solubilização do arsênio, desce 1,79 em média.

Entretanto, no cálculo do efeito de interação sólido-vazão nos dois níveis do fator tempo de residência observa-se que o efeito muda de direção, mostra um efeito positivo quando o tempo de residência está no nível inferior, mas quando está no nível superior ele mostra um efeito negativo, conseqüentemente o efeito da interação SV termina praticamente minimizado. Por outro lado, este efeito é potencializado quando interage com o tempo de residência.

O cálculo do efeito de interação sólido-vazão a partir dos valores da tabela 44, nos dois níveis do fator tempo de residência mostra:

Nível (-) do tempo de residência:

$$\text{Efeito } SV_{(-)} = \frac{1}{2} (3,55 - 1,36 - 2,56 + 2,90) = 1,265$$

Nível (+) do tempo de residência:

$$\text{Efeito } SV_{(+)} = \frac{1}{2} (3,28 - 5,47 - 5,64 + 3,20) = -2,315$$

$$\text{Interação do tempo com a interação SV: } \frac{1}{2} [SV_{(+)} - SV_{(-)}] = \frac{1}{2} (-2,315 - 1,265) = -1,79$$

4.5.1.3 Cálculo dos efeitos para o ouro

A tabela 46, resumida na tabela 47, contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos do ouro.

Tabela 46 Coeficientes de contraste para o Au

M	S	V	T	SV	ST	VT	SVT	Au (%)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	18,44
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	16,86
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	14,05
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	13,08
1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	18,22
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	17,57
1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	19,91
1	1	1	1	1	1	1	1	19,91
17,26	-0,80	-1,04	3,30	0,32	0,48	3,05	0,01	

Tabela 47. Efeitos calculados para o ouro e seus erros padrão (%)

M (Média)	17,26 ± 0,27*
Efeitos principais:	
S (% sólidos)	-0,80 ± 0,63
V (Vazão)	-1,04 ± 0,63
T (Tempo)	3,30 ± 0,63
Interação de dois fatores:	
SV	0,32 ± 0,63
ST	0,48 ± 0,63
VT	3,05 ± 0,63
Interação de três fatores:	
SVT	0,01

erro calculado com 4 graus de liberdade

A tabela 47, dos efeitos principais, indica que a porcentagem de sólidos e vazão têm efeito semelhante sobre a extração do ouro. Contrariamente, o tempo de residência tem efeito positivo sobre a recuperação de ouro. A recuperação de ouro aumenta com o aumento do tempo de residência, que apresenta uma mudança bastante significativa, sobe 3,30 % em média.

Por outro lado a interação vazão-tempo parece ser significativa com respeito as outras interações de dois e de três fatores. A extração de ouro aumenta, principalmente quando a vazão vai de um nível mínimo a um nível máximo, sobe 3,05 % em média, o cálculo do efeito permite visualizar a interação.

O cálculo do efeito do tempo de residência a partir dos valores da tabela 23, nos dois níveis do fator vazão mostra:

Nível (-) da vazão:

$$\text{Efeito } V_{(-)} = \frac{1}{2} (-18,44 - 16,86 + 18,22 + 17,57) = 0,245$$

Nível (+) da vazão:

$$\text{Efeito } V_{(+)} = \frac{1}{2} (-14,05 - 13,08 + 19,91 + 19,91) = 6,345$$

$$\text{Interação da vazão com o tempo: } \frac{1}{2} [V_{(+)} - V_{(-)}] = \frac{1}{2} (6,345 - 0,245) = 3,05$$

Para analisar a significância estatística dos efeitos encontrados observaram-se as figuras do gráfico normal e de Pareto junto com a tabela de análises de variância. Os gráficos normal e de Pareto dos efeitos permitem visualizar e identificar os principais efeitos.

4.5.2. Análise estatística da variância (ANOVA)

O objetivo da análise estatística da variância é selecionar os fatores que têm grande influência no processo da oxidação bacteriana.

Os dados das tabelas 43, 45 e 47 mostram os principais efeitos e suas interações do processo de biolixiviação. Para identificar quais efeitos são importantes no processo de biolixiviação sobre a oxidação de sulfeto e a extração de ouro nos remetem às tabelas 48 a 50 e figuras 35 a 40.

A análise de variância mostra o nível de significância para as variáveis correspondentes. Olhando os valores de probabilidade (P) determina-se se existe a presença de algum efeito significativo (valores inferiores 0,05).

A tabela 48 mostra que a solubilização e oxidação de ferro é principalmente dependente da concentração de sólidos e da interação das três variáveis sólidos-vazão-tempo. Da mesma forma, é dependente em menor proporção da vazão de ar. Os resultados dos gráficos normais e de Pareto ressaltam a influência dos mesmos (figuras 35 e 36).

A análise estatística indica que a solubilização e a oxidação de ferro têm efeito subtrativo no aumento da porcentagem de sólidos e têm um efeito aditivo com o aumento da vazão de ar. Por outro lado, a interação sólido-vazão-tempo de residência resalta o efeito negativo dos sólidos.

O efeito subtrativo indicaria uma ligação à característica metabólica do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Os sólidos afetam o crescimento bacteriano, diminuindo a oxidação do ferro. A alta concentração de sólidos pode também aumentar a viscosidade de polpa, o que dificultaria a dispersão do ar necessário para o *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Tabela 48. Análise de Variância para Fe₁₀ (unidades codificadas)

Fonte	Soma quadrática	N g.l.	Media Quadrática	F	P
Sólidos	117,9650	1	117,9650	143,75	0,0012
Vazão	31,6013	1	31,6013	38,51	0,0084
Tempo	4,3218	1	4,3218	5,27	0,1055
Sólidos*Vazão	0,3362	1	0,3362	0,41	0,5677
Sólidos*Tempo	4,0613	1	4,0613	4,95	0,1126
Vazão*Tempo	5,6648	1	5,6648	6,88	0,0788
Sólidos*Vazão*Tempo	111,1540	1	111,1540	135,45	0,0014
Erro total	2,4619	3	0,820641		
Total	277,5460	10			

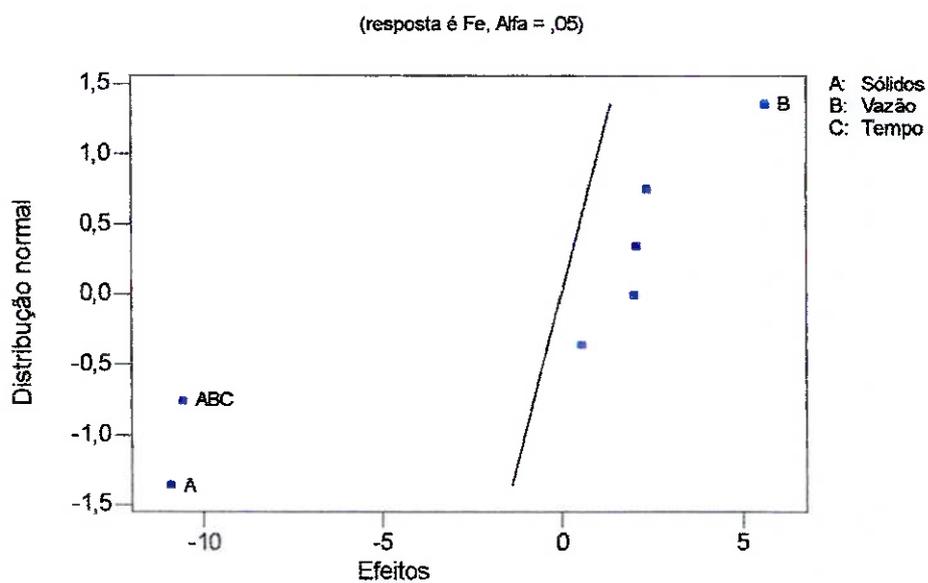


Figura 35. Gráfico da probabilidade normal para os efeitos do ferro

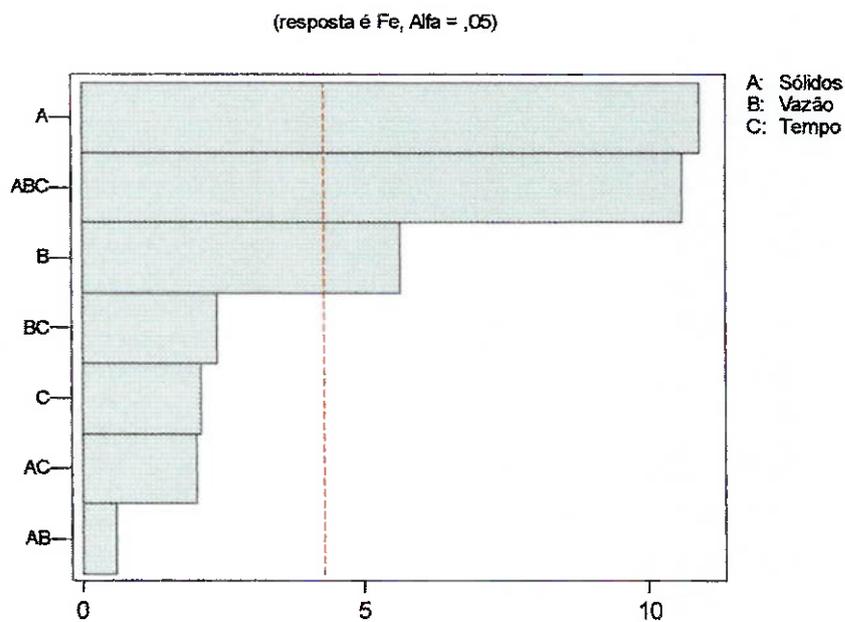


Figura 36. Gráfico de Pareto para os efeitos do ferro

Na tabela 49, observa-se que a solubilização e oxidação de arsênio são unicamente dependentes do tempo de residência e independentes da porcentagem de sólidos e da vazão de ar (figuras 37, 38).

Por outro lado, as interações das três variáveis estudadas mostraram ser bastantes significativas para a solubilização e oxidação de arsênio (figuras 37, 38). A oxidação da arsenopirita é totalmente dependente da interação de sólidos-vazão-tempo na mesma ordem de grandeza que o efeito do tempo de retenção. Isto significa que os sólidos e a vazão indiretamente influenciam a oxidação de arsenopirita.

O tempo de retenção mostra ser um efeito aditivo significativo na solubilização e oxidação do arsênio, enquanto a interação das três variáveis mostra ter um efeito subtrativo.

Tabela 49. Análise de Variância para As_{to} (unidades codificadas)

Fonte	Soma quadrática	N g.l.	Media Quadrática	F	P
Sólidos	0,5513	1	0,5513	5,39	0,1029
Vazão	0,0512	1	0,0512	0,50	0,5302
Tempo	6,5161	1	6,5161	63,71	0,0041
Sólidos*Vazão	0,5513	1	0,5513	5,39	0,1029
Sólidos*Tempo	0,3200	1	0,3200	3,13	0,1751
Vazão*Tempo	0,0264	1	0,0264	0,26	0,6461
Sólidos*Vazão*Tempo	6,4082	1	6,4082	62,66	0,0042
Erro total	0,3068	3	0,102273		
Total	14,7312	10			

A tabela 50 mostra que a extração do ouro é principalmente dependente do tempo de retenção e do efeito vazão-tempo de residência. Ela tem um efeito aditivo quando aumenta o tempo de residência e quando aumenta a vazão.

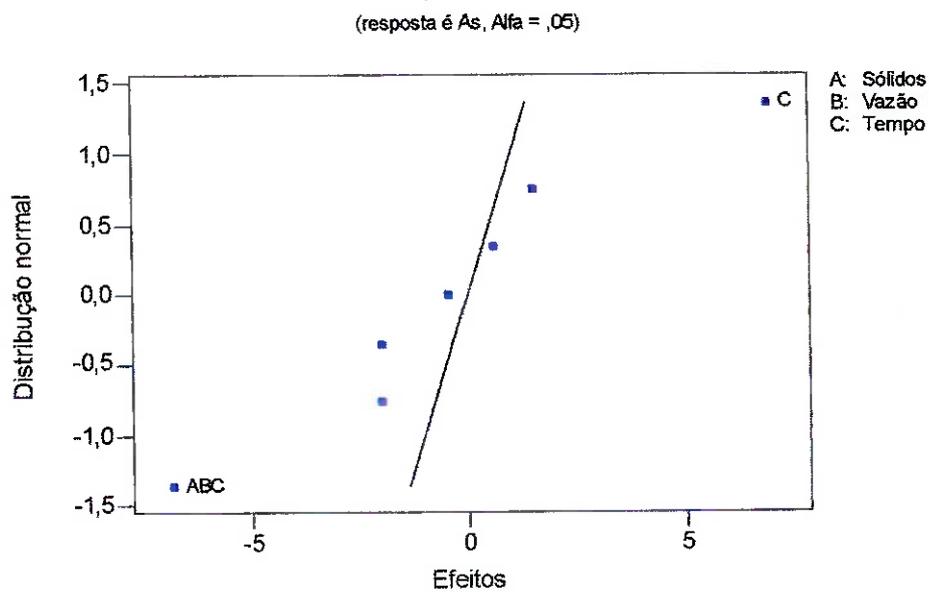


Figura 37. Gráfico da probabilidade normal para os efeitos do arsênio

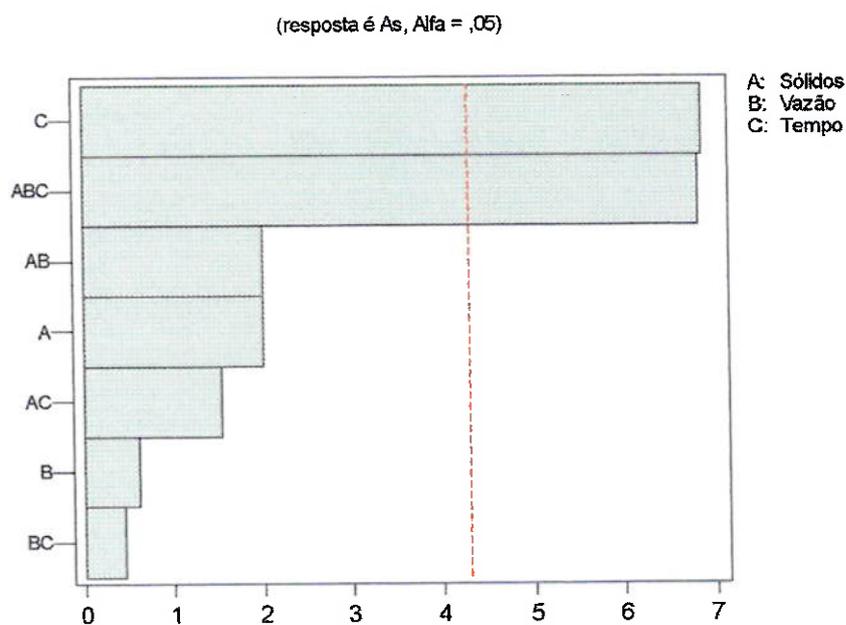


Figura 38. Gráfico de Pareto para os efeitos do arsênio.

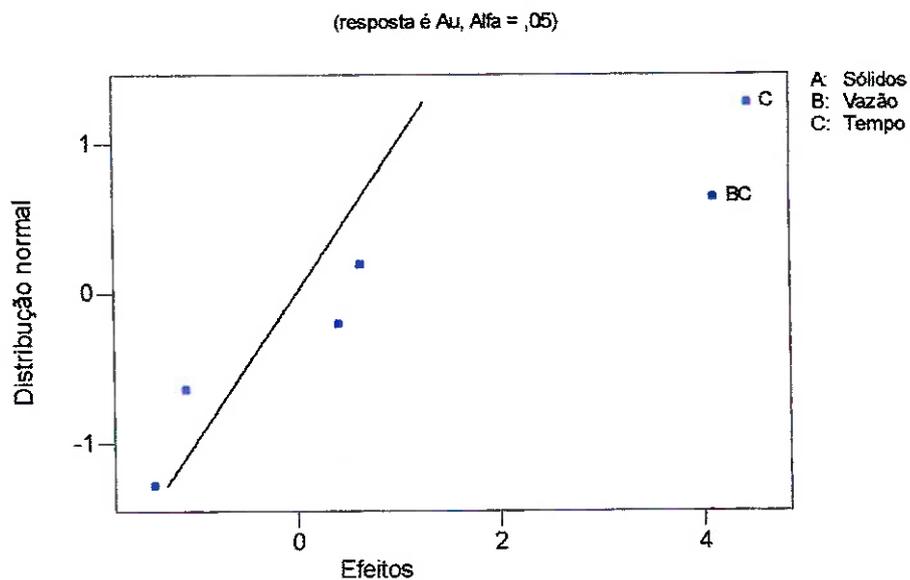


Figura 39. Gráfico da probabilidade normal para os efeitos do ouro

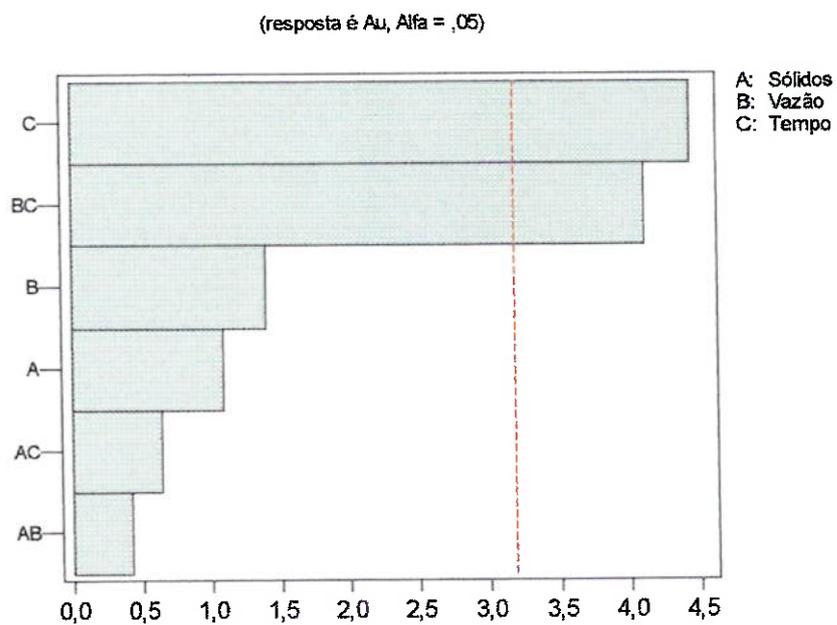


Figura 40. Gráfico de Pareto para os efeitos do ouro.

Tabela 50. Análise de Variância para ouro (unidades codificadas)

Fonte	Soma quadrática	N g.l.	Media Quadrática	F	P
Sólidos	1,28	1	1,28	1,60	0,2747
Vazão	2,14245	1	2,14245	2,68	0,1772
Tempo	21,7141	1	21,7141	27,12	0,0065
Sólidos*Vazão	0,19845	1	0,19845	0,25	0,6447
Sólidos*Tempo	0,45125	1	0,45125	0,56	0,4946
Vazão*Tempo	18,6050	1	18,6050	23,24	0,0085
Erro total	3,20256	4	0,800641		
Total	47,5938	10			

A análise de variância indica que a oxidação do ferro é dependente da porcentagem de sólidos, o aumento de sólidos diminui a oxidação de ferro, enquanto que o aumento da vazão incrementa a oxidação de ferro. Uma elevada concentração de sólidos pode causar elevada viscosidade de polpa e dificultar a dispersão de ar.

Por outro lado, a interação sólido-vazão-tempo de residência mostra efeito negativo sobre a liberação de ferro, que é muito menor. Este efeito é potencializado quando a interação sólido-vazão interage com o tempo de residência.

Do mesmo modo, o tempo de residência mostra um efeito significativo sobre a oxidação de arsenopirita, o aumento do tempo incrementa a liberação de arsênio. Contrariamente, a interação sólido-vazão-tempo de residência tem efeito negativo sobre a oxidação de arsenopirita.

Por outro lado, o tempo de residência mostra um efeito significativo sobre a extração de ouro. Adicionalmente o efeito do tempo de residência depende do nível da vazão: maior vazão favorece a extração de ouro.

Em conclusão, todas as variáveis estudadas têm efeito significativo principalmente na oxidação do ferro e da arsenopirita. O tempo de residência tem influência significativa sobre a oxidação da arsenopirita. A porcentagem de sólidos tem um efeito significativo sobre a oxidação do ferro. Entretanto, a oxidação de

arsenopirita não atinge valores satisfatórios como a oxidação de ferro, que atinge valores elevados.

Elevado tempo de retenção dá elevada decomposição da matriz de arsenopirita e elevada liberação de ouro. Como a liberação de ouro depende da oxidação do ferro e da arsenopirita, a porcentagem de sólidos e a vazão influenciam a recuperação.

5. Conclusões

O aumento da tolerância das células aos metais tóxicos deveria ser desenvolvido em laboratório através do cultivo sucessivo em concentrações crescentes do minério. Tais cepas verificou-se serem mais eficientes na biolixiviação de sulfetos que as bactérias não adaptadas. Similarmente, a velocidade de oxidação poderia ser melhorada pelo uso de células pré-adaptadas ao concentrado do minério sulfetado.

O cultivo repetitivo da célula não adaptada à presença de doses crescentes de minério aumenta a tolerância das células aos sulfetos minerais. O *Acidithiobacillus ferrooxidans*, na presença de substratos minerais, perde a sua capacidade oxidativa no meio líquido, porém o ataque direto através da ligação tenaz das bactérias ao minério pode ser obtido.

Na presença de maiores concentrações de minérios, o microorganismo apresenta perda maior da sua atividade oxidativa após incubação prolongada. Adicionalmente, a célula bacteriana, em concentrações menores de minério, mostra ainda capacidade oxidativa, enquanto que em concentrações maiores de minério não apresenta poder oxidativo.

Os resultados apresentados mostram que a velocidade de lixiviação e a atividade oxidativa das bactérias são influenciadas significativamente pelo crescimento bacteriano na fase sólida e na fase líquida.

A velocidade de oxidação do ferro apresenta diferença dependendo da quantidade de substrato sólido presente no meio lixivante.

As diferentes variações da célula e dos íons férricos estão associadas ao crescimento bacteriano e à sua atividade metabólica. Isto pode ser observado na relação entre o crescimento e a atividade metabólica. De outra forma é necessário indicar uma relação entre a célula livre e a atividade oxidativa, indicando modificação na membrana celular nos diferentes estados metabólicos.

Os conteúdos de proteína da célula durante os experimentos mostram variações de acordo com o estado metabólico da célula. Na ausência de íon ferroso, a célula adere ao mineral e apresenta densidade maior. Contrariamente, as células

livres são dependentes do ferro formado pelas células aderidas, como evidenciam as mudanças nas concentrações celulares. Para as células livres e aderidas, na fase final de biolixiviação, pode-se relacionar, a diminuição de células aderidas à redução de ferro no meio e à formação de íon férrico, que poderia interferir com o mecanismo metabólico destas.

A quantidade de Fe (III) mostra diferenças que dependem da quantidade do substrato sólido no meio lixiviante: na presença de grandes quantidades, a porcentagem total de extração de ferro aumenta. A adição de íon férrico pode interferir minimizando a atividade oxidativa e pode contribuir para o aumento da concentração celular na superfície mineral. Adicionalmente, apresenta níveis maiores de solubilização de sulfetos.

As mudanças nos níveis de pH afetam a atividade celular do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Valores de pH inferiores a 1,5 levam à inibição de crescimento e da atividade oxidativa.

Os resultados também mostram que a lixiviação de sulfetos refratários é devida à combinação da ação bacteriana direta e lixiviação do íon férrico.

A presença de xantato produz inibição do crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e menor solubilização de metais. Também produz um decréscimo na adesão de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Na presença de baixas quantidades, 50 e 100 mg de xantato produzem uma fase inicial de inibição que depende da toxicidade do reagente de flotação. O amil e iso-propil xantato apresentam pouca toxicidade enquanto o etil apresenta elevada toxicidade.

Da mesma forma, durante a biolixiviação de mineral flotado, a presença de xantato (200 mg/kg) na superfície mineral produz inibição tanto do crescimento como da bio-oxidação.

A presença de maiores quantidades de xantato (1,0 e 2,0 g/l) produzem inibição total do *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Enquanto que em baixas concentrações, a bactéria torna-se tolerante indicando adaptabilidade.

O análise estatística dos resultados experimentais mostra que a solubilização e oxidação do ferro foram dependentes principalmente da porcentagem de sólidos e das interações das três variáveis (porcentagem de sólidos, vazão de ar e tempo de residência), em menor proporção da vazão de ar. A alta concentração de sólidos diminui a solubilização e a oxidação de ferro.

O tempo de retenção e as interações das três variáveis (porcentagem de sólidos, vazão de ar e tempo de residência), influenciam a liberação de arsênio.

As interações das três variáveis estudadas mostraram ser bastantes significativas para a solubilização e oxidação de ferro e arsênio. A oxidação de sulfeto é totalmente dependente da interação de % sólidos-vazão-tempo na mesma ordem de grandeza que o efeito da porcentagem de sólidos para a oxidação de ferro e o efeito do tempo de retenção para a oxidação do arsênio.

A dissolução e oxidação do ferro atingem níveis elevados (9,7 a 33,4 g/l) enquanto o arsênio atinge níveis baixos (1,4 a 5,6 g/l). Interessante o fato de que a dissolução de arsênio se dá em maior proporção na fase final de bio-oxidação.

O faixa de extração de ouro varia de 56,5 a 63,31 %, a extração de ouro de concentrado não tratado foi de 43,04 %. A melhora na extração do ouro com o pré-tratamento da biolixiviação mostra ser bastante significativa.

Referências Bibliográficas

- AHONEN, L., HILTUNEN, P., TUOVINEN, O. The rol of pyrrhotite and pyrite in the bacterial leaching of chalcopyrite ores. In: Lawrence RW, Branion RM, Ebner HG, editors. **Fundamental and applied biohydrometallurgy**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.13-22.
- AHONEN, L., TUOVINEN, O., 1995. Bacterial leaching of complex sulfide ore samples in bench-scale column reactors. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 37, p. 1-21,
- AMARO, A.M., CHAMORRO, D., SEEGER, M., ARREDONDO, R., PEIRANO, I. AND JEREZ, C.A., 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, n. 2, p. 910-915.
- ANDREWS, G.F. The selective adsorption of *Thiobacilli* to dislocation sites on pyrite surfaces. **Biotechnol. Bioengin.**, New York, v. 31, p. 378-81, 1988.
- ASENJO, J.A., MERCHUK, J.C. **Bioreactor system design**. New York, Marcel Dekker, 1994
- ASWEGEN, P.V., 1998. O processo BIOX - Dez anos de comercialização. **Minerios & Minerales** (Setembro), p. 41-46.
- ATTIA, Y.A., EL-ZEKY, 1989. Bioleaching of gold pyrite tailings with adapted bacteria. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 291-300.
- ATTIA, Y.A., LITCHFLELD, J. AND VAALER, L., Applications of Biotechnology in the Recover of Gold. In: **Microbiological Effects of Metallurgical Processes**. Clum, J.A. and Haas, L.A. (Eds.), TMS-AIME, New York, 1985, pp. 111- 120.
- BERRY, V.K., MURR, L.E. AND HISKEY, J.B. 1978. Galvanic interaction between chalcopyrite and pyrite during bacterial leaching of low-grade waste. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 3, p. 309-326.
- BLAKE II, R.C., SASAKI, K., OHMURA, N., 2001. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. **Hidromet.**, Amsterdam, v. 59, p. 357-72.

- BOON, M., HEIJNEM J.J., 1998. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 48, p. 27-41.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. and HUNTER, J.S. **Statistical for experiments**, New York, John Wiley & Sons, 1978.
- BRADFORD, M.M. ,1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** New York, v. 72, p. 248-254.
- BRIERLEY, C.L., BRIGGS, A.P., 1997. *Guide to Developing an Economically Viable Process*. In: **Minerals Biooxidation/Bioleaching** PDAC Annual Meeting, Toronto, Canada, March, 1997.
- BRIERLEY, J.A. BRIERLEY, C.L., 2001. Present and future commercial application of Biohydrometallurgy. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 59, p. 233-39.
- BUDDEN, R. AND SPENCER, P.A., 1993. Tolerance to temperature and water quality bacterial oxidation: The benefits of BacTech's moderately thermophilic culture. **Microbial. Rev.**, v. 11, p. 191-196.
- BUONFIGLIO V, POLIDORO M, SOYER F, VALENTI P, SHIVELY J, 1999. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 72, n. (1-2), p.85-93
- BUSTOS, S., et al., 1993. The sociedad minera pudahuel bacterial thin-layer leaching process at Lo Aguirre. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, p. 231-36.
- CASSA, J.C.S., ANDRADE, T.R. Lixiviação bacteriana de minérios de ouro. In: **Encontro nacional de tratamentos de minérios e hidrometalurgia**, 11., Natal, 1985. Anais. S.n.t., v. 1, p. 160-70.
- CHAPMAN, J.T., et al., 1993. Bio-oxidation of a refractory gold bearing high arsenic sulphide concentrate: A pilot study. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, p. 243-252.

CHAPMAN, J.T., MARCHANT, P.B., LEWRANCE, R.W. and KNOPP, R., 1993. Bio-oxidation of a refractory gold bearing high arsenic sulphide concentrate: A pilot study. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, p. 243-252.

CHAVES, A.P. , 1985. Métodos de concentração e extração de ouro. **Brasil Mineral**. São Paulo, v. 2, n. 14, p. 26-36.

CHAVES, A.P., BROSCH, C.D., BARBARULO, R.A.M. , 1973. Lixiviação bacteriana de minérios: Nova técnica na hidrometalurgia. **Minérios & Metais**, v. 3, n. 6, p. 27-34.

CHEN, Y. et al., 2001. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant–chelate aqueous system. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 773–79.

CHISTI, M.Y. **Airlift Bioreactors** , Elsevier Science, Essex, U.K.(1989). 344 p.

CLAASSEN, C., 1993. Mineralogical controls on the bacterial oxidation of refractory Borbeton golds ores. **FEM Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, p. 197-206.

COX, J.C. NICHOLLS, D.G. AND INGLODEW, J.,1979. Transmembrane electrical potencial and transmembrane pH gradient in the acidophilic *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biochem. J.**, London, v. 178, p. 195-200.

COX, J.C., BOXER D.H., 1986. The role the rusticyanin, a blue copper protein, in the electron transport chain of *Thiobacillus ferrooxidans* grown on iron or thiosulfate. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, London, v. 8, p. 269-75.

DAS A, MODAK JM, NATARAJAN KA, 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wagenengen, v. 73, n. 3, p.215-22

DAS K.K., PRADIP, NATARAJAN, K.A., 1997. The effect of constituent metal ions on the electrokinase of chalcopyrite. **J. Colloid Interface Science**, v. 196, n. 1, p. 1-11.

De FILIPPO, D. et al. Chalcopyrite bioleaching: an investigation on copper recovery. In: **International biotechnology symposium**, 8., Paris 1988. v. 2, p. 1131-45.

DE, G.C., OLIVER, D.J., PESIC, B.M., 1996. Effect of silver on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 41, p. 211-229.

DENG et al., 2000. Investigations of accelerating parameters for the biooxidation of low-grade refractory gold ores. **Minerals Engineering**, v. 13, No 14, p. 1543-53.

DEVASIA, P., NATARAJAN, K.A., SATHYANARAYANA, D.N. AND RAO G., 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4051-4055.

DEW, D.W. Comparison of performance for continuous bio-oxidation of refractory gold ore flotation concentration **Biohydrometallurgical Processing** edited by T vargas, C.A. Jerez, J V Wiertz and H. Toledo University of Chile, 1995

DISPIRITO, A. A., DUGAN, P.R., AND TUOVINEN, O.H., 1983. Sorption of *Thiobacillus ferrooxidans* to particulate material. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 25, p.1163-1168.

DRODNER, E., et al., 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2922-23.

DUTRIZAC, J.E. AND DONALD,R.J., 1974. Ferric ion as a leaching medium. **Minerals Science Engineering**, v. 6, n. 2, p. 59-100.

ESCOBAR, B., JEDLICKJB, E., WIERTZ, VARGAS T., 1996. A method for evaluating the proportion of free and 1 attached bacteria in the bioleaching of chalcopyrite with *Thiobacillus ferrooxidans* **Hydromet.**, Amsterdam, v. 40, p. 1 – 10.

ESPEJO, R. T., AND ROMERO, P., 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 53, p. 1907-1912.

ESPEJO, R.T., et al., 1988. Oxidation of ferrous iron and elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans* . **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 54, p. 1694-9.

EVELIN, S. S. **Viabilização da recuperação de ouro de minério primário por lixiviação em pilha mediante o uso de britadores não convencionais :um estudo de caso: o minério primário da mina de Almas-Paiol, TO.** São Paulo, 2000. 145 p. Dissertação Mestrado. Escola Politecnica da USP.

FACCIOTTI, M.C.R. Bioreatores e Processos fermentativos. In: Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A.;Aquarone, E. **Engenharia Bioquímica**, Coleção Biotecnologia Industrial, São Paulo, Editora Edgard Blucher, v.2, cap. 8, 1997

FLEMING, A.A., 1998. Thirty years of turbulent change in the gold industry. **CIM Bulletin**, v. 91, p. 55-67.

FOSSI, G. **Biohydrometallurgy**. New York, 1990.

FOWLER TA, CRUNDWELL FK, 1999. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans* bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5285-92

FRATTINI CJ, LEDUC LG, FERRONI GD, 2000. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wagenengen, v. 77, n. 1, p.57-64

FRENAY J, WIERTZ J, CORNEILLE EK., 1985. Contribution to the bioleaching study of complex Pyritics-Ores. **Microbiological Effects on Metallurgical Processes** L. Has, J. Clum. Ed. AIME, 1985, p.35-50.

GARCIA Jr., O. **Estudos da biolixivação de minérios de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans***. Campinas, 1989. 261p. Tese Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP.

GARCIA Jr., O., 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Rev. Micribiol. São Paulo.**, v. 22, n. 1, p. 1-6.

GARCIA, M.J., PALENCIA, I.,CARRANZA, F., 1989. Biological ferrous oxidation in packed bed columns with low-grade sulphide mineral as support. **Process Biochem.**, London, v. 24, p. 84-7.

GEHRKE T, TELEGDI J, THIERRY D, SAND W, 1998. Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2743-7.

GOMES, A.M.D. **Avaliação técnica dos processos de cianetação e adsorção da mina de fazenda Brasileiro-CVRD**. São Paulo, 1997. 107p. Dissertação de Mestrado, Escola Politecnica da USP.

GOMES, A.M.D. **Lixiviação e adsorção em Fazenda Brasileiro - CVRD: uma questão de produtividade**. São Paulo, 1999. 200 p. Tese Doutorado. Escola Politecnica da USP.

GUILIANI N, JEREZ CA, 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2318-24.

HACKL, R.P., WRIGTH, F.R., GORMELY, L.S. Bioleaching of refractory gold ores - out of the lab and into the plant. In: **International Symposium on Biohydrometallurgy**, Jackson Hole, 1989. Proceedings. s.l., Canmet, s.d. p. 533-49.

HAISH, D. Biohidrometalurgia /lixiviación bacterial: Recientes desarrollos y posibles aspectos en el futuro. **Ingeniería Química**, Octubre, 1985. 39-47.

HANSFORD, G.S. and MILLERA D.M., 1993. Bioxidation of gold bearing pyrite-arsenopyrite concentrate. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 11, p. 175-183.

HARAHUC L, LIZAMA HM, SUZUKI I, 2000. Selective inhibition of the oxidation of ferrous ferro or sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1031-7.

HARVEY, P.I., and CRUNDWELL, F.K., 1997. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*: A novel experimental design for batch growth and bacterial leaching studies. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2586-2592.

HIROYOSHI N, HIROTA M, HIRAJIMA T, TSUNEKAWA M, 1999. Inhibitory effect of iron-oxidizing bacteria on ferrous-promoted chalcopyrite leaching. **Biotechnol Bioeng.**, New York, v. 64, n. 4, p. 478-83.

- HORTA, R.M. **O estado da arte em tratamento minério de ouro.** São Paulo, 1996. 96p. Dissertação de Mestrado, Escola Politecnica da USP.
- HUTCHINS et al., 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 40, p. 311-336.
- JENSEN AB, WEBB C, 1995. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*. **Process Biochem.**, London, v. 30, n. 3, p. 225-236.
- KARAN, G., NATARAJAN, K.A., MODAK, J.M., 1996. Development of temperature-tolerant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetics **Hydromet.**, Amsterdam, v. 42, p. 51-61.
- KARAN, G., NATARAJAN, K.A., MODAK, J.M., 1996. Estimation of mineral-adhered biomass of *Thiobacillus ferrooxidans* by protein assay - some problems and remedies, **Hydromet.**, Amsterdam, v. 42, p. 169-175.
- KARAVAIKO, GI, CHUCHATIN, LX., PIVOVAROVA, T.A. Microbiological leaching of metais from arsenopyrite containing concentrates. In: R.W. Lawrence, R.M.R. Branion and R.M.R. Ebner (Editors), **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy.** (Process Metallurgy, Vol. 4.) Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 115-126.
- KARAVAIKO, GI, KERZNETSOV, S.I., GALONIZIK, A.I. **The bacterial leaching of metals from ores.** Techcopy Limited Published, England, 1977. 204 p.
- KINGMA JR., J.G. AND SILVER M., 1980. Growth of iron-oxidizing Thiobacilli in the presence of chalcopyrite and galena. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 20, p. 635-641.
- KONISHI, Y., KUBO, H. AND ASAI, S., 1991. Bioleaching of zinc Sulfide concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 39, p. 66-77.
- LAWRENCE, R. W. Biotreatment of gold ores. In: **Microbial mineral recovery.** H. L. Ehrlich and C. L. Brierley (ed.), McGraw-Hill Publishing Co., New York, 1990. p. 127-148.

LIVESEY-GOLDBLATT, E. Bacterial leaching of gold, uranium, pyrite bearing compacted mine tailing slimes. In: Lawrence, R.W., Branion, R.M.R., Ebner, H.G. eds. **Fundamental and applied biohydrometallurgy**: proceedings of the 6. International Symposium on biohydrometallurgy, Vancouver, 1985. Amsterdam, Elsevier, 1986. p.89-96.

LIZAMA, H.M. et al. Bacterial leaching of copper and zinc from sulphide ore by a mixed culture of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* in laboratory scale and pilot plant scale columns. In: **International symposium on biohydrometallurgy**, Jackson Hole, 1989. Proceedings. s.l., Canmet, s.d. p. 519-32.

LIZAMA, H.M., SUZUKI, I., 1988. Bacterial leaching of a sulphide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: I. Shake flask studies. **Biotechnol. Bioengin.**, New York, v. 32, p. 110-6.

LIZAMA, H.M., SUZUKI, I., 1989. Bacterial leaching of a sulphide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: II. Column leaching studies. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 22, p. 301-10.

LIZAMA, H.M., SUZUKI, I., 1991. Interaction of chalcopyrite and sphalerite with pyrite during leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 304-11.

LOON, H.Y.L. AND MADGWICK, J., 1995. The effect of Xanthate Flotation Reagents on Bacterial Leaching of Chalcopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 17, n. 9, p. 997-1000.

LOWRY, et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275.

LUNDGREN, D.G. 1980. Ore leaching by bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v 34, p. 263-283.

LUNDGREN, D.G. AND SILVERMAN, M.P., 1980. Ore leaching by bacteria **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 34, p. 263-283.

MARGALITH, P., M. SILVER, AND D. G. LUNDGREN, 1966. Sulfur oxidation by the iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 92, p. 1706-1709.

MAZUELOS, A., IGLESIAS N., CARRANZA F., 1999. Inhibition of bioleaching process by organics from solvent extraction. **Process Biochem.**, London, v. 35, p. 425-31.

MCCREADY, R. G. L., AND B. P. LE GALLAIS, 1984. Selective adsorption of ³²P-labelled *Thiobacillus ferrooxidans* in finely ground coal suspensions. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 12, p.281-288.

MEHTA, A.P. AND MURR, L.E., 1983. Fundamental studies of the contribution of galvanic interaction to acid-bacterial leaching of mixed metal sulphides, **Hydromet.**, Amsterdam, v. 9, p. 235-256.

MEHTA, A.P., MURR, L.E., 1982. Kinetics study of sulfide leaching by galvanic interaction between chalcopyrite, pyrite and sphalerite in the presence of *T. ferrooxidans* (30 C) and thermophilic microorganism (55 C). **Biotechnol. Bioengin.**, New York, v. 24, p. 919-40.

MENON AG, DAVE SR, 1996. Influence of preservation substrate on ferro oxidation ability of various *Thiobacillus ferrooxidans* isolates. **Microbiol Res.**, London, v. 151, n. 3, p.225-9.

MODAK, J.M. and NATARAJAN, K.A. Development of special strains of *Thiobacillus ferrooxidans* for enhanced bioleaching of sulphide minerals. In: **Biohydromet. process.**, Chile, v. 1, p. 33-46, 1995

MONTGOMERY, D. C. and RUNGER, G. C. **Applied Statistics and Probability for engineers.** New York, John Wiley & Sons, 1996.

MURTHY, K. S. N., AND NATARAJAN, K. A., 1992. The role of surface attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on the biooxidation of pyrite. **Miner. Metallurg. Processing**, Amsterdam, v. 9, p. 20-24.

NARDI, R.P. **Análise crítica do desenvolvimento de processos de cianetação em tanques agitados.** São Paulo, 2000. 221 p. Tese Doutorado. Escola Politecnica da USP.

NATARAJAN, K.A., SUDEESHA, K., RAO, G.R., 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wagenengen, v. 66, n. 4, p. 303-6.

NEMATI, M. et al., 1998. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v. 1, p. 171-190.

NEWMONT GOLD, 1994. Commercializes bioleaching process for gold. **Skillings Mining Review**. (March, 1994), p. 6-9.

NORRIS, P.R., KELLY, D.P. Toxics metals in leaching systems. In: Murr, L.E., Brierley, J.A., eds. **Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena**. New York, Academic Press, 1978. p. 83-102.

NOVO MT, DA SILVA AC, MORETO R, CABRAL PC, COSTACURTA A, GARCIA O JR, OTTOBONI LM, 2000. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wagenengen, v. 77, n. 2, p.187-95.

OHMURA N, TSUGITA K, KOIZUMI JI, SAIKA H, 1996. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, n. 19, p.5776-80.

OLIVER, D.J. AND VANSLYKE, J.K., 1988. Sulfur-dependent inhibition of protein and RNA synthesis by iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 263, n. 2, p. 369-377.

PADAN E, Adaptation of bacteria to external pH. In Klug MJ, Reddy CA (eDs.), **Curr. Perspect. Microbial. Ecol. Proc. Int. Symp.** 3rd, 1984, pp 49-55.

PAGELLA, C. AND FAVERI D.M., 2000. H₂S Treatment by iron process. **Chemical Eng. Science**, v. 55, p. 2185-94.

PESIC B, Redox potential technique to study the factors of importance during reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* with Fe²⁺. In: Torma AE, Wey JE Lakshmanan VL(Eds) **Biohydrometallurgical technologies**. The minerals, Metal and Material Society, Jakson Hill. Wyoming. 1996. pp 545-560.

RATTI, G., CHAVES, A.P. **Análise químicas em engenharia mineral**. São Paulo, EPUSP, 22 p., 1995. (Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP, Departamento de Engenharia de Minas, BT-PMI-031)

RAWLINGS DE, et al., 1999. Reasons why *Leptospirillum*-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. **Microbiology**, London, v. 145 (Pt 1), p.5-13. Review.

RAWLINGS DE, KUSANO T, 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, n. 1, p.39-55

RAWLINGS, D.E., 2001. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 59, p. 187 -201.

RIBET, I., 1994. Le drainage acide. **Annales des minas**, Février, p. 61-64, 1994.

RODRIGUEZ-LEIVA, M., AND TRIBUTSCH H., 1988. Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 149, p. 401-405.

ROJAS-CHAPANA JÁ, BARTELS CC, POHLMAN L, TRIBUTSCH H., 1998. Co-operative leaching and chemotaxis of *thiobacilli* studied with spherical sulphur/sulphide substrates. **Process biochem.**, London, v. 33, n. 3, p. 239-248.

ROJAS-CHAPANA JÁ, GIERSIG M. AND TRIBUTSCH H., 1996. The path of sulfur during the bio-oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Fuel**, v. 75, n. 8, p. 923-30.

ROJAS-CHAPANA JÁ, TRIBUTSCH H., 2000. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. **Process biochem.**, London, v. 35, p. 815.

ROSENBERG, M., GUTNICK D. AND ROSENBERG E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring hydrophobicity. **FEMS Microbiol. Lett.** Amsterdam, v. 9, p. 29-33.

SAMPSON, MI AND BLAKE II R.C., 1999. The cell attachment and oxygen consumption of two strain of *Thiobacillus ferrooxidans* . **Minerals Engineering**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 671-86.

SCHARDER JA, HOLMES DS., 1988. Phenotype switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 3915-3923.

SHRIHARI, R. KUMAR, K. S. GANDHI, AND K. A. NATARAJAN, 1991. Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 36, p.278-282,

SHRIHARI, S. R. BHAVARAJU, J. M. MODAK, R. KUMAR, AND K. S. GANDHI, 1993. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 41, p. 612-616.

SILVER M, et al. 1974. Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 20, n. 2, p.141-7.

SMITH JR, LUTHY GR, MIDDLETON AC., 1988. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **J. Water Pollut. Control Fed.**, Washington, v. 60, n. 4, p. 518-530.

SOUTHWOOD, M.J. SOUTHWOOD, A.J. Mineralogical observations on the bacterial leaching of auriferous pyrite: a new mathematical model and implications for the release of gold. In: Lawrence, R.W., Branion, R.M.R., Ebner,H.G., eds. **Fundamental and applied biohydrometallurgy**, Vancouver, 1985. p. 98-113.

SPENCER, P.A., 2000. Influence of bacterial culture selection on the operation of plant treating refractory gold ore. **Int. Mineral. Process.**, Amsterdam , v. 62, p. 217-229.

SUSUKI, I., et al., 1990. Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric reduction activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur or a sulfide ore. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 1620-26.

SUSUKI, I., 1999. Oxidation of inorganic sulfur compound: chemical and enzymatic reaction. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 56, p. 97-05.

SUSUKI, I., LIZAMA, H.M. AND TACKABERRY, P.D., 1989. Competitive inhibition of ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* by increasing concentration of cells. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1117-1121.

SUZUKI I., 2001. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 19, p.119-132.

- TANO T, et al. 1978. Sulfide oxidation by spheroplasts of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 6, p.1198-205.
- TAXIARCHOU, M., ADAM, K., KONTOPOULOS, A., 1994. Bacterial oxidation for gold extraction from Oympias refractory arsenical pyrite concentrate. **Hydromet.**, Amsterdam, v. 36, p. 169-185.
- TORMA, A.E. A review of gold BioHydrometallurgy. In: **International biotechnology symposium**, 8., Paris, 1988. Proceedings. s.l. Societe française de microbiologie, 1988. v. 2, p. 1158-68.
- TORRES, V.M. **Diagnóstico de lixiviação para minérios de ouro**. São Paulo, 1996. 75p. Dissertação de Mestrado, Escola Politecnica da USP.
- TORRES, V.M. **Sistema especialista para o processamento de minérios de ouro**. São Paulo, 1999. 206 p. Tese Doutorado. Escola Politecnica da USP.
- TREMOLADA, C.J.P. , **Caracterização dos parâmetros críticos na biolixiviação de pirita aurífera refratária catalisada pelo *Thiobacillus ferrooxidans***. Porto Alegre, 1990, 302p. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica da UFRGS.
- TUOVINEN OH., 1978. Inhibition of *Thiobacillus ferrooxidans* by minerals flotation reagents. **European J. App. Microbiol. Biotechnol.** Oxford, v. 5, p. 301-304.
- TUOVINEN, O.H., Biological fundamentals of mineral leaching processes. In: EL. Erlich and C.L. Brierley (Editors), **Microbial Mineral Recovery**. McGraw-Hill, New York (1990), pp. 55-77.
- TUOVINEN, O.H. et al., 1994. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 9, p. 3268-74.
- TUOVINEN, O.H., KELLY, D.P., 1973. Studies on the growth of *T. ferrooxidans*. I. use of Membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with ¹⁴CO₂-fixation and iron oxidation as measure of growth. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 88, p.285-298.
- UBALDINI, S. et al., 1997. Biooxidation of arsenopyrite to improve gold

cyanidation: study of some parameters and comparison with grinding. **Int. J. Miner. Process**, Amsterdam, v. 52, p. 65-80.

UBALDINI, S. et al., 2000. Gold recovery from a refractory pyrrhotite ore by biooxidation. **Int. J. Miner. Process**, Amsterdam, v. 60, p. 247-262.

URENHA, L.C., **Metodologia para pesquisas de lixiviação bacteriana**. São Paulo, 1992. 167p. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica da USP.

VELASCO, P. The mineral industry of Chile—2000. In: **U.S. GEOLOGICAL SURVEY MINERALS YEARBOOK—2000**, p. 7.1-7.13.

VOGEL, A.I., **Quantitative Inorganic Analysis**. Longmans, London (1961)

WILDEMAN, T.R., AND LAUDON, L.S., 1989. Use of wetlands for treatment of environmental problems in mining: non-coal-mining applications. **Constructed Wetlands for Wastewater Treatment**. Lewis Publishers. Boca Raton, FL 550-557.

YEH, T.Y., et al., 1986. Use of epifluorescence microscopy for characterizing the activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 30, p. 138-146.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	19
Tabela 2 – Análise mineralógicas e química de concentrados (São Bento)	46
Tabela 3 – Análise granulométrica do minério	46
Tabela 4 – Codificação de variáveis	59
Tabela 5 – Curva de calibração	63
Tabela 6 – Efeito da concentração inicial de 2 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	67
Tabela 7 – Efeito da concentração inicial de 4 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	67
Tabela 8 – Efeito da concentração inicial de 8 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	70
Tabela 9 – Efeito da concentração inicial de 12 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	70
Tabela 10 – Efeito do cultivo repetitivo de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> sobre 15 % de substrato mineral sobre a bio-oxidação bacteriana	73
Tabela 11 – Efeito da capacidade oxidativa do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> adaptado a 1 %, 2 % e 4 % de minério	77
Tabela 12 – Efeito da capacidade oxidativa do <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> adaptado a 8 % e 12 % de minério	77
Tabela 13 – Crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério	81
Tabela 14 – Biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério	81
Tabela 15 – Crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério	82
Tabela 16 – Biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério	82
Tabela 17A – Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	87
Tabela 17B – Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm na velocidade de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	87
Tabela 18A – Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	88

Tabela 18B – Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm na velocidade de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	88
Tabela 19A – Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	89
Tabela 19B – Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm na velocidade de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	89
Tabela 20A – Efeito do pH inicial 1,4 no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	95
Tabela 20B – Efeito do pH inicial 1,4 na velocidade de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	95
Tabela 21A – Efeito dos reagentes de flotação sobre o crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99
Tabela 21B – Efeito dos reagentes de flotação sobre o processo de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99
Tabela 22 – Influência dos reagentes de flotação sob a capacidade de aderência de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	103
Tabela 23A – Influência dos reagentes de flotação sobre o processo de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	106
Tabela 23B – Influência dos compostos de flotação sobre o crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	106
Tabela 24 – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 15 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	110
Tabela 25A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	112
Tabela 25B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17% de sólidos	112
Tabela 26A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	114
Tabela 26B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	114
Tabela 27A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 18 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	116
Tabela 27B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 18 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	116
Tabela 28 – Planejamento fatorial	119

Tabela 29 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 23) em reator <i>Airlift</i> (16-8-5)	120
Tabela 30 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 24) em reator <i>Airlift</i> (18-8-5)	120
Tabela 31 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 25) em reator <i>Airlift</i> (16-12-7)	123
Tabela 32 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 26) em reator <i>Airlift</i> (16-12-5)	123
Tabela 33 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 27) em reator <i>Airlift</i> (18-12-7)	123
Tabela 34 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 28) em reator <i>Airlift</i> (16-8-7)	127
Tabela 35 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 29) em reator <i>Airlift</i> (18-12-5)	127
Tabela 36 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 30) em reator <i>Airlift</i> (18-8-7)	127
Tabela 37 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 31A) em reator <i>Airlift</i> (17-10-6)	131
Tabela 38 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 31B) em reator <i>Airlift</i> (17-10-6)	131
Tabela 39 – Controle de parâmetros de bio-oxidação (figura 32) em reator <i>Airlift</i> (17-10-6)	131
Tabela 40 – Resumo dos ensaios de biolixiviação	134
Tabela 41 – Codificação de variáveis para análise estatística	135
Tabela 42 – Coeficientes de contraste para o Fe	136
Tabela 43 – Efeitos calculados para o ferro e seus erros padrão	136
Tabela 44 – Coeficientes de contraste para o As	138
Tabela 45 – Efeitos calculados para o arsênico e seus erros padrão	138
Tabela 46 – Coeficientes de contraste para o Au	140
Tabela 47 – Efeitos calculados para o ouro e seus erros padrão	140
Tabela 48 – Análise de Variância para Fe _{to} (unidades codificadas)	142
Tabela 49 – Análise de Variância para As _{to} (unidades codificadas)	144
Tabela 50 – Análise de Variância para ouro (unidades codificadas)	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bioreator de tanque agitado	41
Figura 2 – Bioreator Airlift	57
Figura 3 – Efeito da concentração inicial de 2 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	68
Figura 4 – Efeito da concentração inicial de 4 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	68
Figura 5 – Efeito da concentração inicial de 8 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	71
Figura 6 – Efeito da concentração inicial de 12 % minério sobre a bio-oxidação bacteriana	71
Figura 7 – Efeito do cultivo repetitivo de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> sobre 15 % de substrato mineral sobre a bio-oxidação bacteriana	74
Figura 8 – Efeito da capacidade oxidativa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> adaptado a 1 %, 2 % e 4 % de minério	78
Figura 9 – Efeito da capacidade oxidativa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> adaptado a 8 % e 12 % de minério	79
Figura 10 – Crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério	83
Figura 11 – Crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério	83
Figura 12 – Biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 1 % de minério	84
Figura 13 – Biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Tf-LR) não adaptado na presença de 5 % de minério	84
Figura 14 – Efeito de concentração férrica inicial 0 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	90
Figure 15 – Efeito de concentração férrica inicial 25 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	91
Figure 16 – Efeito de concentração férrica inicial 250 ppm na velocidade de biolixiviação e no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	92
Figure 17 – Efeito do pH inicial 1,4 na velocidade da biolixiviação e no crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	96
Figura 18A – Efeito dos reagentes de flotação sobre o	

crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	101
Figura 18B – Efeito dos reagentes de flotação sobre o processo de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .	101
Figura 19 – Influencia dos reagentes de flotação sob a capacidade de aderência de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	104
Figura 20A – Influência dos reagentes de flotação sobre o processo de biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	107
Figura 20B – Influência dos compostos de flotação sobre o crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	107
Figura 21 – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 15 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	111
Figura 22A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i> .	113
Figura 22B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17% de sólidos	113
Figura 23A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	115
Figura 23B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 17 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	115
Figura 24A – Perfil de bio-oxidação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 18 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	117
Figura 24B – Perfil de crescimento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em 18 % de substrato mineral em bioreator <i>Airlift</i>	117
Figura 25 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (16-8-5)	121
Figura 26 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (18-8-5)	122
Figura 27 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (16-12-7)	124
Figura 28 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (16-12-5)	125
Figura 29 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (18-12-7)	126
Figura 30 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (16-8-7)	128

Figura 31 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (18-12-5)	129
Figura 32 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (18-8-7)	130
Figura 33 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (17-10-6)	132
Figura 34 – Crescimento e biolixiviação de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em reator <i>Airlift</i> (17-10-6)	133
Figura 35 – Gráfico de probabilidade normal para os efeitos do ferro	143
Figura 36 – Gráfico Pareto para os efeitos do ferro	143
Figura 37 – Gráfico da probabilidade normal para os efeitos do arsênico	145
Figura 38 – Gráfico Pareto para os efeitos do arsênico	145
Figura 39 – Gráfico da probabilidade normal para os efeitos do ouro	146
Figura 40 – Gráfico Pareto para os efeitos do ouro	146

Anexos

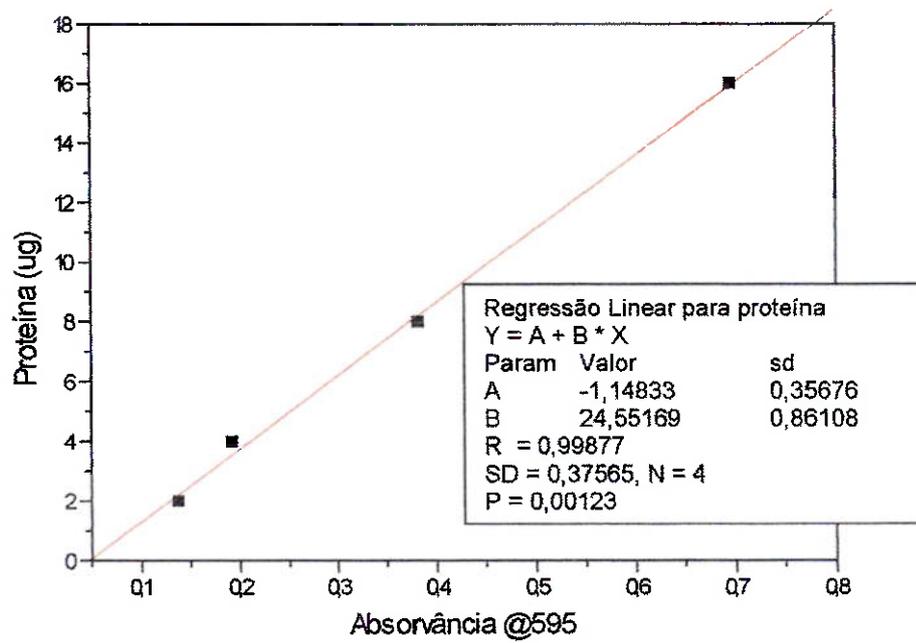


Figura A1 – Curva Padrão da proteína utilizando albumina bovina como padrão

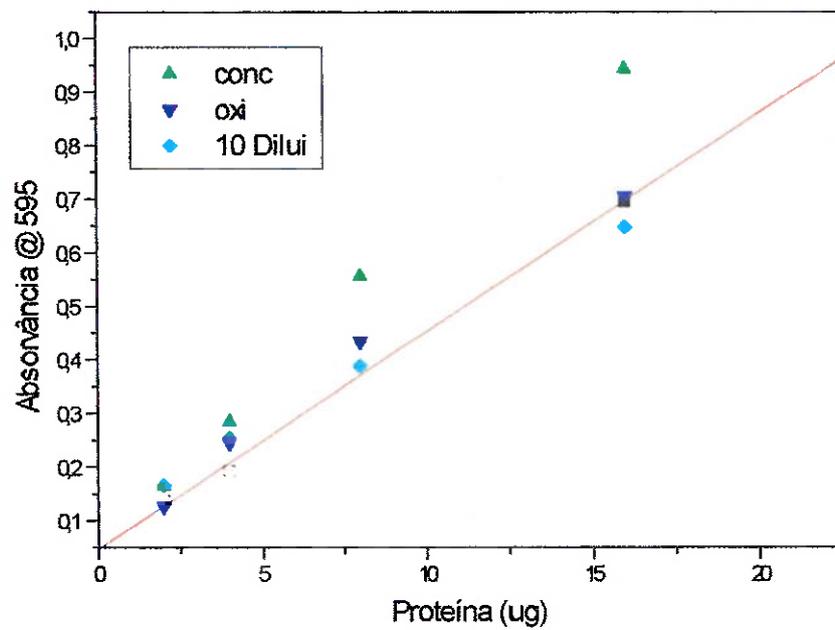


Figura A2 – Curva Padrão da proteína utilizando albumina bovina como padrão na presença de 1 g. de concentrado

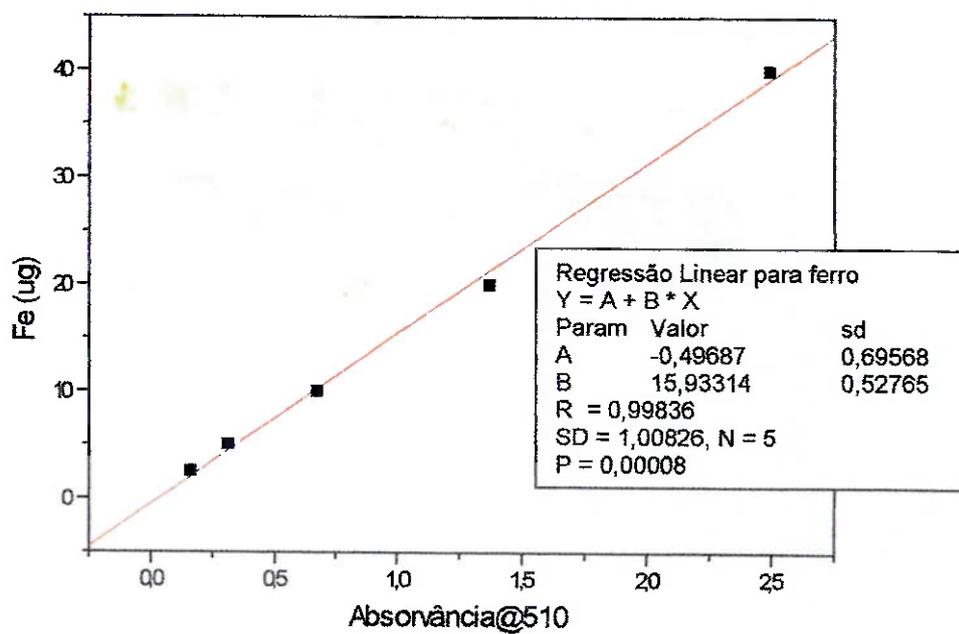
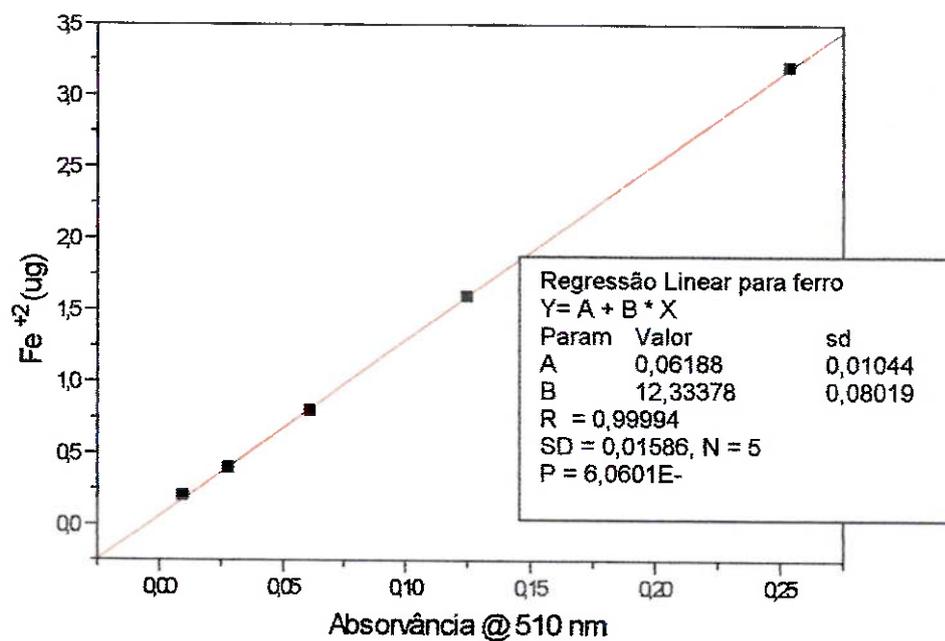


Figura A3 – Curva Padrão do Ferro utilizando fenantrolina