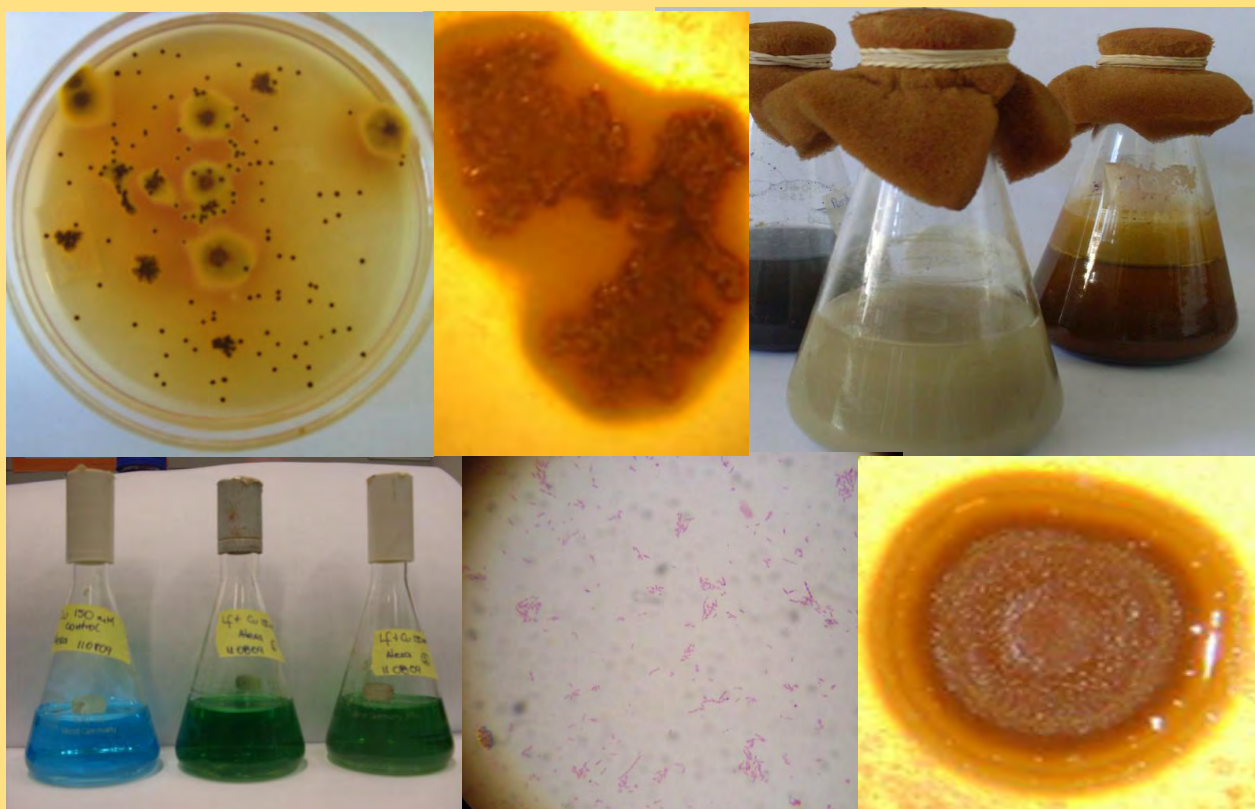


**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Nury Alexandra Muñoz Blandón



Recuperação de níquel e outros metais a partir de diferentes fontes (rejeitos de processo industrial e pentlandita $(\text{Ni,Fe})_9\text{S}_8$) por lixiviação bacteriana e ácida.

Araraquara 2010

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RECUPERAÇÃO DE NÍQUEL E OUTROS METAIS A PARTIR DE
DIFERENTES FONTES (REJEITOS MINERAIS DE PROCESSO
INDUSTRIAL E PENTLANDITA (Ni,Fe)₉S₈) POR LIXIVIAÇÃO
BACTERIANA E ÁCIDA**

Tese de Doutorado

2010

NURY ALEXANDRA MUÑOZ BLANDON

**RECUPERAÇÃO DE NÍQUEL E OUTROS METAIS A PARTIR DE
DIFERENTES FONTES (REJEITOS MINERAIS DE PROCESSO
INDUSTRIAL E PENTLANDITA (Ni,Fe)₉S₈) POR LIXIVIAÇÃO
BACTERIANA E ÁCIDA**

Defesa de Doutorado a ser apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr.

Co-orientadora: Dra. Denise Bevilaqua.

Araraquara – SP

2010

DADOS CURRICULARES

NURY ALEXANDRA MUÑOZ BLANDÓN

1. Dados Pessoais

Nacionalidade: Colombiana

Naturalidade: Medellín, Antioquia

Filiação: Joaquín Emilio Muñoz Quiceno

Alba Ofelia Blandón Correa

Estado civil: Solteira

Profissão: Microbióloga

Documento de identidade: RNE v4479552

Cadastro de Pessoa Física: 232.150.048-44

Endereço: Av. Itápolis 2471, Bairro Bela Vista

CEP: 14800-040, Araraquara – SP

e-mail: alexamb@iq.unesp.br

2. Formação Acadêmica/Titulação

2.1. Graduação

Bacharel em Microbiologia, Universidad de Antioquia – UdeA, Medellín, Colômbia. Concluído em agosto de 1996.

2.2. Pós-graduação

Mestrado em Biotecnologia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín – UNALMED, Medellín, Colômbia. Concluído em 2002.

3. Produção Bibliográfica

3.1. Trabalhos publicados/submetidos a periódicos

Muñoz A., Montoya O., Márquez M., Ruiz O., Lemehsko V. Evaluación de oxidación bacteriana de sulfuros con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante pruebas de FTIR y difracción de rayos X. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. V (1), p. 73-81. 2003.

MUÑOZ, A.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Leaching of Ni and Cu from mine wastes (tailings and slags) by acid solutions and by *A. ferrooxidans*. **Advances Materials Research**, v. 71-73, p. 425-428. 2009.

3.2. Trabalhos publicados em congressos

MUÑOZ, A.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Leaching of Ni and Cu from mine wastes (tailings and slags) by acid solutions and by *A. ferrooxidans*. In International Biohydrometallurgy Symposium IBS 2009, 18th, 2009, Bariloche. **Proceedings...** Zurich: Trans Tech Publications Ltd, 2009. p 425-428.

MUÑOZ, A.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Bioleaching of Ni and Co from mine wastes: slags and flotation tailings. In Conference on Environmental and Mineral Processing, 13th, 2009, Ostrava. **Proceedings...** Ostrava. p. 27-30.

MUÑOZ, A.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Comparative study on the nickel bioleaching of mine wastes (slag and tailings). In: ALTA 2010 Nickel/Cobalt/Copper Conference, 2010, Perth. **Proceedings...**

3.3. Participação em eventos

- II Simpósio de Microbiologia Aplicada. UNESP- Rio Claro. Brasil. 2007.
- XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Universidad de La Asunción. Paraguay. 2007.
- VII Curso Latinoamericano de Biotecnología y XXXVIII Curso Internacional de Ingeniera Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 2008.
- II Workshop Internacional de Microbiologia Ambiental. Universidade Tiradentes. Sergipe, Brasil. 2008.
- 13th Conference of Mineral Processing and Environment & Exhibition. University of Ostrava. República Checa. 2009.
- 18th International Biohydrometallurgy Symposium, Bariloche, Argentina. 2009.
- ALTA 2010 Nickel/Cobalt/Copper Conference, Perth, Australia. 2010.

3.4. Outros

Premio. 2do melhor poster em: VII Curso Latinoamericano de Biotecnologia y XXXVIII Curso Internacional de Ingeniera Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 2008.

Estágio. Estágio durante 6 meses no laboratório de Biotecnologia Aquática do Biofilm Center da Universidade Duisburg-Essen com o Prof. Dr. Wolfgang Sand. Bolsa de curta duração do DAAD, 2009.

Revisão de paper para a revista Hydrometallurgy, 2010.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais pelo apoio sempre incondicional.

À COLFUTURO, pela bolsa concedida para iniciar o doutorado.

Ào Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior e à Dra. Denise Bevilaqua, por me aceitar aqui, pelo voto de confiança, pelas orientações, pelo tempo que me dedicaram.

À meus colegas de laboratório: Ana Paula, Wanessa, Fabiana, Gustavo, Waldenir, Pricila, Robson, Marcelo, Robson, Daniel e Mauricio, pela amizade e parceria, por tanta ajuda que me ofereceram. Por me ensinar português!!

À Jéssica, Claire, Miguel e Simone meus amigos de casa, por tantas risadas juntas, pelas confidências, por tantos momentos bons.

Ào Flávio Soares, meu melhor amigo brasileiro, por tanta ternura, carinho, apoio e dedicação, por meus melhores momentos no Brasil e especialmente por ter me ensinado tanto como pessoa.

Ào Instituto de Química, especialmente às “meninas” da PG, Sandra, Célia, Patricia, Vania, pela paciência e colaboração.

Àos membros da banca pelas correções e sugestões para melhorar este trabalho.

Ào CNPq pela bolsa concedida para terminar o doutorado.

À VOTORANTIM METAIS pelo apoio técnico e financeiro.

RESUMO

Uma possibilidade para a recuperação de metais a partir de minerais com baixos teores ou de rejeitos industriais é a utilização da lixiviação com micro-organismos. A biolixiviação é o processo de oxidação bacteriana de sulfetos metálicos contendo metais de valor (por exemplo, níquel, cobre ou zinco), os quais são liberados para a solução, seguida da recuperação por técnicas metalúrgicas convencionais. Estudos de biolixiviação de concentrados de sulfetos minerais em tanques agitados e, sobretudo em pilhas, têm sido desenvolvidos em escala piloto e comercial. Entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados sobre o aproveitamento de rejeitos minerais de processos convencionais, tais como flotação ou fusão em forno “flash”, por rotas biotecnológicas.

O objetivo deste trabalho foi recuperar níquel e cobre de rejeitos industriais, provenientes de processo de flotação e de fusão, utilizando bactérias, especialmente da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* ou pelo uso de soluções ácidas, em escala de laboratório. Também foram realizados experimentos de biolixiviação de um sulfeto de níquel (pentlandita) para avaliar o processo de solubilização do metal. Conjuntamente, outros experimentos foram realizados com a finalidade de se obter novas linhagens isoladas a partir destes rejeitos minerais. Suas diferenças fisiológicas foram avaliadas.

A partir dos experimentos com os rejeitos encontrou-se que com a escória foi possível obter 13% de níquel e 8 % de cobre em solução após 14 dias de lixiviação biológica. Com soluções ácidas, em pH 0,5 e 1,0, as recuperações foram de 56% de níquel e 24% de cobre em pH 0,5 enquanto que em pH 1,0 as concentrações foram de 21% e 12% de níquel e cobre, respectivamente. Para a recuperação de níquel e cobre deste rejeito sugere-se a lixiviação ácida e não bacteriana. Com a lama as porcentagens de recuperação dos metais foram de 23% e 16% de níquel e cobre com as soluções ácidas em pH 0,5 e 1,0 enquanto que após 14 dias de lixiviação bacteriana as concentrações em solução foram de 46% e 17% de níquel e cobre, respectivamente. Com estes resultados foi observado que o rejeito da lama pode ser tratado com lixiviação bacteriana para uma maior recuperação dos metais.

Os estudos de biolixiviação do sulfeto de níquel com diferentes espécies bacterianas só atingiram 20% da concentração de níquel em solução após 30 dias de processo. Esta baixa recuperação de níquel, a partir do minério pode ser

explicada pela composição do mesmo e pela química das reações que ocorrem durante a lixiviação.

Diferentes linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram obtidas a partir dos rejeitos tratados neste trabalho. Cada uma das linhagens apresentou uma morfologia de colônia diferente e respostas também diversas para os testes de avaliação fisiológica, confirmando a diversidade fenotípica desta espécie bacteriana.

Palavras chaves: *A. ferrooxidans*, Biolixiviação, rejeitos minerais, pentlandita

ABSTRACT

Bacterial leaching is a feasible to recover metals from minerals with low grade or from mine wastes using microorganisms. The bioleaching process is the bacterial oxidation of valuable metals bearing sulphide minerals (e.g. nickel, copper or zinc), which are released to the solution, followed by conventional recovered by metallurgical techniques. Studies on bioleaching of sulphide minerals concentrates in stirred tanks and, particularly, in heaps, have been developed on pilot and commercial scales. However, few studies have been undertaken on using of mineral wastes from conventional processes such as flotation or flashing smelting through biotechnological routes.

This work aims at recovering nickel and copper from industrial wastes such as flotation tailings and slag using bacteria, especially *Acidithiobacillus ferrooxidans* species, or using acid solutions at laboratory scale. Experiments were also accomplished for nickel sulfide bioleaching to evaluate the metal dissolution process, for comparison purpose. Other experiments were also carried out to obtain new strains isolated from mineral waste to study the physiological differences between them.

After 14 days of bioleaching of slag it was possible to extract 13% of nickel and 8% of copper in solution while with acid solutions the extractions were 56% of nickel and 24% of copper at pH 0.5 and 21% and 12% at pH 1.0, respectively. For the metals solubilization from the slag it is suggested the acid leaching instead of bioleaching. With the flotation tailings the recoveries of nickel and copper were 23% and 16% at pH 0.5 or 1.0 while after 14 days with bioleaching the concentrations in solution were 46 % and 17% for nickel and copper. These results show that the flotation tailings can be treated with biological leaching for a higher recovery of metals.

The studies of nickel sulfide bioleaching with different bacterial species reached only 20% of the concentration of nickel in solution after 30 days of process. This low recovery of nickel from the ore can be explained by the mineralogical composition and the chemical reactions that occur during leaching

Different strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* were obtained from the waste treated in this work. Each of the strains had different colony morphology and also different responses to physiological tests confirming the phenotypic diversity of bacterial species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Variação do preço do níquel no mercado durante os últimos 5 anos.	23
Figura 2.	Variação do preço do cobalto no mercado durante os últimos 5 anos.	25
Figura 3.	Variação do preço do cobre no mercado durante os últimos 5 anos.	26
Figura 4.	Esquema resumido do processo de recuperação de metais.	33
Figura 5.	Difratogramas das amostras originais de escória e da lama utilizadas nos ensaios de biolixiviação.	51
Figura 6.	Consumo de oxigênio de <i>A. ferrooxidans</i> -LR na presença de 100 mg de rejeito: lama original; lama moída; escória original; escória moída.	53
Figura 7.	Variação do pH e potencial de óxido-redução nos experimentos de biolixiviação da escória (frascos agitados).	54
Figura 8.	Extração de níquel e cobre nos sistemas de biolixiviação da escória (frascos agitados).	55
Figura 9.	Difração de raios X dos sólidos da escória após 14 dias de biolixiviação.	56
Figura 10.	Lixiviação ácida da escória realizada em pilha.	59
Figura 11.	Sistema estático em bandeja com escória.	60
Figura 12.	Lixiviação ácida da escória estático (béquer).	61
Figura 13.	Variação do pH e potencial redox nos experimentos com lama.	62
Figura 14.	Extração de níquel e cobre nos experimentos com lama.	62
Figura 15.	Difração de raios X dos sólidos da lama após 14 dias de	

	biolixiviação.	64
Figura 16.	Variação do pH e Eh nos experimentos com lama (50 dias)	66
Figura 17.	Extração de níquel e cobalto nos experimentos com lama (50 dias).	66
Figura 18.	Difração de raios X dos sólidos após 50 dias de biolixiviação.	68
Figura 19.	pH e Eh da biolixiviação da lama em um sistema estático.	69
Figura 20.	Solubilização de níquel e cobalto a partir da lama em sistema estático	70
Figura 21.	pH e Eh de lama em sistema estático com adição de ácido sulfúrico numa concentração $1,25 \text{ mol L}^{-1}$.	71
Figura 22.	Solubilização de níquel e cobalto a partir da lama em sistema estático com adição de ácido sulfúrico $1,25 \text{ mol L}^{-1}$.	71
Figura 23.	DRX da amostra original e após a lavagem com EDTA-NaOH	73
Figura 24.	Variação do pH nos experimentos de biolixiviação de pentlandita.	74
Figura 25.	Solubilização de níquel, cobre, magnésio e sulfato nos experimentos de biolixiviação de pentlandita.	75
Figura 26.	DRX dos resíduos sólidos após 30 dias de lixiviação biológica e abiótica.	76
Figura 27.	Variação do pH e Eh nos experimentos de perda de metais.	79
Figura 28.	Extração de níquel e cobre nos experimentos de perda de metais.	80
Figura 29.	Extração de níquel e cobre nos experimentos de perda de metais sem adição do metal.	81
Figura 30.	DRX dos sólidos após o ensaio de perda de metais com pirrotita e pentlandita mais 1 g L^{-1} de níquel ou cobre.	82
Figura 31.	Variação do pH e Eh nos experimentos de biolixiviação de	

	pentlandita.	83
Figura 32.	Extração de níquel e cobre nos experimentos de biolixiviação de pentlandita.	84
Figura 33.	Solubilização de ferro total nos experimentos de biolixiviação de pentlandita.	86
Figura 34.	DRX dos resíduos sólidos após 30 dias de lixiviação biológica e abiótica.	87
Figura 35.	Colônias crescidas em meio T&K pH 1,8-agarose a partir dos diferentes rejeitos.	91
Figura 36.	Fotografias em detalhe das colônias obtidas a partir dos cultivos de ferro ferroso em meio sólido T&K-agarose.	92
Figura 37.	Produtos da amplificação do DNA em gel de electroferese com a técnica de DGGE.	95
Figura 38.	Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com linhagens de coleção (LR e ATCC) a diferentes temperaturas (30, 35 e 45°C).	97
Figura 39.	Porcentagem de oxidação de ferro ferroso em diferentes valores de pH (1,4 – 1,8 – 2,2)	99
Figura 40.	Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com a linhagem de coleção <i>A. ferrooxidans</i> –LR em lama ou escória como substratos.	100
Figura 41.	Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com a linhagem de coleção <i>A. ferrooxidans</i> –LR em pentlandita, pirita ou calcopirita como substratos.	101
Figura 42.	Porcentagens de oxidação de ferro ferroso das linhagens isoladas comparadas com a cepa de coleção LR em presença de diferentes concentrações de níquel.	102
Figura 43.	Porcentagens de oxidação de ferro ferroso das linhagens isoladas comparadas com a cepa de coleção <i>A.f</i> -LR em presença de diferentes concentrações de cobalto.	106
Figura 44.	Porcentagens de oxidação de ferro ferroso das linhagens isoladas comparadas com a cepa de coleção <i>At.f</i> -LR em presença de diferentes concentrações de cobre.	107
Figura 45.	Variação do pH e potencial redox das biolixiviações de lama	

e escória.

109

Figura 46. Porcentagens de extração de Ni e Co a partir de lama e escória.

110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos diferentes tratamentos da biolixiviação de escória ou lama.	37
Tabela 2.	Descrição dos diferentes tratamentos da biolixiviação da lama.	39
Tabela 3.	Meios líquidos utilizados no enriquecimento de microorganismos acidófilos oxidantes de ferro e enxofre.	40
Tabela 4.	Meio sólido T&K-agarose.	46
Tabela 5.	Meio sólido com tiosulfato para bactérias oxidantes de enxofre.	47
Tabela 6.	Concentrações dos elementos escolhidos para o teste de resistência.	49
Tabela 7.	Concentração de níquel, cobalto e cobre nos rejeitos (%).	50
Tabela 8.	Porcentagens de extração de níquel e cobre depois de lixiviação química.	52
Tabela 9.	Porcentagens de extração após 14 dias de biolixiviação da escória em frascos agitados.	56
Tabela 10.	Porcentagem de recuperação dos metais Ni, Cu e Co em cada pilha ácida e seu correspondente consumo de ácido	59
Tabela 11.	Porcentagens de extração após 14 dias de biolixiviação da lama.	63
Tabela 12.	Porcentagens de extração de níquel e cobre depois da lixiviação bacteriana agitada.	65
Tabela 13.	Porcentagens de extração de metais após 50 dias de biolixiviação da lama	67
Tabela 14.	Porcentagens de extração de níquel e cobalto nos sistemas	

estáticos com lama após lixiviação bacteriana. 72

Tabela 15. Descrição das colônias crescidas em meio sólido a partir dos diferentes rejeitos. 90

Tabela 16. Identificação presumível de microorganismos acidófilos oxidantes de ferro baseada na morfologia de colônia 93

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Metais de interesse: níquel, cobalto e cobre.	21
1.1.1 Níquel	21
1.1.2 Cobalto	23
1.1.3 Cobre	25
1.2 Mecanismos de biolixiviação	26
1.3 Processos biotecnológicos de lixiviação de metais	28
1.3.1 Biolixiviação de montes	29
1.3.2 Biolixiviação/Bioxidação em pilhas	29
1.3.3 Biolixiviação/Bioxidação em tanques agitados	31
1.4 Solubilização de metais a partir de rejeitos minerais	31
1.5 Solubilização de níquel e cobre a partir de minério natural	34
1.6 Micro-organismos relevantes à extração de metais	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de rejeitos minerais	36

2.2 Solubilização de níquel e cobre a partir de minério natural	40
2.3 Isolamento de micro-organismos a partir de rejeitos minerais	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1 Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de rejeitos minerais	50
3.2 Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de minério natural	75
3.3 Isolamento de microorganismos a partir de rejeitos minerais	89
3.3.1 Estudos de biolixiviação de lama e escória com consorcio de cepas isoladas	108
3.3.2 Isolamento de micro-organismos oxidantes de enxofre	110
4. CONCLUSÕES	111
5. REFERENCIAS	117

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de micro-organismos em hidrometalurgia para a solubilização de metais como cobre, urânio e níquel, a partir de minérios de baixos teores ou de concentrados minerais (denominado bio-lixiviação) e como pré-tratamento de sulfetos na extração de ouro e prata (denominado bio-oxidação) é bem conhecido desde há muito tempo e já vem sendo aplicado em escala piloto e comercial. Nestes processos os micro-organismos utilizam os sulfetos minerais insolúveis como fonte de energia, levando à formação dos sulfatos solúveis e facilitando a recuperação dos metais.

Muitos estudos de laboratório têm demonstrado que os minérios contendo níquel e outros metais podem ser biolixiviados usando micro-organismos acidófilos oxidantes de ferro e/ou enxofre. Na indústria do níquel, particularmente, os estudos sobre lixiviação de sulfetos com interesse comercial têm sido aplicados nos seguintes minerais: milerita (NiS); niquelina (NiS); violarita $[(\text{Ni},\text{Fe})_3\text{S}_4]$, bravoita $[(\text{Ni},\text{Fe})\text{S}_2]$; heazelwoodita (Ni_3S_2) e mais comumente a pentlandita $[(\text{Fe},\text{Ni})_9\text{S}_{81}]$.

Contudo, vários especialistas têm destacado a necessidade de se averiguar as possibilidades de exploração das reservas de silicatos de níquel, e a recuperação a partir da reciclagem de níquel já utilizado, visando o atendimento à demanda futura e a redução dos custos de produção do metal. Rejeitos e resíduos de minas, como as escórias, oferecem outra fonte de reservas de metais.

Poucos dados, com relação à biolixiviação de escórias, podem ser encontrados na literatura. Por tal motivo é importante avaliar o uso potencial de micro-organismos para recuperar metais contidos em rejeitos minerais e ao mesmo tempo propor um aproveitamento e melhor disposição desses materiais que põem em risco o meio ambiente pela possibilidade real de ocorrer a conhecida “drenagem ácida de mina” e pela presença de metais pesados.

O presente trabalho apresenta os resultados obtidos nos estudos exploratórios de lixiviação ácida e bacteriana nas amostras de rejeitos fornecidas pela empresa Votorantim Metais, assim como uma comparação com uma biolixiviação de um minério natural de níquel (pentlandita). Também são apresentados os estudos microbiológicos realizados com as novas linhagens isoladas a partir das mesmas amostras.

OBJETIVOS

O objetivo central desse projeto foi o desenvolvimento de um estudo de lixiviação bacteriana e/ou ácida de resíduos gerados por uma planta de processamento de um minério de níquel da Companhia Votorantim Metais, contendo, além do níquel, cobre e cobalto como elementos de maior interesse.

Os objetivos específicos são destacados a seguir:

- i) Realizar ensaios de lixiviação bacteriana dos rejeitos “escória” e “lama” utilizando a linhagem de coleção *A. ferrooxidans*-LR
- ii) Isolar micro-organismos com capacidade de bio-oxidar sulfetos minerais e bio-lixiviar níquel, cobre e cobalto a partir dos resíduos fornecidos pela empresa ou de locais adequados na própria mina.
- iii) Comparar a eficiência da oxidação dos sulfetos presentes nas amostras, bem como da biolixiviação dos metais mencionados, utilizando cepas isoladas desses materiais e da mina da empresa com as cepas da coleção do laboratório de biohidrometalurgia do IQ/UNESP.

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1. Metais de interesse: níquel, cobre e cobalto

Os metais são elementos simples que se caracterizam por possuir um brilho especial, boa condutividade de calor e de eletricidade e uma tendência a formar cátions. Os metais têm múltiplas aplicações e tem tido uma grande importância na história da humanidade, em diferentes áreas, desde a saúde até diferentes processos tecnológicos que governam a vida moderna.

A metalurgia é a ciência aplicada encarregada de estudar os processos pelos quais os metais são extraídos a partir dos minerais e sua aplicação é tão antiga que pode ser registrada desde o ano 6.000 a.C. Atualmente existem 86 metais conhecidos dos quais 12 deles foram descobertos antes do século 18 (como o ouro e o cobre) e outros 12 até o século 19 (como o cobalto e o níquel). (International...2010)

Todos os metais e compostos metálicos têm certo nível de toxicidade, podendo causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. O níquel, em certas formas, e em circunstâncias especiais, pode gerar efeitos prejudiciais no ambiente (incluindo à saúde e segurança); não obstante, ele é considerado um elemento vital para a saúde pública por alguns cientistas.

Com a crescente preocupação ambiental em nível mundial, vários países e/ou organizações internacionais foram estimulados a regularem a utilização de metais, incluindo o níquel, de acordo com suas propriedades químicas e físicas e os possíveis efeitos adversos que as suas aplicações possam causar. Existem, também, novos regulamentos que visam à proteção dos trabalhadores e dos consumidores (abordagem de saúde pública), enquanto outros se concentram na proteção do meio ambiente (visão ecológica).

1.1.1. Níquel

O níquel (Ni) é o quinto elemento mais abundante na terra e na crosta terrestre. Ocorre naturalmente em combinação com outros elementos cristalinos formando minerais, dos quais apenas alguns estão nomeados.

Devido às suas características físicas e químicas únicas, como alta resistência à corrosão, à oxidação e a altas temperaturas, pode, ainda, ser magnetizado e é facilmente combinado com outros metais para formar ligas. O níquel é altamente utilizado na indústria moderna, aproximadamente em 300 mil

produtos, especialmente na fabricação de aço inoxidável, magnetos, moedas, aeronaves, baterias recarregáveis e ligas, entre outros usos (International..., 2010).

As vantagens do níquel não se limitam aos atributos para os diferentes materiais e processos. Também estão as dimensões ambientais e sócio-econômicas que vão além das razões técnicas pelas quais o uso de níquel é tão considerado. O níquel é um investimento que possibilita muitos produtos (novos e emergentes) além de processos importantes para o aumento da eficiência ambiental. Faz muitos outros produtos e processos de energia mais eficientes, duráveis e resistentes. O valor do níquel garante que ele seja usado de forma eficiente e altamente reciclado. Os atributos de materiais contendo níquel são inteiramente favoráveis à ecoeficiência. A produção, utilização e reciclagem de níquel é uma atividade econômica de valor agregado que apóia comunidades e governos.

A extração de níquel pode ser realizada a partir de dois tipos de fontes minerais. A primeira é a fonte laterítica cujos principais minerais são óxidos como a limonita $(\text{Fe,Ni})\text{O}(\text{OH})$, e a garnierita $(\text{Ni, Mg})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})$. A outra fonte de níquel, da qual é gerado 55% da produção mundial do metal, são os sulfetos minerais associados, geralmente, com ferro ou magnésio (XU *et al.*, 2005), cujo principal mineral é a pentlandita $(\text{Ni,Fe})_9\text{S}_8$. Vinte países, de todos os continentes, extraem níquel e em 25 países ele é processado e refinado.

O uso do níquel aumentou ao longo do tempo e está correlacionado com o desenvolvimento econômico. Na década passada, a demanda de níquel no mundo aumentou de 1.01 bilhões de toneladas em 1998 para 1,28 bilhões de toneladas em 2008, uma taxa de crescimento de 2,4 por cento ao ano. No entanto, a tendência tem tido picos e vales (Figura 1). A maior demanda por níquel foi atingida em 2006 com 1,4 bilhões de toneladas.



Figura 1. Variação do preço do níquel no mercado durante os últimos 5 anos.

Em 2007, a demanda diminuiu e em 2008 caiu novamente devido a crise econômica mundial. A Ásia é hoje o maior mercado regional para o níquel representando 54% da demanda mundial total. A China, isoladamente, representa 25% da demanda mundial de níquel em comparação com 4%, dez anos antes (International... 2010; Nickel Institut, 2010).

Especialistas do setor estimam que os resíduos de níquel, 4.4-4.6 milhões de toneladas por ano, são recolhidos e reciclados. Nesse rejeito, são estimadas quase 350.000 toneladas de níquel (ou um quarto da demanda total) por ano, que são utilizadas, principalmente, na indústria de aço inoxidável. A maior parte da sucata provém de aço inoxidável, resultante de demolição de fábricas obsoletas, máquinas, equipamento e bens de consumo.

O níquel traz contribuições significativas para a sustentabilidade e pode ser responsavelmente gerenciado através da cadeia de valor do níquel, desde a indústria do níquel primário até a reciclagem a partir dos produtos (International..., 2010; Nickel Institut, 2010).

1.1.2 Cobalto

O cobalto (Co) é um dos metais essenciais para o ser humano e também é muito importante na indústria por suas qualidades estratégicas de alto ponto de fusão e resistência à corrosão. Antigamente era usado unicamente como corante e apenas a

partir do ano 1735 começou a ser utilizado como metal em ligas e posteriormente em magnetos. Na última década, o uso do cobalto tem-se incrementado em aplicações específicas, nas quais é difícil de substituir com materiais alternativos. Os principais usos do cobalto são a fabricação de baterias, pigmentos, corantes, ligas magnéticas, acessórios eletrônicos entre outros.

Este metal tem baixa concentração na crosta terrestre, geralmente associado com níquel ou cobre e alguns casos com prata ou arsênico. Cerca de 50% do cobalto provem da indústria do níquel, 35% da indústria de cobre e outros e 15% de fontes de cobalto primário (p.e: cobaltita, CoAsS), (Cobalt..., 2010)

O mercado do cobalto é dinâmico, mas pequeno em comparação com outros metais. Em 1995, o consumo de cobalto foi de 24.000 toneladas e cresceu a 60.800 toneladas no ano 2008. Os altos preços durante os anos 2006-2008 (Figura 2) levaram a um interesse de novos projetos para extração de cobalto em África, Australásia, Ásia e as Américas (incluindo Brasil). Vários deles projetados e financiados para produzir quantidades significativas de cobalto nos anos 2009-15. Durante 2009 a produção do cobalto aumento ligeiramente e a demanda caiu modestamente comparado com o ano 2008. Contudo, é esperado que a demanda supere a oferta devido á limitada produção e ausência de reservas para os anos 2014-2018 (Geovic...2010).

Uma rápida queda dos preços acoplada com a recessão global tem afetado a demanda e, conseqüentemente, as operações de extração. Contudo, o cobalto é, principalmente, um subproduto de operações de níquel e cobre e, portanto o preço é irrelevante à viabilidade do projeto. Embora a dependência do preço do mercado passa a ser relevante para projetos de cobalto primário.

Por outro lado, a reciclagem de cobalto a partir de material secundário tem aumentado nos últimos anos a ponto de dobrar a quantidade de metal recuperado de rejeitos, baterias e resíduos de refinaria de níquel (Cobalt..., 2010).

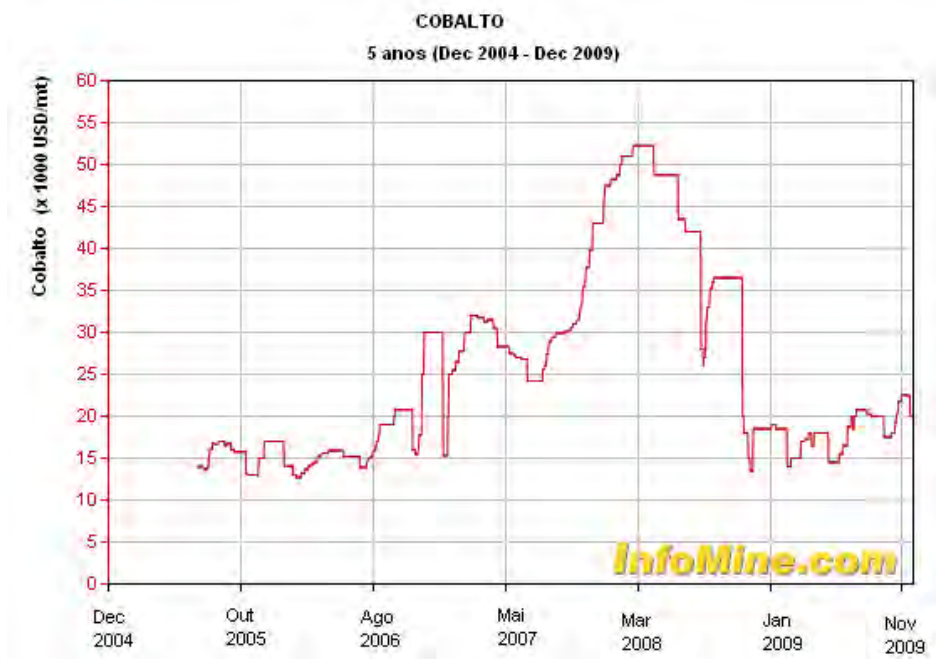


Figura 2. Variação do preço do cobalto no mercado durante os últimos 5 anos.

1.1.3 Cobre

O cobre (Cu) é um elemento essencial para todos os seres vivos e utilizado desde a antiguidade. Teve uma significativa participação na Revolução Industrial e desempenha um papel muito importante na tecnologia moderna por seus múltiplos usos. Sua grande aplicação dá-se pela combinação de suas propriedades como durabilidade, capacidade condutora de calor e eletricidade e porque pode ser reciclado. O cobre é utilizado em produtos na construção, na eletrônica, no transporte, na agricultura, nas aplicações industriais e maquinaria, entre outros (European..., 2010).

Este elemento ocorre, naturalmente, no ambiente de várias formas e diferentes teores desde traços, na maioria de rochas e solos, até elevados teores em sulfetos minerais (calcopirita $[CuFeS_2]$, bornita $[Cu_5FeS_4]$, calcocita $[Cu_2S]$), carbonatos (azurita $[Cu_3(OH)_2(CO_3)_2]$, malaquita $[Cu_2CO_3(OH)_2]$) e silicatos (chrysocolla $[(CuAl)_2H_2Si_2O_5(OH)_4]$, diopside $[CuSiO_2(OH)_2]$) ou como cobre metálico.

Fatores econômicos, sociais e tecnológicos afetam o suprimento e demanda de cobre. À medida que a população mundial se expande a demanda por cobre tende a incrementar, enquanto sobrevive aos ciclos econômicos, avanços tecnológicos e competição com outros materiais (European..., 2010).

A produção de cobre primário vem da extração a partir de minérios ricos em cobre principalmente da calcopirita. O cobre é associado, naturalmente, a muitos outros minérios, e consideráveis quantidades de cobre podem ser encontradas nos resíduos de operações metalúrgicas de outros metais como o níquel e o cobalto. Considerando o preço do cobre no mercado e as previsões de incremento na demanda, os rejeitos minerais representam uma importante fonte de material secundário para a produção de cobre (ANTONIJEVIC; BOYRAZLI; TUMEN., 2008).



Figura 3. Variação do preço do cobre no mercado durante os últimos 5 anos.

1.2 Mecanismos de biolixiviação

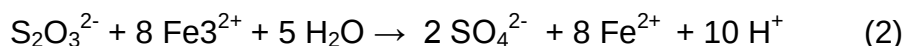
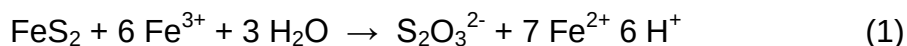
Na biohidrometalurgia já tem sido confirmado que a velocidade de oxidação dos sulfetos minerais é, marcadamente, acelerada na presença de micro-organismos quimiolitotróficos, acidófilos e oxidantes de ferro e/ou enxofre como os do gênero *Acidithiobacillus*. Além da possível lixiviação bacteriana direta, pelo ataque das células ao sulfeto mineral (processo ainda controvertido) a lixiviação química de sulfetos é bem conhecida e o íon férrico e prótons são dois agentes importantes nesse processo químico de lixiviação. Nesse processo, o papel dos micro-organismos é regenerar os reagentes químicos lixiviantes (RAWLINGS, 2005).

Em um sistema bacteriano de lixiviação aproximadamente 80% das células microbianas buscarão se aderir à superfície do mineral, enquanto que o restante permanecerá na solução como células planctônicas. Esta adesão é,

predominantemente, mediada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ao redor da célula (composto de açúcares, ácidos graxos, ácido glucurônico e íons férricos) (GEHRKE et al., 1998). Vários estudos têm evidenciado que o processo de adesão celular ocorre, preferencialmente, em locais com visíveis imperfeições na superfície do mineral tais como sítios corroídos ou de baixa cristalização. Diversos estudos afirmam que dentro do EPS é o lugar onde as reações de biooxidação ocorrem servindo, então, como espaço de reação (ROHWERDER et al., 2003; SAND; GEHRKE, 2006).

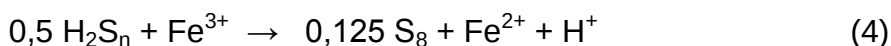
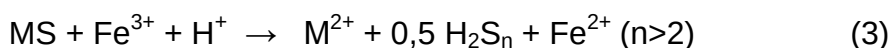
Nos primeiros estudos dos mecanismos de ação das bactérias na oxidação de minerais referia-se a um mecanismo direto (enzimático) da célula sobre a superfície do mineral. Muitos estudos têm rejeitado tal hipótese afirmando que a biolixiviação ocorre por mecanismos indiretos. Por enquanto permanecem algumas dúvidas e ambos os mecanismos têm sido aceitos (BOON, 2001).

Um conceito bem estabelecido é que as reações de dissolução dos minerais não são iguais para todos os sulfetos minerais e ocorrem via intermediários diferentes: o mecanismo via tiosulfato quando a célula é aderida a um mineral ácido-insolúvel como pirita (FeS_2), e o mecanismo via polisulfetos para minerais solúveis em ácido como a calcopirita (CuFeS_2). No primeiro caso a solubilização ocorre por meio do ataque do íon férrico, com o tiosulfato como intermediário principal, e sulfato como produto final:

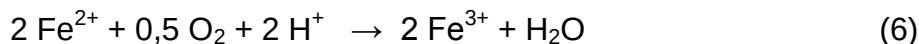


O tiosulfato pode ser atacado pelo ferro e produzir mais intermediários como tetrationato, tritionato entre outros (RODRIGUEZ et al., 2003).

No mecanismo dos polisulfetos a solubilização do mineral solúvel em ácido ocorre através do ataque combinado dos íons férricos e prótons, com enxofre elementar como principal intermediário que, por sua vez, pode ser oxidado por micro-organismos para produzir sulfato:



O íon ferroso gerado nas equações (1) ou (3) em presença de bactérias oxidantes de ferro será oxidado a íon férrico (RAWLINGS, 2005):



1.3 Processos biotecnológicos para a lixiviação de metais

A escolha da rota tecnológica e do produto final a ser produzido por uma unidade industrial de níquel depende, diretamente, das características do minério a ser alimentado na planta. Os métodos para processar minérios lateríticos incluem lixiviação ácida sob pressão ambiente, lixiviação ácida sob pressão a alta temperatura, pirometalurgia, aquecimento com micro-ondas e lixiviação biológica. O níquel contido em matrizes de sulfetos é concentrado várias vezes por diferentes técnicas relativamente econômicas antes de ser fundido e refinado em seus produtos (RIEKKOLA-VANHANEM, 2006; YANTING et al., 2005; YANBIN et al., 2005).

A pirometalurgia é o processo mais escolhido para pré-tratar o concentrado de sulfetos ou lateritas com alto conteúdo de níquel, no qual os metais são separados da escória para serem refinados posteriormente. Nos processos hidrometalúrgicos, incluindo a biohidrometalurgia, os metais de interesse são lixiviados a partir dos concentrados minerais. Este processo de pré-tratamento é usualmente empregado para concentrados de sulfetos ou lateríticos com baixo teor de níquel (YANNOPOULOS, 1990).

O uso de micro-organismos em hidrometalurgia para a solubilização de metais como cobre, urânio e níquel a partir de minérios de baixos teores (biolixiviação) ou como pré-tratamento de sulfetos na extração de ouro e prata (biooxidação) é bem conhecido há muito tempo e já vem sendo aplicado em escala piloto e comercial em todo o mundo. Esta aplicação comercial é usada em três diferentes desenhos ou sistemas: biolixiviação em montes para rejeitos minerais (conhecido como “dump leaching”), biolixiviação/biooxidação em pilhas (“heap leaching”) e em tanques agitados para concentrados.

1.3.1 Biolixiviação em montes

A biolixiviação em montes (contendo milhões de toneladas de rejeitos minerais) foi aplicada, pela primeira vez, para rejeitos do processo de extração de

cobre, nos quais o teor do metal era baixo demais para o custo de sua recuperação ser sustentado por tecnologias convencionais como flotação e fundição. Neste sistema, água ácida é aplicada no topo do monte e à medida que a solução percola através do monte gera condições favoráveis para o crescimento de micro-organismos nativos que catalisam as reações de oxidação dos sulfetos minerais. O metal é dissolvido na lixívia e percola até o final do monte onde será recuperado (BRIERLEY, 2008a; PRADHAN et al., 2008).

A biolixiviação em montes continua sendo um método altamente econômico para recuperar cobre de rejeitos com baixos teores. A companhia internacional BHP Biliton iniciou em 2006 uma operação de biolixiviação em montes na mina Escondida no Chile incluindo melhorias técnicas, esperando produzir até 200.000 t/a de cobre nos 40 anos seguintes. A adoção de técnicas que estão sendo aplicadas na prática de biolixiviação em montes, como aeração ou diminuição de tamanho de partícula, está reduzindo a diferença entre biolixiviação em montes e pilhas (BRIERLEY, 2008a).

1.3.2 Biolixiviação/Bioxidação em pilhas

Em um sistema de pilhas o minério (de baixo teor) é aglomerado e disposto em uma pilha sobre uma superfície sintética e provida de um sistema eficiente de distribuição da solução lixiviante e de coleta da lixívia. Uma solução ácida é percolada através da pilha e os micro-organismos nativos produzem íons férricos e acidez necessários para a dissolução do mineral e a solubilização dos metais. A principal diferença com a biolixiviação em montes está na aplicação de um sistema de aeração que pode ser passiva com o ar descendo junto com o fluxo de líquido ou ativa com o ar sendo injetado no interior da pilha por meio de canais instalados no fundo da pilha (RAWLINGS; DEW; PLESSIS, 2003). As pilhas são reatores mais econômicos de construir e de operar que os tanques agitados e são adequados para a biolixiviação de sulfetos primários de cobre como a calcopirita (BRIERLEY, 2008a-b; PRADHAN et al., 2008).

A biolixiviação em pilhas para a recuperação de cobre é uma tecnologia exitosamente aplicada no Chile com mais de 85.000 t de mineral processado por dia. Vinte e três pilhas de biolixiviação de cobre no mundo, e sua produção anual, são listadas por BRIERLEY (2008a-b). O processo BioNIC[®] foi introduzido para a extração de níquel a partir de minério de baixo teor em pilhas e é utilizado por várias

companhias como Pacific Ore Technologies, a GENCOR, a Mintek Corporate e Billiton (GROENEVEL, 2010; BRIERLEY; BRIERLEY, 2001). Talvivaara Mining Company tem agora a maior pilha de biolixiviação de níquel e cobalto no mundo.

A companhia Newmont Mining Corporation começou em 1999 a aplicar a tecnologia da pilha com o processo BIOPRO™ para pré-tratar minerais refratários contendo ouro. Nestes minerais partículas microscópicas de ouro encontram-se aprisionadas ou ocluídas dentro do sulfeto mineral, usualmente pirita ou arsenopirita ou ambas. Para a recuperação do ouro os sulfetos devem ser oxidados antes de ser tratados com cianeto. Este pré-tratamento em pilhas difere da biolixiviação de metais por ser inoculada com diferentes populações microbianas crescidas, *a priori*, em um tanque externo, e, em seguida, a completa oxidação do mineral, a pilha é removida e tratada com cal antes da adição de cianeto. O processo GEOCOAT™, desenvolvido pela Geobiotics, LLC, é outra tecnologia inovadora para biooxidar, em pilhas, sulfetos refratários contendo ouro (BRIERLEY, 2008b).

Por outro lado, a companhia finlandesa Talvivaara Mining desde 2005 começou a aplicação de biotecnologia para a extração de níquel e outros metais a partir de uma grande região de minérios de baixos teores e quatro anos depois já obteve a primeira produção de metais mediante o sistema de pilhas de minério irrigadas com solução sulfúrica, sistema este conhecido como *Bioheap leaching*. Com este processo a empresa finlandesa posicionou-se como a produtora número um na extração biotecnológica de níquel com 33.000 t/a. Também prevê uma produção anual aproximada de 50.000 t de níquel, o que representa, potencialmente, 2,3% da produção anual mundial de níquel primário para o ano 2012, além de uma previsão de exploração de mais 60 anos (RIEKKOLA-VANHANEN, 2007; WATLING, 2008).

1.3.3 Biolixiviação/Bioxidação em tanques agitados

Os tanques agitados aerados para biolixiviação/bioxidação é uma técnica usualmente aplicada a concentrados de minerais devido ao seu custo de capital e de operação. Esta tecnologia é realizada em grandes tanques de aço inoxidável equipados com agitadores que mantêm a polpa em suspensão e garantem a transferência de oxigênio para os micro-organismos. Os tanques agitados permitem um melhor controle dos parâmetros chaves para a dissolução do mineral como

temperatura e concentração de oxigênio, e em comparação com a operação das pilhas, o tempo de operação é de dias e não de meses ou anos (BRIERLEY, 2008b).

A limitação deste sistema está na concentração de sólidos que podem ser tratados nos tanques, pois só até 20% de polpa pode ser mantida em suspensão. Esta limitação, junto com os altos custos de construção e operação faz com que o sistema de tanques agitados seja aplicado somente para minérios de alto teor ou concentrados (RAWLINGS; DEW; PLESSIS, 2003).

Catorze plantas de bioxidação em tanques agitados para o pre-tratamento de mineral refratário contendo ouro, tem sido construídas, em todo o mundo, a partir de dos anos 80 até agora e inclusive uma no Brasil, a mina São Bento, pertencente a Eldorado Gold Corporation. A única planta comercial para biolixiviação de metais base (cobalto) está localizada em Uganda (BRIERLEY; BRIERLEY, 2001; BRIERLEY, 2008b). Outros projetos para aplicar biolixiviação de metais como cobre, níquel e zinco, em tanques agitados estão sendo testados em escala piloto (MORIN et al., 2008).

1.4 Solubilização de metais a partir de rejeitos minerais

Milhares de toneladas de rejeitos são geradas a cada ano no mundo todo, provenientes de operações metalúrgicas contendo grandes quantidades de metais como cobre, níquel e cobalto, presentes em baixos teores. Estima-se que para cada tonelada de cobre produzida, 400 toneladas de resíduos são geradas na mineração e metalurgia, sendo estas acumuladas/abandonadas durante anos por cada empresa de extração de metais (ZHAN; WU; WANG., 2008).

Os rejeitos são gerados em dois pontos importantes do processo de extração de metais durante os métodos de concentração. Primeiramente, o minério deve ser moído e britado até um tamanho de partícula adequado para ser processado por métodos de concentração como flotação por exemplo. Com este método de concentração, os sulfetos contendo os metais de interesse são separados de outros minerais como carbonatos e silicatos (denominados de forma geral como ganga). Mas uma pequena porção de sulfetos fica junto com a ganga e por isso baixas porcentagens de metais são encontradas nos rejeitos.

O produto concentrado no processo de flotação é, então, submetido a um tratamento térmico em fornos de altas temperaturas (~1300°C) que será convertido em metal impuro. Os sulfetos minerais que são oxidados neste processo formam

óxidos, que combinados com sílica produzem uma escória caracterizada por cristais de faialita (Fe_2SiO_4) (LI; PAPANGELAKIS; PEREDERIY, 2009). Este tipo de rejeito é denominado “escória”. Nestes processos de concentração, entre 3-8% dos metais são perdidos nos rejeitos em cada etapa de concentração (LI; PEREDERIY; PAPANGELAKIS, 2008).

Embora este rejeito pareça um material inócuo por ser um sólido duro, pode representar um problema ambiental por não suportar o crescimento de plantas para reflorestamento e pode sofrer lixiviação lenta causada por micro-organismos ou chuvas ácidas levando a um potencial risco de contaminação ambiental por metais pesados (BAGHALHA; PAPANGELAKIS; CURLOOK, 2007).

A figura 4 esquematiza, de maneira resumida, o processo de extração de metais a partir de um minério contendo metais de interesse.

Os requisitos econômicos e ambientais impõem o desenvolvimento de métodos efetivos e não custosos para a recuperação de metais de interesse a partir de fontes secundárias como os rejeitos. Assim, vários métodos têm sido aplicados para tratar as escórias e recuperar os metais contidos nelas. Esses métodos incluem lixiviação direta com ácido sulfúrico ou cloreto férrico a pressão atmosférica, lixiviação oxidativa ácida a alta pressão com ácido sulfúrico, ou sulfato de amônio, ou sulfato férrico, ou cianeto, ou nitrato, ou clorato ou perclorato, ou re-enviar a escória para um forno para concentrar de novo. Mas todos esses procedimentos com altas temperaturas ($>90^\circ\text{C}$) aumentam os custos de operação (ARSLAN; ARSLAN, 2002; LI; PEREDERIY; PAPANGELAKIS, 2008; 2009; RUDNIK; BURZYNSKA; GUMOWSKA, 2009).

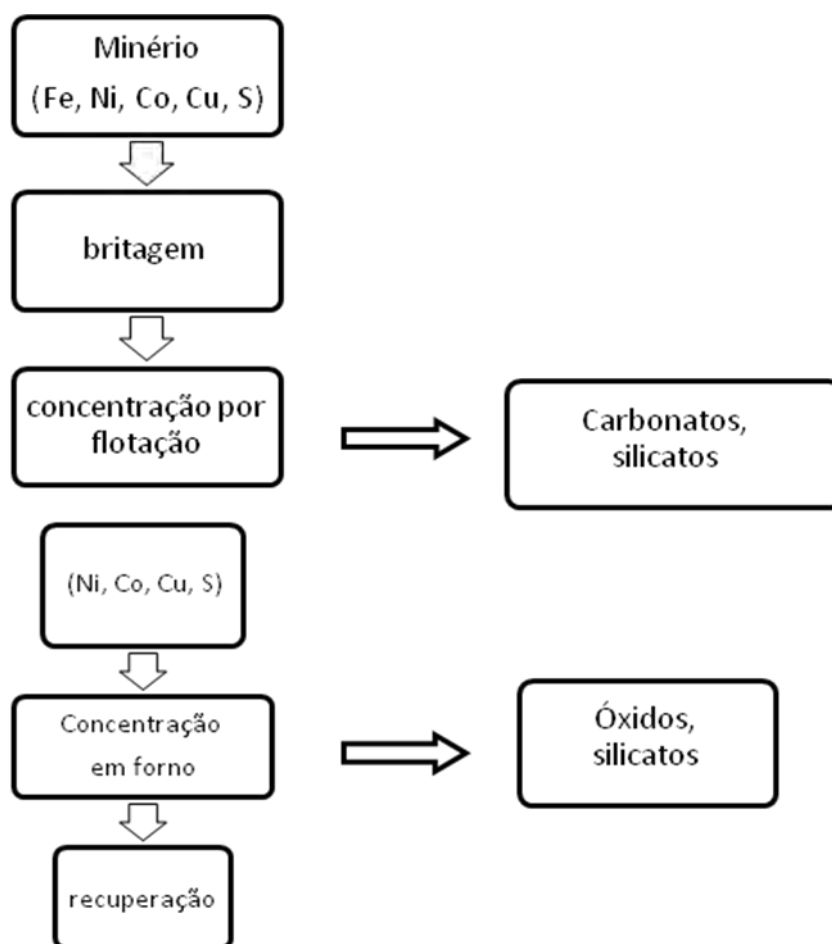


Figura 4. Esquema resumido do processo de recuperação de metais

Já para os rejeitos gerados após flotação têm sido testados e aplicados diferentes métodos de tratamento como lixiviação com ácido sulfúrico ou clorídrico, sulfato férrico, sulfato de amônio, cloreto férrico e lixiviação bacteriana (GBOR; AHMED; JIA, 2000; YANTIN et al., 2005). A lixiviação de metais a partir de rejeitos é medida em termos de décadas porque apresenta ineficiências consideráveis, comparando com a lixiviação de concentrados de alto teor de metais ou com a realizada em reatores ou pilhas de alta tecnologia.

Neste trabalho os dois tipos de rejeitos, provenientes dos processos de concentração (flotação e forno “flash”) da planta de extração de níquel da companhia Votorantim Metais, em Serra de Fortaleza-MG, foram estudados em testes de lixiviação ácida e bacteriana para determinar a viabilidade de processar estes rejeitos com aplicação biotecnológica.

1.5 Solubilização de níquel e cobre a partir de minério natural

A bem sucedida lixiviação em pilhas e posterior biolixiviação em escala comercial junto com os altos preços de níquel tem estimulado a aplicação desta tecnologia para o tratamento de sulfetos de níquel de baixos teores ou de difícil processamento. Em diferentes países está sendo extraído níquel mediante os sistemas de lixiviação em pilhas e tanques agitados. Watling (2008) faz um resumo dos projetos e biotecnologias aplicadas na extração de níquel como, por exemplo, as pilhas de Radio Hill e Sherlock Bay em Austrália; Talvivaara em Finlândia; Jinchuan em China e os tanques dos processos BioNIC® e BacTech/Mintek.

Todos os trabalhos publicados para a solubilização de níquel a partir de concentrados de pentlandita, contendo pirrotita e calcopirita, utilizando bactérias quimiolitotróficas como *A. ferrooxidans* (adaptadas ou não), têm reportado porcentagens de extração superiores a 20%, inclusive até 100% de níquel em diferentes sistemas de reatores e durante diferentes tempos de residência (LI; KE, 2001a,b; MASON; RICE, 2002; KE; LI, 2006; SANTOS et al., 2006; WATLING, 2008).

Com relação a minérios naturais de sulfetos de níquel, Garcia et al. (1997) reportaram 40% de recuperação de níquel com *A. ferrooxidans*, 30% com *A. thiooxidans* e 20% com o controle abiótico após 4 semanas de biolixiviação de um espécime mineral de pentlandita contendo pirrotita, calcopirita e cubanita. A revisão de Watling (2008) apresenta alguns trabalhos de biolixiviação de pentlanditas com melhores resultados de recuperação de níquel do que os obtidos por Garcia et al., (1997). Mas um resultado semelhante em todos os testes são os produtos de oxidação após a lixiviação bacteriana. Nesses trabalhos foi observado que a pentlandita foi oxidada em menor grau que a pirita e a pirrotita, acompanhada de acúmulo de precipitados de ferro como jarositas e enxofre.

1.6 Micro-organismos relevantes na extração de metais

Os micro-organismos mais importantes relacionados com a oxidação de minerais são aqueles que têm a habilidade para produzir íon férrico (Fe^{3+}) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), ambos necessários para as reações de oxidação. Devido ao limitado tipo de substratos disponíveis nos ambientes de minas a diversidade microbiana não é

tão grande como em outros ambientes. Contudo, agora é conhecido um grande número de espécies microbianas relevantes aos processos de solubilização de metais (BAKER; BANFIELD, 2003). Esses micro-organismos, bactérias e archeas, principalmente, são extremadamente acidófilos (pH ótimo de crescimento menor de 3); quimiolitotróficos pois são capazes de oxidar compostos de enxofre inorgânico e/ou íons ferrosos (Fe^{2+}); crescem autotroficamente fixando CO_2 da atmosfera, utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons e toleram uma ampla faixa de concentrações de diferentes metais (RAWLINGS, 2001). Eles também têm sido classificados segundo sua temperatura ótima de crescimento: mesófilos (entre 25-40°C), termófilos moderados (entre 40 e 65°) e termófilos extremos (>65°C).

O papel de bactérias oxidantes de ferro e/ou enxofre na dissolução de sulfetos minerais está muito bem documentado na área da Biohidrometalurgia e denominado como “bio-lixiviação” quando se trata da solubilização de metais de interesse a partir de um sulfeto mineral insolúvel e “bio-oxidação” quando se aplica a minerais contendo ouro para facilitar sua extração. Os minerais sulfetados diferem em sua susceptibilidade em serem oxidados e é assim que alguns sulfetos de ferro (como a pirita [Fe_2S_3]) são oxidados pelo íon férrico. Com esses minerais os micro-organismos oxidantes de ferro como *Acidithiobacillus* (A.) *ferrooxidans*, *Leptospirillum* sp, *Acidimicrobium* (Am.) *ferrooxidans* e *Sulfolobus metallicus* tem uma função importante na dissolução desses minerais.

O estudo da variabilidade genotípica e fisiológica natural de novos isolados de *A. ferrooxidans* é de grande importância para encontrar cepas mais eficientes para solubilizar metais ou para resistir às condições mais extremas (como maior acidez ou concentração de metais); para discernir as rotas de evolução da espécie, entender os mecanismos de ação sobre os minerais ou outros substratos e para seu monitoramento em processos biohidrometalúrgicos ou naturais.

Neste trabalho está descrita a metodologia aplicada no isolamento de cepas bacterianas nativas acidófilas e mesófilas do gênero *Acidithiobacillus* a partir de amostras de rejeitos provenientes da planta de beneficiamento de níquel da Empresa Votorantim S.A.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de rejeitos minerais

- **Caracterização química dos rejeitos**

Neste estudo foram utilizados dois tipos de rejeitos, um proveniente do processo pirometalúrgico com forno “flash”, denominado “escória”, e outro proveniente dos resíduos do processo de concentração por flotação chamado de “lama”. Esses rejeitos foram utilizados para os testes de biolixiviação e foram determinados os teores dos elementos níquel, cobalto, cobre e sílica. A caracterização química foi realizada após dois tipos de aberturas: uma abertura parcial feita com água régia (porção solúvel do metal) e uma abertura total feita com ácido fluorídrico e aquecimento em forno de micro-ondas (porção total do metal).

As amostras antes e após serem submetidas à lixiviação foram analisadas a fim de determinar a composição mineralógica das suas fases principais mediante a técnica de difração de raios X.

- **Medidas de pH e potencial redox**

O pH e o potencial de oxido-redução nas amostras coletadas foram medidos utilizando um eletrodo de vidro e um eletrodo de Pt (contra um eletrodo de referência $\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$) respectivamente.

- **Espectrometria de Absorção Atômica**

As concentrações dos elementos de interesse foram determinadas mediante a técnica de Absorção Atômica realizadas com um espectrômetro de chama com fonte de linhas (LSFAAS), AAnalyst 100 (Perkin Elmer®)

- **Difração de Raios X (DRX)**

Para as análises com a técnica de DRX todas as amostras foram moídas até uma granulometria $>50 \mu\text{m}$ e dispostas em porta amostras de teflon ou vidro. Foi utilizado o difratômetro D5000 – Siemens (do Laboratório de Físico Química) com as condições de rotina: tempo de contagem 2s, passo 0,05, ângulo de varredura de 10 a 70° (2θ).

- **Testes de consumo de ácido pelas amostras**

As lixiviações ácidas com a escória e com a lama foram realizadas em dois valores de pH: 1,0 e 0,5. Os testes de consumo de ácido foram realizados em frascos de 250 mL contendo 20 g do rejeito em 80 mL de água. Os frascos foram agitados em placa com agitador magnético durante 48 horas. Durante este período o pH foi medido e mantido nas condições descritas pela adição de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹.

- **Linhagem bacteriana**

Foi utilizada a linhagem *Acidithiobacillus ferrooxidans*-LR, isolada de lixívia ácida de minério de urânio proveniente de Lagoa Real-BA (GARCIA, 1991). Todos os cultivos bacterianos utilizados como inóculo para o processo de lixiviação foram obtidos após o crescimento em meio específico T&K (TUOVINEM; KELLY, 1973). A Tabela 1 descreve a composição do meio de cultivo T&K.

Tabela 1. Meios líquidos utilizados no enriquecimento de micro-organismos acidófilos oxidantes de ferro e/ou enxofre.

Composto	Meio T&K pH 1,8 (g/L)	Meio 9K-S° pH 2,8 (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	3,00
KCl	-	0,10
K ₂ HPO ₄	0,50	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50	0,50
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	0,014
FeSO ₄ .7H ₂ O	33,3	----
S°	----	10

- **Testes de oxidação de substratos (respirometria)**

Para uma investigação preliminar da oxidação dos rejeitos por *A. ferrooxidans* foram realizados ensaios de respirometria celular. A técnica de respirometria celular indica, rapidamente, a capacidade, ou não, da bactéria em oxidar substratos mediante a determinação do consumo de oxigênio. Os ensaios respirométricos foram realizados em aparelho de Warburg com uma suspensão celular de *A. ferrooxidans*- LR desacoplando-a do crescimento, ou seja, limitando a fixação de CO₂ para não permitir o processo de divisão celular.

A suspensão celular foi crescida em meio T&K, centrifugada para obtenção de um pellet e lavada três vezes com água ácida (pH 1,8). Previamente à utilização das células no experimento, a proteína total foi quantificada como indicativo da biomassa celular pelo método de Hartree (HARTREE, 1972).

Os frascos de reação continham, além da suspensão celular do *A. ferrooxidans*-LR (300 µg de proteína total), 100 mg dos rejeitos e 2,5 mL de tampão glicina (pH 2,2). Frascos sem a presença de células foram utilizados como controles abióticos. Os ensaios foram conduzidos a 30°C, sendo realizados em duplicata.

- **Biolixiviação em frascos**

Os ensaios de biolixiviação de rejeitos foram realizados em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio T&K (com ou sem adição do íon Fe²⁺ como fonte energética), 5% (p/v) de rejeito (escória ou lama) e 5% (v/v) de inóculo bacteriano. Todos os frascos foram incubados a 30°C e agitados a 150 rpm, durante 14 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata. As condições dos ensaios estão apresentadas na Tabela 2. Os ensaios de lixiviação bacteriana da lama foram repetidos, posteriormente, com um tempo de 50 dias.

Periodicamente, foram retiradas amostras dos frascos para as medidas do pH e potencial redox (Eh) do sistema e determinações de níquel e cobre na lixívia. O resíduo sólido final de cada frasco foi, também, tratado para análise das alterações da fase sólida por difração de raios X (DRX).

- **Lixiviação estática (escória)**

Os ensaios de lixiviação da escória em pilhas foram realizados em bandejas de vidro contendo 1 kg da escória e 200 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em diferentes concentrações (mol L^{-1}): 2,5 – 5 - 10 e 18.

As pilhas foram secas em temperatura ambiente durante 8 dias antes da primeira lavagem. Posteriormente, cada pilha foi lavada com 350 mL de água não acidificada 4 vezes, chamando de licor rico ao primeiro volume da lixívia e água de lavagem 1, 2 e 3 para as seguintes lixívias, nas quais foram medidos o pH, o potencial redox (Eh) e o volume recuperado. Esta metodologia de secagem e lavagem foi realizada por 4 vezes para a pilha acidificada com H_2SO_4 18 mol L^{-1} e 5 vezes para as outras pilhas. Em alguns casos, quando o pH da solução aumentou, as lavagens foram realizadas com água acida pH 1,0.

Simultaneamente, uma pilha foi montada em béquer com H_2SO_4 2,5 mol L^{-1} . Neste caso, o rejeito (1 kg) foi encharcado com 500 mL de ácido.

Tabela 2. Descrição dos diferentes tratamentos da biolixiviação de escória ou lama.

	Frasco A	Frasco B	Frasco C	Frasco D
Frascos inoculados com <i>A. f</i> – LR	Meio de cultura T&K sem ferro	Meio T&K com adição de 120 mmol L^{-1} de Fe^{2+}	Cultivo bacteriano crescido e contendo ~120 mmol L^{-1} Fe^{3+}	Cultivo bacteriano crescido e contendo ~120 mmol L^{-1} Fe^{3+} + H_2SO_4 1,25 mol L^{-1}
Frascos controles sem <i>A. f</i> -LR	Meio de cultura T&K sem ferro	Meio T&K com adição de 120 mmol L^{-1} de Fe^{2+}	Cultivo com ~ 120 mmol L^{-1} Fe^{3+} (estéril)	H_2SO_4 1,25 mol L^{-1} (estéril)

- **Lixiviação estática (lama)**

A lixiviação estática da lama foi realizada em béquer de 2 L com 1 kg de rejeito encharcado com 500 mL de solução como descrito na Tabela 3. Todas as condições

foram corrigidas para pH 1,0 inicial. Correções posteriores foram realizadas com adição de ácido sulfúrico concentrado até pH 1,5.

Considerando o constante aumento de pH nesses sistemas, outro sistema com lama foi realizado levando-se em conta a relação ácido-minério avaliado na primeira etapa nos testes de consumo de ácido. Deste modo, foram preparados dois reatores, um com 1 kg da lama e 500 mL de um cultivo crescido de *A. ferrooxidans*-LR. A quantidade de ácido consumida nos testes iniciais foi considerada para a preparação de outra condição com uma solução de $1,25 \text{ mol L}^{-1}$. O outro reator foi o controle abiótico também na mesma concentração.

Tabela 3. Descrição dos diferentes tratamentos da biolixiviação da lama.

	Frasco A	Frasco B	Frasco C	Frasco D
Reatores	Meio T&K sem ferro inoculado com <i>A.ferrooxidans</i> -LR	Meio T&K com adição de 120 mmol L^{-1} de Fe^{2+} sem bactérias	Cultivo bacteriano crescido e contendo $\sim 120 \text{ mmol L}^{-1}$ de Fe^{3+}	Cultivo bacteriano crescido e filtrado (com membrana $0,45 \mu\text{m}$) contendo $\sim 120 \text{ mmol L}^{-1} \text{Fe}^3$

2.2 Solubilização de níquel e cobre a partir de minério natural

- Minério de Pentlandita ($(\text{Ni},\text{Fe})_8\text{S}_9$)**

O sulfeto de níquel utilizado nos experimentos foi uma amostra mineral de pentlandita “grau minério” fornecido por KRANTZ (Dr. F. Krantz Rheinisches Mineralien-Kontor) na cidade de Bonn, Alemanha. O sulfeto se apresentou em forma de rochas naturais de aproximadamente 3 kg em total. Para todos os experimentos e análises o sulfeto foi moído manualmente e peneirado até obter-se uma granulometria $>200 \mu\text{m}$.

- Minério de Pirrotita (Fe_{1-x}S ; $x = 0 - 0.17$)**

Uma amostra de pirrotita “grau minério” foi utilizada nos experimentos de perda de níquel. Esta amostra foi fornecida pela Ward’s Study Pack. O sulfeto se apresentou em forma de rochas naturais de aproximadamente 1 kg em total. Para

todos os experimentos e análises o sulfeto foi moído manualmente e peneirado até obter-se uma granulometria $>200\ \mu\text{m}$.

- **Caracterização da pentlandita e pirrotita**

Para a caracterização química dos minérios utilizados nos testes, 1 g do sulfeto foi aberto com água régia (DIXON; GARDNER; HUDSON, 1997) e posteriormente o teor dos elementos foi determinado por espectroscopia de absorção atômica. As análises das fases mineralógicas predominantes foram feitas mediante a técnica de Difração de Raios X (Figura 23).

- **Técnicas analíticas**

As análises para determinação de metais em solução foram feitas por Espectrometria de Absorção Atômica. As fases mineralógicas foram identificadas por Difração de raios X. Ambas as técnicas foram descritas na metodologia da seção correspondente à biolixiviação de rejeitos minerais.

As determinações de sulfato em solução foram realizadas por Cromatografia. Para este propósito foi utilizado um equipamento Dionex DX500 em combinação com um software Chromeleon Version 6.7 do laboratório de Biotecnologia Aquática da Universidade Duisburg-Essen, Duisburg – Alemanha. As amostras foram inicialmente centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos para eliminar células e partículas. O sobrenadante foi usado para as medições. As amostras foram diluídas 1:100 com água bidestilada e novamente diluídas 1:10 com tampão fosfato ($2,5\ \text{mmol L}^{-1}$, pH 7,0) (NOEL, 2008).

- **Biolixiviação de pentlandita (1ª série)**

Duas séries de experimentos foram realizadas para estudar o processo de biolixiviação de pentlandita. A primeira delas foi conduzida no laboratório de Biotecnologia Aquática do Centro de Biofilmes na Universidade de Duisburg-Essen, na Alemanha.

- **Preparo dos inóculos**

As linhagens utilizadas nos ensaios de biolixiviação de pentlandita foram *A. ferrooxidans*-LR (descrita anteriormente) e uma linhagem de *L. ferrooxidans* (cepa

tipo) da coleção de micro-organismos do laboratório de Biotecnologia Aquática, do Centro de Biofilmes da Universidade de Duisburg-Essen, Alemanha

Para obter a concentração celular desejada para os experimentos de biolixiviação de pentlandita (10^8 células/mL), as linhagens de *A. ferrooxidans*-LR e *L. ferrooxidans* foram crescidas em frascos de 5 L contendo o meio de cultivo Mackintosh como descrito a seguir: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; KH_2PO_4 , $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$; MgCl_2 , $125 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; CaCl_2 , $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; MnCl_2 , $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; ZnCl_2 , $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; CoCl_2 , $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; H_3BO_3 , $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; Na_2MoO_4 , $0,05 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; CuCl_2 , $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; H_2SO_4 , $9,6 \text{ mmol L}^{-1}$, FeSO_4 , 180 mmol L^{-1} ; pH 1,8 (MACKINTOSH, 1978).

Após o crescimento celular os cultivos foram centrifugados (8000 rpm x 10 minutos a 10°C) e o pellet resultante foi lavado várias vezes com uma solução de sais do meio Mackintosh (sem íons ferrosos) em pH 1,8. A partir dessa biomassa recuperada, foi realizada a contagem celular em câmara de Thoma.

• Ensaios de biolixiviação

Antes de ser realizado um dos testes de biolixiviação, a pentlandita foi lavada com uma solução de EDTA- NaOH para eliminar os óxidos contidos no sulfeto durante 10 minutos em agitação, lavada com água destilada várias vezes até o pH estabilizar em 7 e, posteriormente, foi lavada com acetona para remover os íons férricos e compostos de enxofre (GEHRKE et al., 1999; NOEL, 2008). O protocolo anterior é para garantir que os metais solubilizados provêm especificamente do minério e não de impurezas solúveis associadas. A pentlandita foi esterilizada em frascos tampados com atmosfera de nitrogênio em estufa a 120°C durante 4 horas.

A seguir, foram realizados os ensaios de biolixiviação em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio Mackintosh (sem adição do íon Fe^{2+} como fonte energética), 10% (p/v) de pentlandita. Os frascos foram inoculados com uma concentração de células de *A. ferrooxidans*-LR de 10^8 células/mL. Outra série de frascos foi inoculada após 48 horas de acidificação com ácido sulfúrico. Este procedimento teve como objetivo diminuir o consumo de ácido pela ganga durante a lixiviação bacteriana. Alguns destes frascos foram inoculados com *A. ferrooxidans*-LR e outros com a linhagem de *L. ferrooxidans* (linhagem tipo). Após 5 dias, esses frascos foram re-inoculados com as mesmas cepas.

Todos os frascos foram incubados a 30°C e agitados a 150 rpm, durante 28 dias. Os ensaios foram feitos em duplicata e frascos abióticos foram utilizados simultaneamente. Periodicamente, foram retiradas amostras dos frascos para as medidas de pH, determinações de níquel, magnésio e cobre em solução por absorção atômica e concentração de sulfato por cromatografia em fase líquida. O resíduo sólido final de cada frasco foi também recuperado para análise das alterações da fase sólida por difração de raios X (DRX).

- **Biolixiviação de pentlandita (2ª série)**

A segunda série foi realizada no laboratório de Biohidrometalurgia do Instituto de Química-UNESP.

- **Preparo dos inóculos**

Na segunda série de ensaios de biolixiviação de pentlandita foram utilizadas linhagens da coleção do laboratório, *A. ferrooxidans*-LR e *A. thiooxidans*-FG01.

A linhagem da coleção do laboratório, *A. thiooxidans*-FG01, foi isolada de drenagem ácida de uma mina de urânio, em Figueira-PR. O meio de cultivo 9k para o crescimento e manutenção desta espécie bacteriana está descrito na Tabela 1.

Cultivos bacterianos de 100 mL para o crescimento e manutenção destas linhagens foram realizados com os meios T&K (pH1,8) e 9K (pH2,8) respectivamente. Alíquotas desses cultivos foram tomadas para inocular os frascos dos ensaios de biolixiviação (5% v/v).

- **Ensaio de biolixiviação**

Algumas modificações em relação ao ensaio anterior foram feitas. Os testes foram realizados com cultivos puros e mistos de *A. ferrooxidans*-LR e *A. thiooxidans*-FG01. Para os cultivos com a linhagem oxidante de ferro o meio utilizado foi o T&K (pH 1,8) e para o cultivo puro da linhagem oxidante de enxofre foi o meio 9K (pH 2,8) já descritos anteriormente. Em ambos os casos não foi adicionada a fonte de energia (íons ferrosos e enxofre, respectivamente). A porcentagem de sólidos utilizada neste ensaio foi de 5% (p/v). Todas as outras condições foram as mesmas do ensaio descrito anteriormente.

- **Determinação do ferro total em solução**

Alíquotas do sobrenadante dos ensaios de biolixiviação da segunda série foram tomadas para a determinação da concentração de ferro total em solução. As análises foram feitas mediante a técnica de Karamanev (KARAMANEV, NIKOLOV, MAMATARKOVA, 2002), utilizando um espectrofotômetro 600S (FEMTO).

- **Testes de perda de níquel e cobre da solução**

Ensaio de perda de metais foram realizados em frascos erlenmeyers contendo 2,5% (p/v) de mineral (pentlandita ou pirrotita), 150 mL de meio T&K (pH 1,8) e cobre ou níquel em uma concentração de 1 g L^{-1} e inoculados com *A. ferrooxidans*-LR (5% v/v). Todos os frascos foram incubados a 30°C e agitados a 150 rpm, durante 30 dias. Os ensaios foram feitos em duplicata. As concentrações de níquel e cobre em solução foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica.

2.3 Isolamento de micro-organismos a partir de rejeitos minerais

- **Isolamento de micro-organismos**

As amostras para o isolamento de micro-organismos foram a “escória” e a “lama” utilizadas nos testes de biolixiviação. Adicionalmente, outros tipos de rejeitos foram fornecidos pela empresa Votorantim Metais. Esses rejeitos são gerados a partir do processo de flotação da mesma forma que a lama, e foram diferenciados por um processo de separação magnética. Após esta separação, a parte contendo ferro denominou-se “rejeito magnético” e a outra “não magnético”. O conjunto de ambos denominou-se “rejeito total”. Os rejeitos “total” e “não magnético” pelotizados foram tomados como amostras para o isolamento de micro-organismos oxidante de ferro e enxofre.

A seguir estão descritos os meios utilizados nos procedimentos de enriquecimento e purificação que foram selecionados para o isolamento e cultivo de bactérias mesófilas acidófilas oxidantes do ferro e/ou enxofre.

- **Meios líquidos para o enriquecimento celular**

Na Tabela 1 está indicada a composição dos meios líquidos utilizados nos cultivos de enriquecimento que favorecem o desenvolvimento de bactérias oxidantes do ferro (meio T&K) e do enxofre (meio 9K-S°). A preparação deles realizou-se

segundo a técnica descrita por Tuovinen e Kelly (1973). No caso particular do meio denominado 9K-S° substituiu-se a fonte de energia (o íon ferroso) por enxofre, e foram adicionados alguns outros sais. Os valores iniciais de pH (1,8 e 2,8 respectivamente) foram sugeridos por Garcia, Mukai e Andrade (1992).

- **Meios sólidos para a purificação:**

O meio sólido para bactérias oxidantes de ferro foi preparado utilizando o meio líquido descrito por Tuovinen e Kelly (1973), mas foram testadas 3 concentrações de sais minerais. Na Tabela 4 estão apresentadas as composições do meio utilizado nos ensaios.

A preparação do meio sólido está descrita a seguir:

Solução A: Dissolveram-se separadamente, os sais da solução A em água destilada, ajustando-se o pH em 1,8 com ácido sulfúrico H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e esterilizou-se em autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Solução B: O sulfato ferroso foi dissolvido ajustando-se o pH em 1,8 com H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e foi esterilizado por filtração em membrana (Millipore $0,45 \mu\text{m}$ diâmetro de poro). Foram misturadas as soluções A e B na relação 4:1 no momento de uso.

Solução C: A solução de agarose foi preparada em um volume correspondente à metade do volume final, de modo que a concentração final fosse de 0,45% m/v. Esterilizou-se em autoclave a 120°C durante 20 minutos e esfriou-se até uma temperatura de 50°C , aproximadamente, antes de misturar com o resto dos sais.

No momento de misturar o meio nutritivo com igual volume da solução de agarose, tomou-se a precaução de que ambas as soluções não estivessem em temperatura muito elevada para evitar a hidrólise da agarose já que isto pode impedir que o meio se solidifique. Assim que as soluções foram misturadas, distribuiu-se o meio preparado em placas de Petri, previamente esterilizadas (aproximadamente 20-25 mL por placa).

O meio sólido para bactérias que oxidam enxofre foi preparado utilizando-se o meio líquido descrito por Garcia et al. (1992). Na Tabela 5 está apresentada a composição dos meios utilizados nos ensaios.

Tabela 4. Meio sólido T&K-agarose

Solução A (pH1,8) 400 mL	1 (g/L)	2 (g/L)	3 (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,4	0,3
K ₂ HPO ₄	0,5	0,1	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,4	0,3
Solução B (100 mL, pH1,8) FeSO ₄ .7H ₂ O 33,3			
Solução C Agarose H ₂ O destilada	4,5 (0,45%p/v) 500 ml		

- **Condições gerais na preparação dos meios de cultivo**

O pH do meio de cultivo foi ajustado antes de ser esterilizado mediante a adição de H₂SO₄ diluído até alcançar o valor requerido para cada caso.

Os meios de cultivo sem ferro foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Os meios com ferro ferroso foram esterilizados por filtração através de membranas Millipore de 0,2 µm de diâmetro.

O enxofre em pó foi esterilizado em autoclave a 110°C durante 60 minutos antes de ser adicionado ao meio sem ferro. Adicionalmente, foram realizados controles periódicos de placas sem inóculo, para detectar uma possível contaminação dos sólidos utilizados obtendo-se sempre resultados negativos.

Tabela 5. Meio sólido com tiosulfato para bactérias oxidantes de enxofre.

Solução A	[mg]	Solução B	[g]	Solução C	[g]
(NH ₄) ₂ SO ₄	120	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5	Agar	15
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	300	H ₂ O destilada	150 ml	H ₂ O destilada	150 ml
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14	pH final			
K ₂ HPO ₄	100	4,2			
H ₂ O destilada	700 ml				

- Isolamento e enriquecimento em meio líquido**

Foram preparados frascos erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de meio estéril (T&K em pH 1,8 ou 9K em pH 2,8) inoculados com uma ponta de espátula da amostra sólida (lama, escória, rejeito total ou rejeito não magnético). Os frascos foram incubados a 30°C com agitação constante a 180 rpm. Este procedimento foi realizado em duplicata.

O crescimento de bactérias oxidantes de ferro foi verificado pela mudança na cor do meio T&K (de verde claro a laranja marrom), após 2 ou 3 dias de inoculação. Esta variação indicou a oxidação do substrato, o íon ferroso a íon férrico. O crescimento bacteriano nos cultivos com enxofre foi verificado pela diminuição do valor de pH e a turbidez no meio.

Após o crescimento celular, estes cultivos foram reinoculados em frascos com meio de cultivo fresco para assegurar a manutenção das espécies bacterianas. Também foram crescidos em meio com enxofre a fim de se tentar a diferenciação do gênero e espécie.

- Isolamento e purificação em meio sólido T&K-agarose**

A partir dos cultivos enriquecidos correspondentes aos rejeitos, se realizou o isolamento em meio sólido mediante a técnica de diluições sucessivas em 6 tubos contendo 4,5 mL do surfatante Tween 80 (0,25%) e 0,5 mL do meio enriquecido. De cada diluição tomou-se 100 µL e colocou-se em placas de Petri com o meio (T&K ou

tiosulfato) e agarose como suporte. A utilização do surfatante teve como objetivo melhorar o tamanho das colônias no meio sólido (GARCIA; MUKAI; ANDRADE, 1992).

- **Oxidação de substratos (respirometria)**

Nos testes de oxidação de substratos utilizando a técnica de consumo de oxigênio contendo diferentes substratos (como sulfato de ferro ou sulfetos minerais) foram realizados como descrito na metodologia 2.1.

- **Dosagem de proteínas totais**

Centrifugou-se 1 mL de suspensão celular por 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi suspenso em 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e hidrolisado por fervura em banho maria durante 30 minutos. Alíquotas dessa solução, diluídas adequadamente, foram utilizadas para a dosagem protéica pelo método de Hartree (HARTREE, 1972).

Foi escolhido o valor da técnica de proteínas totais como unidade biológica de rotina para expressar os resultados dos estudos de respirometria, já que este método é simples de se realizar, preciso e muito sensível (15-110 µg).

- **Crescimento em meio ácido**

Para os testes de tolerância à acidez, foram realizados ensaios de crescimentos em meio líquido T&K em diferentes valores de pH: 1,4; 1,8 e 2,2. Estes ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultivo e 5% v/v de inóculo de cada linhagem. Os frascos foram incubados a 30°C e agitados a 150 rpm em agitador orbital. A determinação do crescimento foi acompanhada por titulação do íon ferroso com dicromato de potássio (VOGUEL, 1977).

- **Resistência a metais**

Para avaliar diferenças fisiológicas entre as distintas células bacterianas isoladas neste trabalho, desenvolveu-se um teste de resistência a metais, onde foi avaliado o efeito destes na oxidação de ferro pelos micro-organismos oxidantes de ferro.

Este teste foi realizado da seguinte forma: foram selecionados níquel, cobalto e cobre como metais predominantes nos rejeitos de concentrado de flotação de níquel. As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações dos elementos escolhidos para o teste de resistência.

Elemento	Fonte	Concentrações (g L ⁻¹)			
		3	6	12	24
Níquel	NiSO ₄				
Cobalto	CoSO ₄	0,2	0,4	0,8	
Cobre	CuSO ₄	1,25	2,5	5,0	

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de rejeitos minerais

- **Caracterização dos rejeitos minerais**

Os resultados das aberturas para cada rejeito estão apresentados na Tabela 7 e a caracterização mineralógica das amostras originais está apresentada na Figura 5. Pode-se observar que as porções “total” e “solúvel” de níquel na lama são muito similares, com o que pode ser deduzido que o níquel encontra-se nos sulfetos do rejeito e são facilmente extraíveis com um ataque ácido com água régia. Com a caracterização da escória pode ser observado que este rejeito tem o conteúdo de níquel total muito maior que o solúvel e considerando a grande porção de sílica é possível que o níquel encontra-se formando parte de uma rede cristalina diferente de sulfetos.

As análises das amostras originais de escória e lama por difração de raios X (DRX) revelaram as diferenças mineralógicas de cada resíduo (Figura 5). Na escória encontrou-se uma única fase mineralógica característica de silicatos de ferro-magnésio tipo faialita ou forsterita $[(Mg_{0.5}Fe_{0.5})_2SiO_4]$. A lama pelo contrario está constituída de uma variedade de fases mineralógicas como dolomita $[CaMg(CO_3)_2]$; kaolinita $[Al_2Si_2O_5(OH)_4]$; magnetita $[Fe^{2+}Fe^{3+}_2O_4]$; quartzo $[SiO_2]$; silicatos $[Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2]$ e pirrotita $[Fe_{(1-x)}S]$ (Figura 5).

Tabela 7. Concentração de níquel, cobalto e cobre nos rejeitos (%).

	Ni total	Ni solúvel	Cu total	Cu solúvel	Co total	Co solúvel	Si total	Si solúvel
Escória	0,26	0,07	0,27	0,06	0,06	0,06	13	0,2
Lama	0,30	0,25	0,03	0,03	0,01	0,01	22	0,9

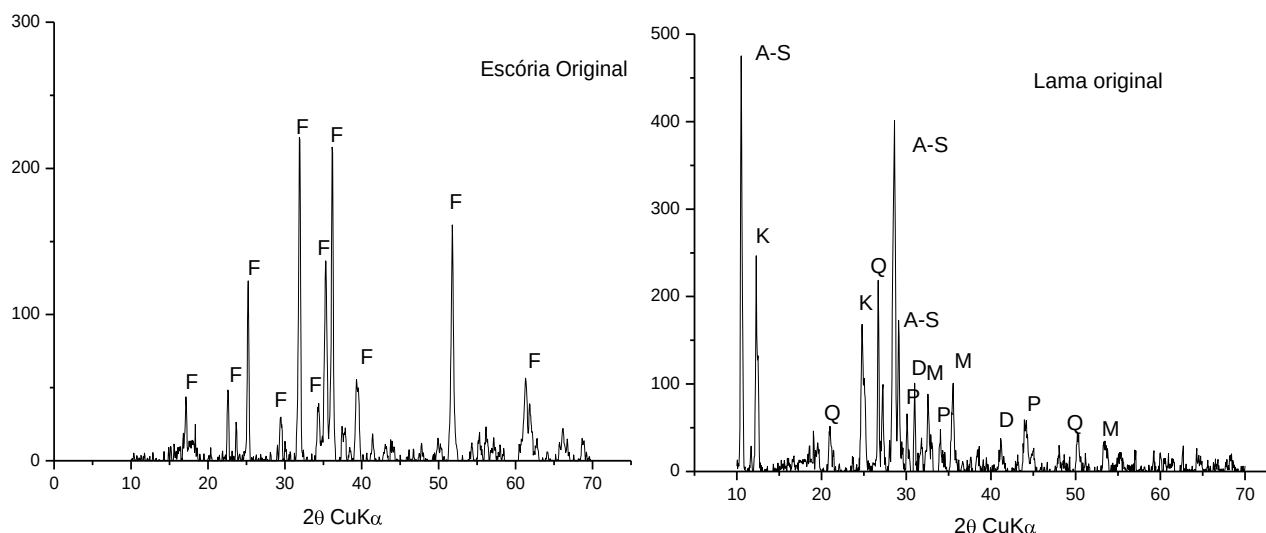


Figura 5. Difrátogramas das amostras originais de escória e da lama utilizadas nos ensaios de biolixiviação. F: faialita/forsterita; K: kaolinita; Q: quartzo; P: pirrotita; M: magnesita/magnesioferrita; D: dolomita; A-S: aluminosilicatos.

• Consumo de ácido pelas amostras

O consumo de ácido em cada condição está apresentado na Tabela 8. Estes valores foram calculados a partir da quantidade de ácido sulfúrico que foi necessária para manter o valor de pH testado. Este consumo é um parâmetro frequentemente calculado nos projetos de metalurgia na hora de avaliar projetos de viabilidade econômica e/ou técnica para tratamentos de rejeitos minerais.

Segundo estes resultados, pode ser visto que em pH 1,0 o consumo de ácido foi muito menor comparado com o teste em pH 0,5 e as extrações do níquel foram altas no caso da escória, indicando que não é necessário um gasto de ácido muito elevado para alcançar altas porcentagens de solubilização de metais .

Os resultados dos testes de consumo de ácido com a escória e a lama, realizados em pH 1.0 e pH 0.5, estão também apresentados na Tabela 8. No caso da lixiviação ácida da escória, obteve-se uma grande porcentagem de níquel solúvel em ambos os valores de pH, mas a porção total só alcançou 56% na maior acidez. Isto pode ser devido à cristalinidade do material pois como foi visto com a abertura com água régia a porção solúvel foi muito baixa comparada com a porção total. Com relação ao cobre, foi extraído 52% em pH 1,0 da porção solúvel e 12 % do cobre total, enquanto que 100% do cobre solúvel e 24 % da porção total foi extraído em pH 0,5, indicando que o cobre está realmente refratário dentro da fase de sílica da escória.

No caso da lama não houve diferença significativa na extração de níquel total ou solúvel com ambos os valores de pH e foi extraído menos de 30% do metal. Com esses valores extraídos pode se deduzir que falta outro agente lixiviante no meio para solubilizar mais níquel. Enquanto ao cobre, houve uma maior solubilização do metal em pH 1,0 que a 0,5, indicando que uma maior concentração de ácido sulfúrico teve um efeito negativo na extração.

Tabela 8. Porcentagens de extração de níquel e cobre depois de lixiviação química.

		Ni solúvel	Ni total	Cu solúvel	Cu total	Consumo de ácido (kg/T)
Escória	pH 0.5	100	56	100	24	560
	pH 1.0	81	21	52	12	150
Lama	pH 0.5	27	23	16	16	212
	pH 1.0	26	22	28	28	123

- **Oxidação de substratos (respirometria)**

A linhagem *A. ferrooxidans*-LR foi analisada em sua capacidade para utilizar os rejeitos como fonte de energia mediante a técnica de respirometria. Os testes foram realizados com os rejeitos em seu tamanho de partícula original (50-100 µm para a lama e entre 100-500 µm para a escória) com os rejeitos moídos a uma granulometria de 50 µm. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Com estes ensaios foi evidente que a escória parece ser um melhor substrato para as células bacterianas, pois fornece, facilmente, uma fonte de energia demonstrada pela cinética rápida de consumo de oxigênio, enquanto a respiração a partir de lama não apresentou um valor alto de oxigênio consumido. Isto poderia ser explicado talvez pela presença de substâncias ou compostos neste rejeito provenientes do processo de flotação que podem afetar o desenvolvimento microbiano, ou também pela alta concentração de ferro contido na escória que é facilmente solúvel em valores de pH baixos como íon ferroso.

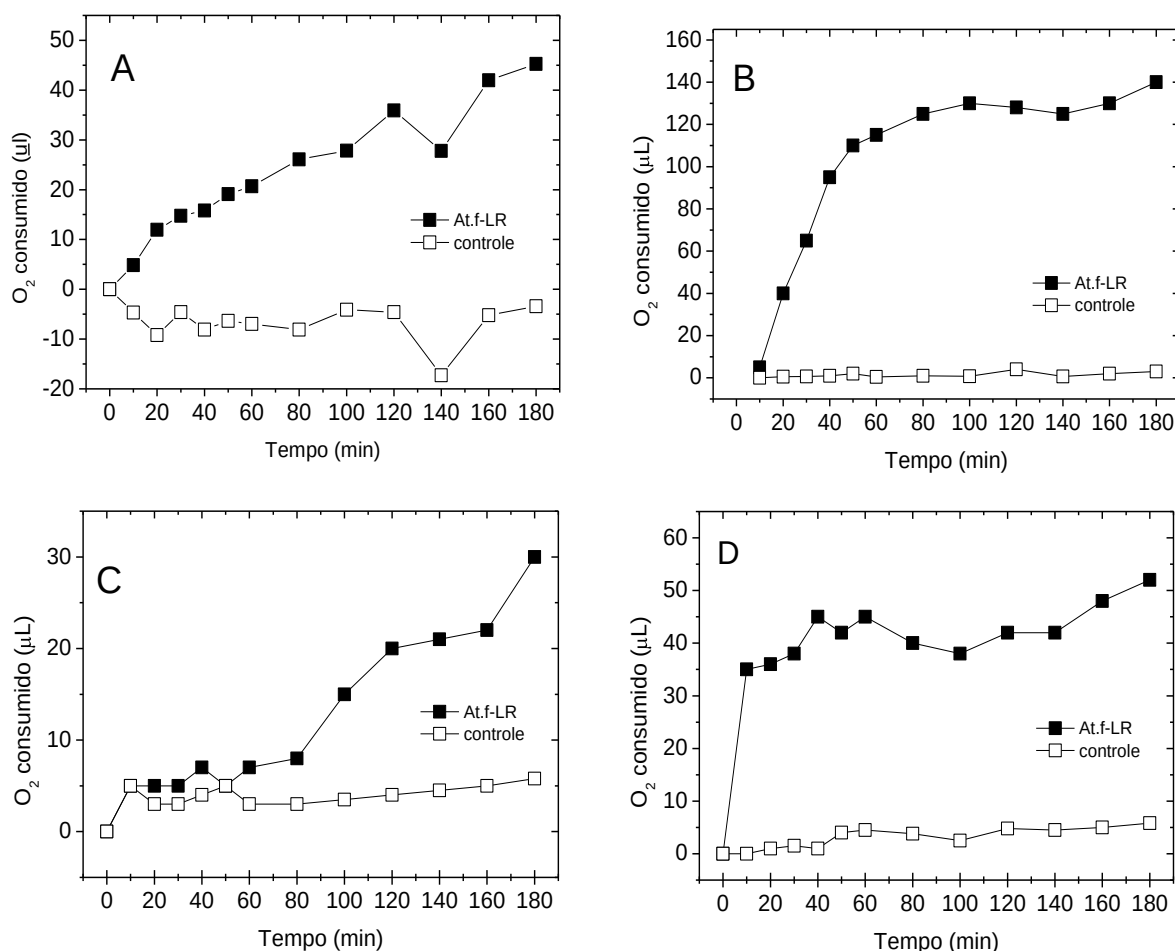


Figura 6. Consumo de oxigênio de *A. ferrooxidans*-LR (300 µg de proteína total) na presença de 100 mg de rejeito: (A) escória original; (B) escória moída; (C) lama original; (D) lama moída.

Apesar dos testes de consumo de oxigênio demonstrarem uma maior oxidação de ferro na menor granulometria dos rejeitos, os estudos de lixiviação foram realizados com o tamanho de partícula original pois, na prática, o fato de diminuir a granulometria pode aumentar os custos de operação dos tratamentos de rejeitos.

• Biolixiviação da escória (frascos agitados)

Na Figura 7A observa-se que a escória apresentou um consumo significativo de ácido durante as primeiras 24 horas de ensaio, conforme previsto no ensaio anterior, em quase todos os tratamentos, exceto naqueles que já continham íon férrico, os quais permaneceram com um pH estável. Nos sistemas onde houve elevação de pH, este foi corrigido pela adição de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹.

Na presença de *A. ferrooxidans*, o potencial de oxi-redução (medido com eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl_(Sat)) manteve-se ao redor de 600 mV durante todo o período do ensaio (Figura 7B), enquanto nos controles abióticos, o potencial

se manteve ao redor de 350 mV. Após 14 dias de ensaio o potencial elevou-se no frasco controle com adição de Fe^{2+} . O controle com adição de Fe^{3+} apresentou Eh elevado durante todo o período de ensaio. Com os frascos sem adição de ferro pode ser visto que houve uma solubilização do íon ferroso a partir da escória o qual foi oxidado rapidamente pelas bactérias no frasco inoculado enquanto no frasco abiótico a oxidação química do ferro foi lenta como ocorre naturalmente. Na escória, a solubilização de cobre e níquel não foi afetada pelo aumento do Eh, somente pela concentração de ácido na solução.

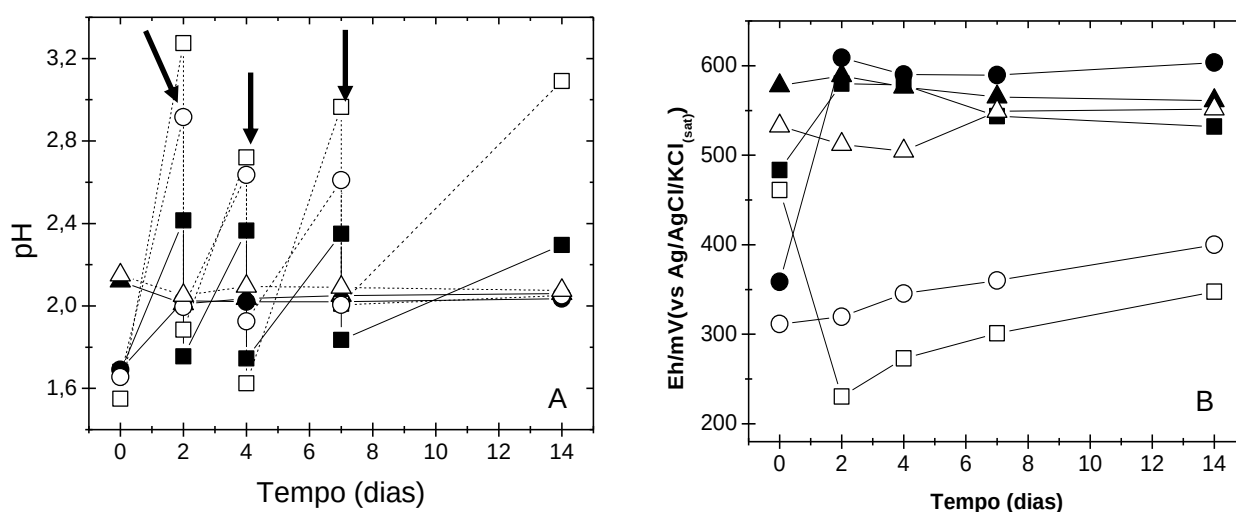


Figura 7. Variação do pH (A) e potencial de óxido-redução (B) nos experimentos de biolixiviação da escória (frascos agitados). Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (▲) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$. As setas indicam o momento da correção ácida.

As concentrações de níquel e cobre em solução a partir da lixiviação bacteriana podem ser observadas na Figura 8. Estão apresentados os valores de extração expressos em concentração (mg L^{-1}). No caso do níquel, todos os frascos apresentaram o mesmo comportamento, obtendo-se valores muito semelhantes. No entanto, a curva para o cobre foi um pouco diferente. Neste caso a maioria dos cultivos bacterianos apresentou valores mais altos de solubilização de cobre do que aqueles apresentados pelos controles.

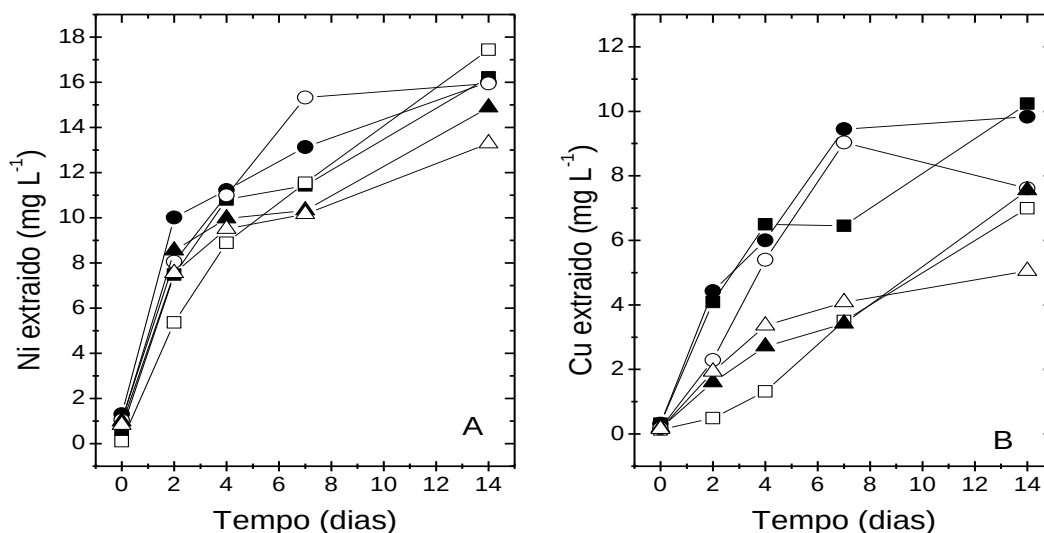


Figura 8. Extração de níquel (A) e cobre (B) nos sistemas de biolixiviação da escória (frascos agitados). Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com 120 mmol L⁻¹ Fe²⁺; (▲) meio de cultivo crescido com 120 mmol L⁻¹ Fe³⁺.

Na biolixiviação da escória extraiu-se quase 50% de Ni solúvel, tanto nos frascos bacterianos quanto nos estéreis. A partir do conteúdo total extraiu-se só 13%. No caso do cobre, apesar de que a escória tem uma quantidade similar de ambos os metais, as porcentagens de extração foram mais baixas tanto na porção solúvel quanto a total (Tabela 9).

Posteriormente ao processo de lixiviação os sólidos foram analisados por difração de raios X para determinar as mudanças das fases mineralógicas. Na Figura 9 são apresentados os difratogramas de cada sólido. Não foram encontradas mudanças significativas em relação aos difratogramas originais, exceto pela presença de pequenos picos de jarosita, especialmente nos sólidos biolixiviados com adição de íon férrico.

Tabela 9. Porcentagens de extração após 14 dias de biolixiviação da escória em frascos agitados.

Frascos	Ni solúvel (%)	Ni total (%)	Cu solúvel (%)	Cu total (%)
Inoculado sem ferro	46	13	32	8
Controle	50	13	22	5
Inoculado com adição de íon ferroso	46	12	31	8
Controle	46	12	30	7
Inoculado e com íon férrico	43	11	17	4
Controle	38	10	16	4

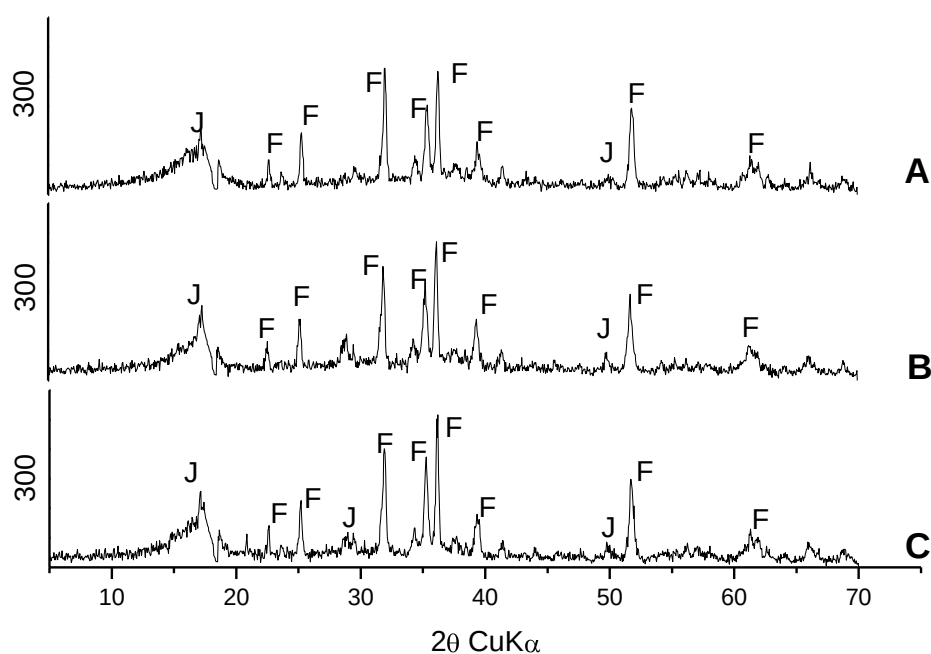


Figura 9. Difração de raios X dos sólidos após 14 dias de biolixiviação. (A) meio sem adição de íon ferroso; (B) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (C) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$; Símbolos: J: jarosita; F: faialita/forsterita.

Vários estudos têm reportado a formação de hematita e/ou goetita a partir da oxidação de faialita, mas em nosso trabalho as análises por DRX não revelaram tais precipitados e sim uma formação incipiente de jarositas a partir das lixiviações da escória. As jarositas $[\text{XFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ são formadas pela precipitação do íon férrico em meios contendo sulfato, como os encontrados na lixiviação bacteriana de

sulfetos minerais. Várias espécies de jarosita podem ser formadas dependendo do tipo do cátion são elas: K^+ (potássio jarosita), NH_4^+ (amônio jarosita), Na^+ (natro jarosita) e H_3O^+ (hidrônio jarosita) (BEVILAQUA et al., 2002; DAOU; KARAMANEV, 2006).]

Uma diminuição na dissolução de metais pode ser atribuída à formação de uma camada inibitória para a difusão dos íons ou precipitados na superfície do rejeito. A formação de um produto rico em ferro sobre a superfície é consistente com a química da solução, onde se observou a geração de íon férrico mediante a curva de potencial de oxi-redução e o aparecimento de picos de jarosita.

Por outro lado, segundo Santelli et al., (2001) o Fe^{3+} gerado ou adicionado, (como nos ensaios inoculados com íons ferroso e férrico) tem um efeito negativo na dissolução de materiais silicatados como faialita. Segundo os autores, uma concentração de Fe^{3+} de 5 mmol L^{-1} é fortemente inibitória para a dissolução da faialita e cerca de 80 - 90% do ferro adicionado foi precipitado durante os experimentos (3 meses), gerando uma camada de, aproximadamente, 600 a 700 nm de espessura sobre a superfície do mineral, caracterizada pela fase mineralógica de goetita. Em nosso estudo, os experimentos continham 120 mmol L^{-1} de ferro adicionado como sulfato ferroso ou como íon férrico nas culturas crescidas. Essa quantidade foi muito maior do que a utilizada no estudo de Santelli, o que poderia ter gerado uma quantidade de precipitados muito maior do que a encontrada por esses autores. No entanto, como o tempo de ensaio em nossos estudos não ultrapassou 15 dias, a quantidade de precipitados formada era ainda incipiente.

Outra possível explicação para a supressão da dissolução da escória na presença de micro-organismos e/ou Fe^{3+} é que este ferro hidrolizado se adsorve na superfície mineral, passivando-a quimicamente. Esta passivação química das superfícies também tem sido sugerida para outros metais e outros minerais. Conseqüentemente, superfícies de faialita que contenham íons férricos adsorvidos (adicionado ou gerado a partir da oxidação pelos micro-organismos), poderiam ser significativamente menos reativas (SANTELLI et al., 2001; WELCH; BANFIELD, 2002).

Segundo Valix, Tang e Cheung (2001) o níquel pode ser adsorvido em mineral laterítico (caracterizado por oxi-hidróxidos de ferro e/ou óxidos de silício), dependendo das condições de acidez do meio. Esta adsorção teria como resultado uma diminuição da concentração de níquel solúvel. A proporção da adsorção do metal vai depender, também, do tipo de mineral a ser dissolvido.

A escória utilizada neste trabalho está constituída de óxidos de silício com ferro e/ou magnésio e os ensaios de biolixiviação foram realizados em pH inicial de 1,8 e chegaram a subir até 3,0. Por tanto, nessas condições é possível que nesse material tenha acontecido este tipo de fenômeno de adsorção de metais lixiviados.

- **Lixiviação ácida estática da escória (pilhas)**

Considerando os resultados dos testes de consumo de ácido e da biolixiviação da escória, na qual a solubilização dos metais nos frascos abióticos foi similar aos frascos inoculados, realizou-se outra série de ensaios para lixiviar os metais de interesse a partir da escória. A Tabela 10 resume as porcentagens de extração de níquel, cobre e cobalto (porção solúvel) obtidas em cada pilha de escória lixiviada. A Tabela 10 ilustra, também, a quantidade de ácido sulfúrico consumido durante a lixiviação. Na figura 10 apresenta-se uma fotografia de uma das lixiviações realizadas em pilhas após secagem.

Como se pode observar na Tabela 10, encontrou-se, novamente que uma maior concentração de ácido não oferece uma maior extração de metais a partir da escória. A pilha em bandeja lixiviada com H_2SO_4 5 mmol L^{-1} obteve a maior porcentagem de extração de níquel e cobalto solúvel de 77% e 17%, respectivamente. Por outro lado, as pilhas lixiviadas com ácido mais concentrado (10 e 18 mol L^{-1}) só obteve-se próximo a 60% do níquel solúvel, entre 55-38% de cobre e 16-13% de cobalto, respectivamente.

Banza, Gock e Kongolo (2002) descreveram que durante a lixiviação de escória com ácido sulfúrico ocorre a formação de sílica gel a qual prejudica a extração de metais. Por resultados anteriores, obtidos nesta tese, com outros testes em coluna, encontrou-se que as altas concentrações de ácido sulfúrico aglomeraram a escória e impediram a solubilização por percolação da solução lixiviante.

Tabela 10. Porcentagem de recuperação dos metais Ni, Cu e Co em cada pilha ácida e seu correspondente consumo de ácido.

Pilha (H₂SO₄ mol L⁻¹)	Consumo de Ácido (kg t⁻¹)	Ni solúvel %	Cu solúvel %	Co solúvel %
18	198	58	38	13
10	243	57	55	16
5,0	196	77	43	17
2,5	153	33	22	7



Figura 10. Lixiviação ácida da escória realizada em pilha.

Com todas as pilhas, especialmente com aquelas com maior concentração de ácido sulfúrico, ocorreu a formação de cristais sobre e ao redor da escória. Observou-se, também, uma grande lixiviação de ferro. Vários trabalhos têm reportado a importância de se evitar a dissolução de ferro no tratamento de escórias, já que este elemento pode formar precipitados que cobrem a superfície do material, impedindo o contato entre as partículas da escória e o agente lixiviante e também podem co-precipitar metais (ARSLAN; ARSLAN, 2002; ALTUNDONGAN; BOYRAZLI; TUMEN, 2004).

Nos outros testes com pilhas submersas (em bandeja ou em béquer) com ácido $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, obteve quase o mesmo valor de extração dos metais (61-70% de níquel e 16-17% de cobalto respectivamente) sendo um pouco melhor que as pilhas anteriores com maior concentração de ácido além de consumir menos reagente, menos de 153 kg t^{-1} de ácido.

Na Figura 11 observa-se a fotografia do sistema de pilha submersa com 1 kg de escória no primeiro dia. Na Figura 12 pode-se observar a variação do pH durante a lixiviação ácida da escória em béquer. O pH inicial com a concentração avaliada foi muito baixo; porém, observou-se um consumo constante de ácido durante os 28 dias de ensaio. Nos dias 18, 22 e 25 do ensaio o pH foi ajustado adicionando ácido sulfúrico pois na solução o pH aumentou para valores superiores a 2,0. Nos dias posteriores aos ajustes o material continuou consumindo ácido e, conseqüentemente, elevando o pH. A extração dos metais neste caso não foi muita alta, atingindo menos de 700 mg L^{-1} de níquel e 400 mg L^{-1} de cobalto, o que representa só 8% para níquel total, 30% de níquel solúvel e 18% e 20% para cobalto total e solúvel, respectivamente.

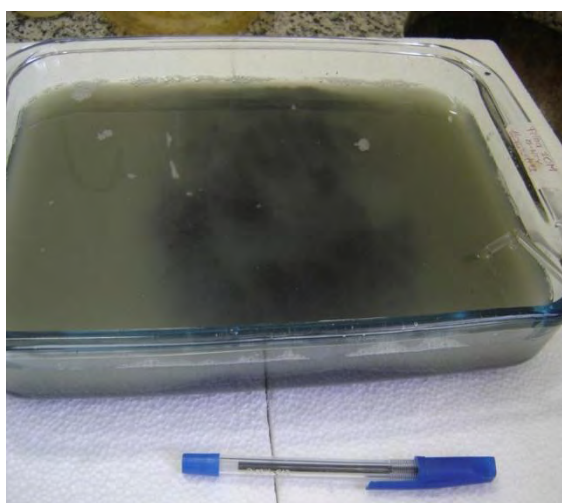


Figura 11. Sistema estático submerso em bandeja com escória.

Neste sistema de lixiviação a extração de cobalto teve um comportamento não desejado, pois a concentração do metal em solução não foi constante ou crescente, observando-se uma diminuição com o tempo o que pode ser devido à co-precipitação na ganga ou nos precipitados de ferro que ocorrem em pH maior que 1,8.

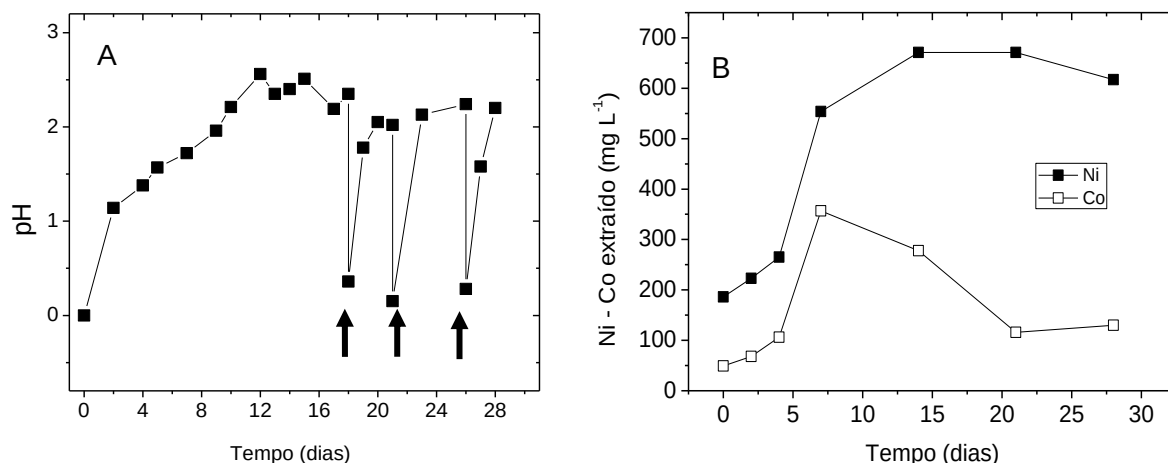


Figura 12. Lixiviação ácida da escória no sistema estático (béquer). (A) pH; (B) extração de níquel e cobalto. As setas representam o momento das correções de acidez.

A lixiviação da escória em sistemas estáticos permitiu uma boa recuperação de níquel e melhor ainda de cobalto, obtendo-se entre 15 e 20% de Ni total, e entre 75 e 100% de Co total. Essas recuperações ocorreram com um baixo consumo de ácido endógeno para curar a escória. Cabe destacar que a pilha tratada com ácido em uma concentração de 5 mol L⁻¹ foi a que teve um melhor rendimento na extração dos metais. Esta pilha teve a particularidade de ficar curando durante um tempo mais prolongado do que as outras pilhas, e este fato pode ter influenciado para que a solubilização de níquel e cobalto fosse maior. Poderia interpretar-se que o tempo de cura tem um efeito mais relevante no tratamento da escória com esta técnica.

- **Biolixiviação da lama (frascos agitados)**

Na Figura 13 estão representados as variações de pH e Eh para o ensaio com lama em frascos agitados. Da mesma forma que a escória, a lama também apresentou uma elevação do pH nas primeiras horas de ensaio, que foi corrigido com adição de ácido. Este aumento de pH deve-se ao consumo de ácido pela ganga presente no rejeito, como carbonatos e silicatos. Nos ensaios inoculados o potencial de oxi-redução manteve-se ao redor de 600 mV durante todo o período do ensaio (Figura 13B), enquanto nos controles o potencial se manteve ao redor de 350 mV.

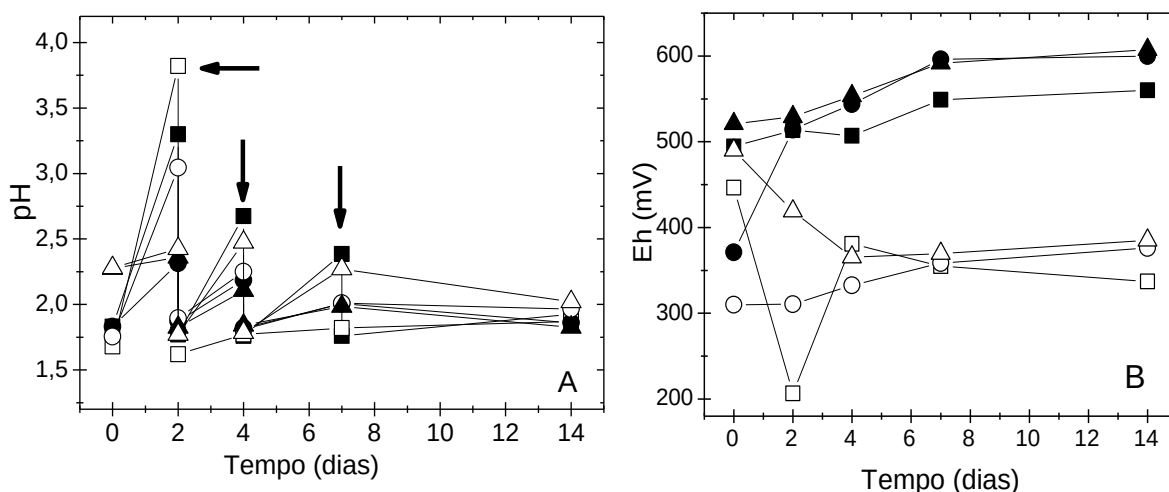


Figura 13. Variação do pH (A) e potencial redox (B) nos experimentos com lama. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (▲) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$. As setas indicam o momento da correção ácida.

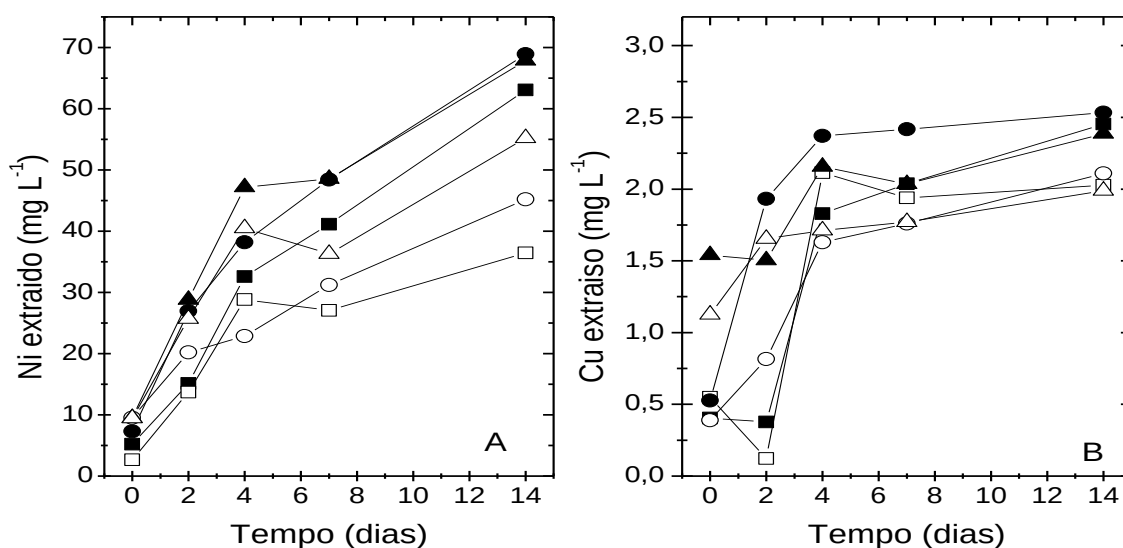


Figura 14. Extração de níquel (A) e cobre (B) nos experimentos com lama. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (▲) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$.

As extrações de níquel e cobre em solução durante a biolixiviação da lama estão representados na Figura 14. Em ambos os casos pode ser observado que os sistemas inoculados apresentaram valores um pouco mais elevados do que os valores dos sistemas controles.

Também pode ser visto que em ambos os sistemas, bióticos e abióticos, aqueles que continham íon férrico apresentam uma extração de níquel um pouco maior que os outros frascos. Diferentemente da escória, na lama foram obtidas porcentagens de extração de cobre muito mais baixas, chegando só até 17% (Tabela 11).

Tabela 11. Porcentagens de extração após 14 dias de biolixiviação da lama.

Frascos	Ni solúvel (%)	Ni total (%)	Cu solúvel (%)	Cu total (%)
Inoculado sem ferro	50	42	16	16
Controle	29	24	14	14
Inoculado com adição de íon ferroso	55	46	17	17
Controle	36	30	14	14
Inoculado e com íon férrico	54	45	16	16
Controle	44	37	13	13

A lixiviação bacteriana aumentou para 50% a solubilização do níquel nos experimentos com duas semanas, e maior do que 70% a partir de 20 dias. Na lixiviação química esta recuperação não atingiu 30%.

Este melhor desempenho da lixiviação bacteriana para a lama do que para a escória era previsível, uma vez que o rejeito escória passou por um processo de oxidação do sulfeto em alta temperatura, o que, obviamente, eliminou possíveis substratos oxidáveis pela bactéria. O rejeito lama não tendo sofrido este processo pode conter, ainda, esses substratos, fornecendo, desta maneira, substrato energético para o crescimento bacteriano, com a conseqüente produção de ácido e íons férricos, o que propicia um ambiente oxidante e mais eficaz na solubilização dos metais.

Posteriormente ao processo de lixiviação, os sólidos foram analisados por difração de raios X para determinar as mudanças das fases mineralógicas. Na figura

15 são apresentados os difratogramas de cada sólido. Os picos de pirrotita e dolomita diminuíram consideravelmente em comparação com os difratogramas das amostras originais.

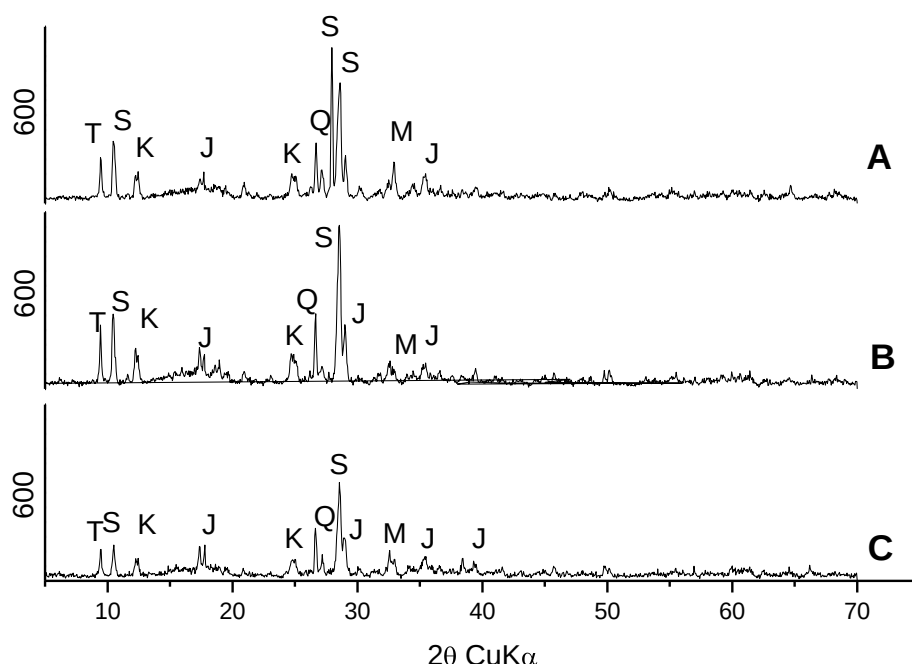


Figura 15. Difração de raios X dos sólidos após 14 dias de biolixiviação. (A) meio sem adição de íon ferroso; (B) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (C) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$; Símbolos: J: jarosita; K: kaolinita; S: silicatos; T: talco; M: magnetita/magnesioferrita; Q: quartzo.

Os picos de silicatos de Mg, Ca e Na como tremolita $[\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$, edenita $[\text{NaCa}_2\text{Mg}_5\text{Si}_7\text{AlO}_{22}(\text{OH})_2]$ e riebeckita $[\text{Na}_2(\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+})\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$ na lama original são semelhantes aos picos de K-jarosita em 3.11 e 3.08 Å ou de Na-jarosita em 3.06 e 3.12 Å. Nos sólidos tratados com bactérias encontraram-se, adicionalmente, outros picos de jarosita em 5,1 Å de H-jarosita, NH_4 -jarosita ou Na-jarosita; e um pequeno pico em 2.29 Å de K-jarosita, que junto com os outros mencionados, pode se concluir que os picos maiores das jarositas foram ocultos ou mascarados pelos picos dos silicatos (Figuras 5, 15 e 18).

As jarositas mais esperadas nos meios de biolixiviação são H-jarosita $[\text{H}_3\text{OFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ e NH_4 -jarosita $[(\text{NH}_4)\text{Fe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$, sendo possível que os picos tenham ficado um pouco deslocados já que são muito parecidos entre todas as jarositas. Também se observou que os picos de kaolinita $[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4]$, dolomita $[\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2]$ e magnetita $(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4)$ diminuíram, consideravelmente,

de área. Isto pode ser explicado pela ação ácida sobre estes minerais. Os picos de pirrotita ($\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$) também desapareceram quando a lama foi lixiviada com bactérias, como é esperado, já que este sulfeto mineral pode sustentar o crescimento bacteriano.

Para uma melhor visualização da eficiência do processo bacteriano, a Tabela 12 resume as porcentagens de extração de níquel e cobre total e solúvel depois de 14 dias de biooxidação da escória ou lama com *A. ferrooxidans*-LR.

Tabela 12. Porcentagens de extração de níquel e cobre depois da lixiviação bacteriana agitada.

	Ni solúvel (%)	Ni total (%)	Cu solúvel (%)	Cu total (%)
Escória	38-50	10-13	16-30	4-8
Lama	30-55	24-46	13-17	13-17

A partir dos resultados obtidos na primeira biolixiviação agitada da lama, realizou-se outra série de experimentos nas mesmas condições (Tabela 2). Entretanto, o tempo do processo bacteriano foi prolongando até 50 dias, com o objetivo de aumentar as porcentagens de extração dos metais. Nesta serie de biolixiviações adicionou-se dois frascos a mais com as seguintes características: i) meio bacteriano crescido com adição de ácido sulfúrico $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ e ii) controle sem bactérias.

A variação do pH e do Eh desses experimentos estão representados na Figura 16. Observar-se o consumo de ácido pela lama durante a maior parte do tempo do ensaio, enquanto o potencial redox se manteve alto naqueles frascos inoculados, e baixo nos controles. O tratamento, *a priori*, do mineral com ácido $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ diminuiu muito o pH da solução, aproximadamente a 0,5, e o Eh não mudou muito nesses frascos, mantendo-se próximo a 500 mV.

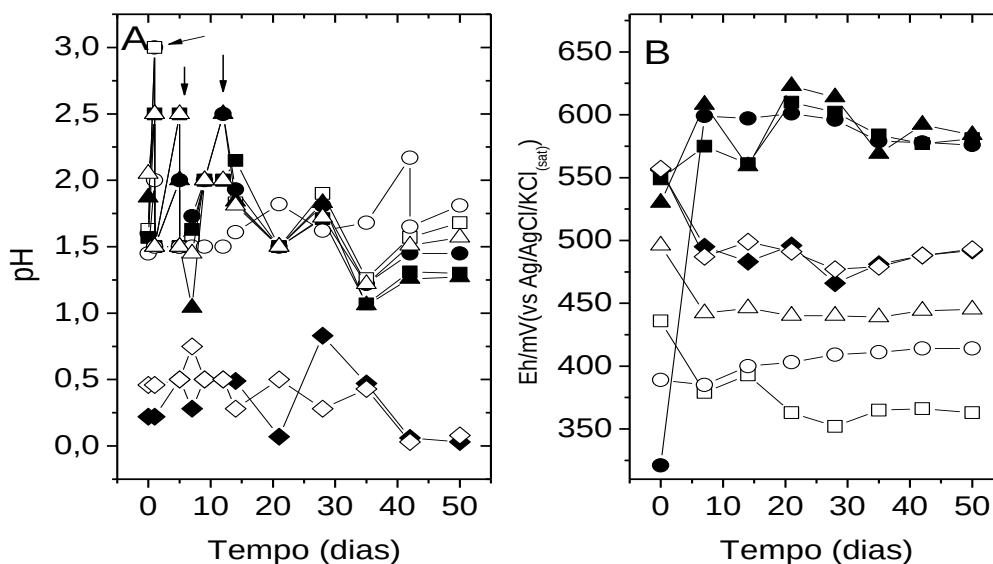


Figura 16. Variação do pH e Eh nos experimentos com lama. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com 120 mmol L⁻¹ Fe²⁺; (▲) meio de cultivo crescido com 120 mmol L⁻¹ Fe³⁺, (◆) meio de cultivo crescido com 120 mmol L⁻¹ Fe³⁺ e H₂SO₄ 1,25 mol L⁻¹. As setas indicam o momento da correção ácida.

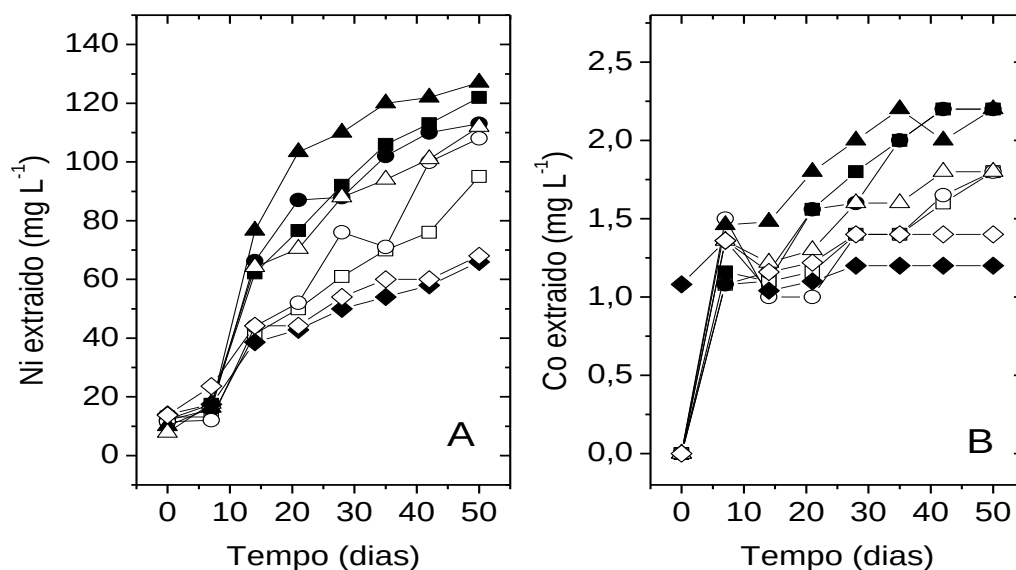


Figura 17. Extração de níquel (A) e cobalto (B) nos experimentos com lama. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio sem adição de íon ferroso; (●) meio suplementado com 120 mmol L⁻¹ Fe²⁺; (▲) meio de cultivo crescido com 120 mmol L⁻¹ Fe³⁺. (◆) meio de cultivo crescido com 120 mmol L⁻¹ Fe³⁺ e H₂SO₄ 1,25 mol L⁻¹.

As extrações de níquel e cobalto nos frascos inoculados, exceto aqueles que continham ácido, alcançaram valores superiores aos controles (Figura 17). O

sistema contendo íon férrico e bactérias obteve o valor mais alto em menos da metade do tempo que os outros sistemas. Na Figura 17B pode se observar as extrações de cobalto que foram muito baixas, menores de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ do conteúdo total do metal, representando 37% de cobalto total como máximo.

A Tabela 13 resume as porcentagens de recuperação dos metais para cada condição após 50 dias de biolixiviação.

Na Figura 18 são apresentados os difratogramas de cada sólido após 50 dias de biolixiviação. Similar aos resultados realizados durante 14 dias, os picos de pirrotita e dolomita diminuíram consideravelmente, comparando com os difratogramas das amostras originais.

Tabela 13. Porcentagens de extração de metais após 50 dias de biolixiviação da lama.

Frascos	Ni solúvel (%)	Ni total (%)	Co solúvel (%)	Co total (%)
Inoculado sem ferro	98	81	53	37
Controle	76	63	44	30
Inoculado com adição de íon ferroso	90	75	53	37
Controle	70	55	45	30
Inoculado e com íon férrico	100	84	53	37
Controle	90	74	44	30
Inoculado e com íon férrico e H_2SO_4 $1,25 \text{ mol L}^{-1}$	53	44	29	20
Controle	54	45	34	23

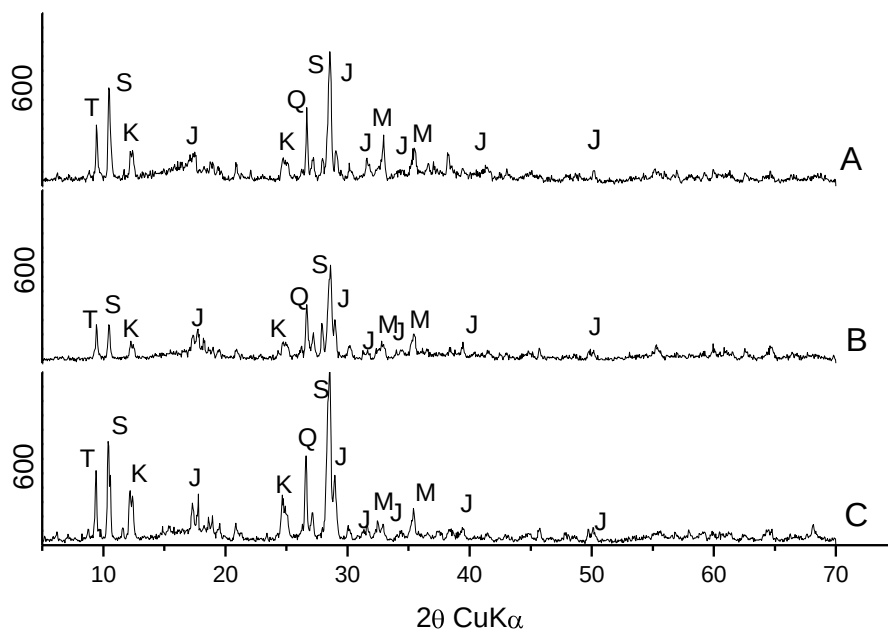


Figura 18. Difração de raios X dos sólidos após 50 dias de biolixiviação. (A) meio sem adição de íon ferroso; (B) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (C) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$; Símbolos: J: jarosita; K: kaolinita; S: silicatos; T: talco; M: magnetita/magnesioferrita; Q: quartzo.

• Lixiviação Estática da Lama

O comportamento do pH nos sistemas estáticos com lama (Figura 19A) foi similar aos outros sistemas de lixiviação comentados anteriormente, apresentando um aumento desde as primeiras horas e durante todo o tempo da lixiviação, sendo necessárias correções com adições de ácido sulfúrico.

A Figura 19B apresenta o comportamento do potencial redox o qual diminuiu durante os primeiros dias. A partir da primeira semana o Eh começa a subir em todos os frascos, mantendo-se abaixo dos 450 mV.

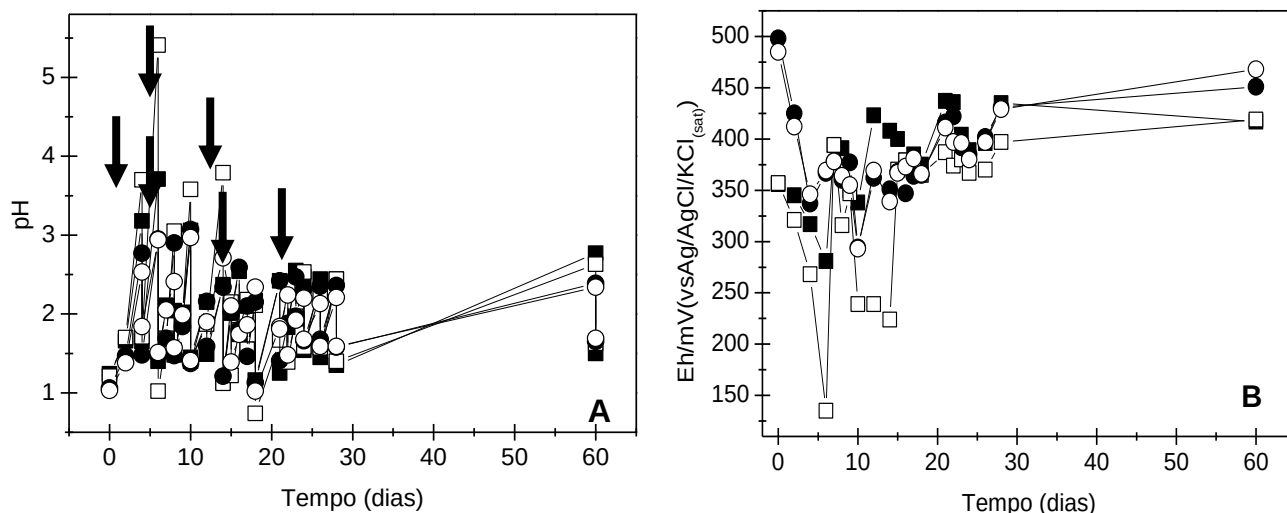
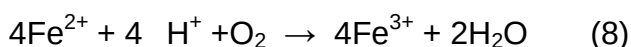
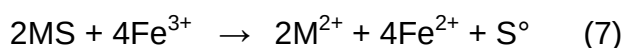


Figura 19. Variação dos valores de pH e Eh da biolixiviação da lama em um sistema estático. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio suplementado com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (●) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$. As setas indicam o momento da correção ácida.

Neste caso, o Eh diminuiu sempre independente da presença ou não de ferro e de seu estado de valência. Esta queda no Eh deve-se à ação oxidante do Fe^{3+} sobre os sulfetos minerais, que modifica, por sua vez, a relação $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Este fato demonstra que não houve uma ação bacteriana na oxidação dos sulfetos, sendo insuficiente para regenerar o íon férrico segundo a equação (8) (OJUMU et al., 2006). O anterior refletiu-se nas extrações de níquel e cobalto.



O fornecimento insuficiente de oxigênio nos frascos é um parâmetro importante nos processos de lixiviação microbiana, já que as bactérias mais utilizadas, como *A. ferrooxidans*, são aeróbios e precisam deste elemento (JENSEN; WEBB, 1995; NEMATİ et al., 1998). Por outro lado, a granulometria da lama não permitiu uma boa percolação dos reagentes nem uma boa transferência de massa (O_2 e CO_2). Assim, por não haver um bom intercâmbio entre a fase líquida e sólida, as reações de oxidação, por parte das células bacterianas e por parte do íon férrico, ficaram restritas na parte superior do bloco de lama.

As solubilizações de níquel e cobalto a partir da lama nos sistemas estáticos em béquer podem ser observadas na Figura 20. O níquel foi extraído de maneira similar tanto nos frascos inoculados como nos controles. De fato, o frasco contendo íon férrico sem bactérias foi onde se alcançou uma concentração de níquel em solução um pouco maior que 700 mg L^{-1} , comparado com 600 mg L^{-1} dos frascos bióticos. Na extração do cobalto ocorreu um comportamento similar com uma maior solubilização no frasco contendo íons férricos sem bactérias

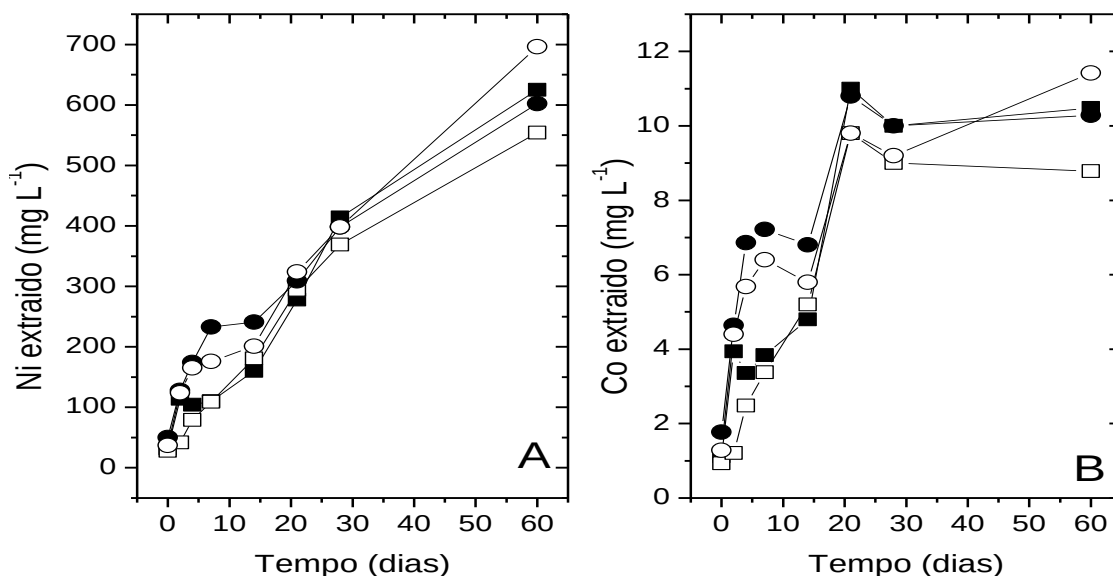


Figura 20. Solubilização de níquel (A) e cobalto (B) a partir da lama em sistema estático. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios). (■) meio suplementado com $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$; (●) meio de cultivo crescido com $120 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$.

O níquel, total e solúvel, alcançou valores máximos de 9 e 12%, respectivamente. A extração de cobalto foi menos eficiente, obtendo-se de 3,5 a 5,0% do metal.

Devido aos baixos valores de extração obtidos nos sistemas anteriores, realizou-se uma modificação no sistema reacional. Uma solução de ácido sulfúrico ($1,25 \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionada antes do ensaio de biolixiviação.

O pH e o potencial redox do frasco inoculado com *A. ferrooxidans*-LR e seu respectivo controle estão apresentados na Figura 21. Nessa figura pode-se observar que o pH sobe constantemente durante as duas semanas do processo. O potencial redox, pelo contrário, desce constantemente, desde 490 mV até 400 mV. Esta

queda do potencial redox nos frascos pode ser um reflexo da falta de atividade microbiana sobre o ferro dissolvido, a partir da lama, pela alta acidez no meio.

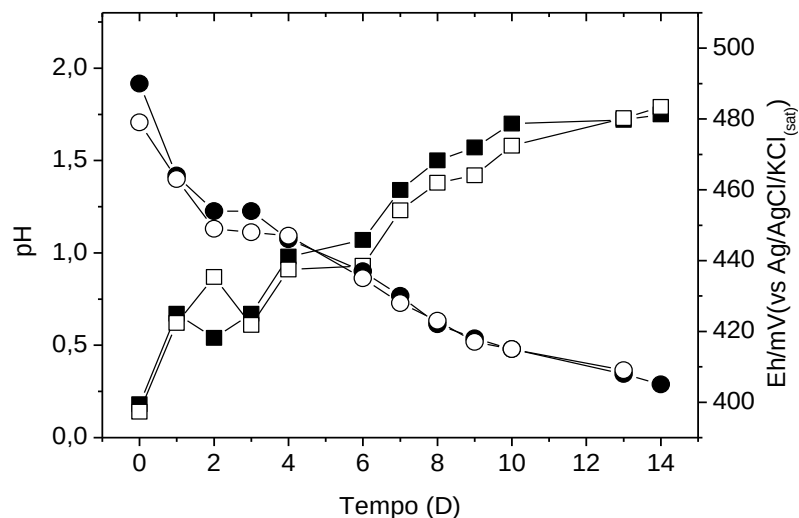


Figura 21. Variação do pH e Eh da lama em sistema estático com adição de ácido sulfúrico em uma concentração $1,25 \text{ mol L}^{-1}$. Frasco inoculado (símbolos cheios), controle (símbolos vazios). (■) pH; (●) Eh.

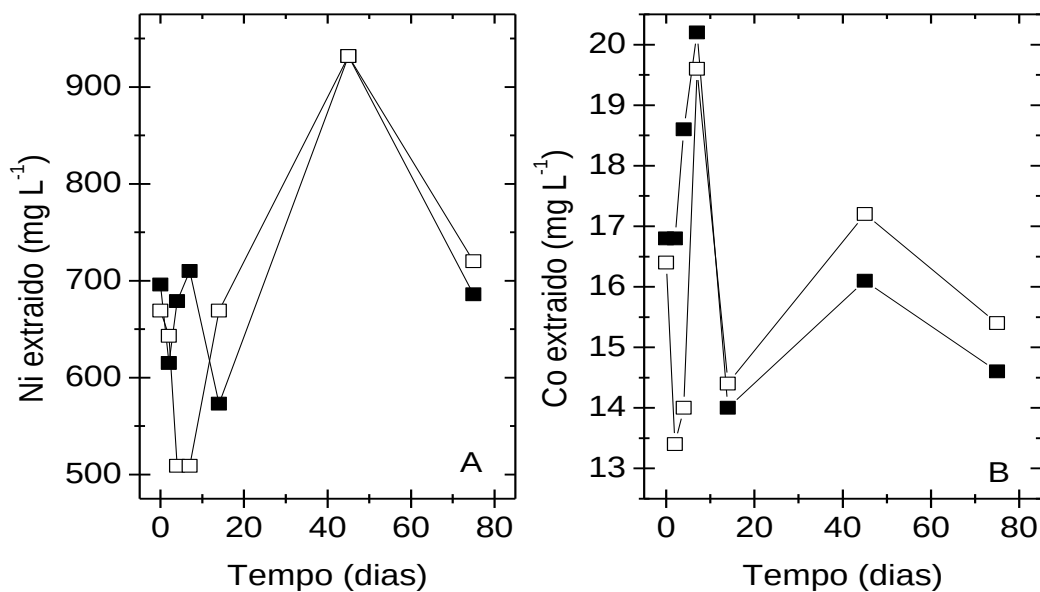


Figura 22. Solubilização de níquel (A) e cobalto (B) a partir da lama em sistema estático com adição de ácido sulfúrico $1,25 \text{ mol L}^{-1}$. Frascos inoculados (símbolos cheios), controles (símbolos vazios).

A concentração de níquel e cobalto na lixívia nos sistemas estáticos da lama (Figura 22) variaram durante o processo extrativo. Isto pode ser devido ao próprio

sistema, pois a solução contendo esses metais percolou pela lama, em direção ao fundo do frasco, ou permaneceram aderidos nos minerais ganga do rejeito.

Na Tabela 14 se resume a eficiência do processo bacteriano em frasco béquer, com porcentagens de extração de níquel total e solúvel e cobalto após 60 dias de biooxidação da lama com *A. ferrooxidans*-LR. Também são encontradas as porcentagens de extração dos metais a partir de lixiviação bacteriana e ácida com uma concentração de ácido $1,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 14. Porcentagens de extração de níquel e cobalto nos sistemas estáticos com lama após lixiviação bacteriana.

	Af-LR c/ Fe^{2+}	controle	Af-LR c/ Fe^{3+}	controle	Af-LR e H_2SO_4 $1,25 \text{ mol L}^{-1}$	controle
Níquel total (%)	10	9	10	12	15	15
Níquel solúvel (%)	25	22	24	28	19	19
Cobalto total (%)	5	5	5	5	8	8
Cobalto solúvel (%)	7	7	7	7	12	12

3.2 Solubilização de níquel e cobre a partir de minério natural

- Caracterização da pentlandita**

O conteúdo de níquel, cobre e magnésio foi de 2,6%; 0,6% e 3,0%, respectivamente, na pentlandita original sem lavar, enquanto que após a lavagem com EDTA-NaOH os conteúdos dos metais modificaram para 2,95%, 0,75% e 2,4%, respectivamente.

Com a técnica de Difração de Raios X, foram determinadas as fases mineralógicas predominantes do minério e, além de picos de pentlandita [(Fe,Ni)₉S₈], encontrou-se picos de pirrotita (Fe_{1-x}S₂); quartzo (SiO₂), magnesioferrita (Mg,Fe₂O₄) e alguns silicatos com magnésio (Figura 23).

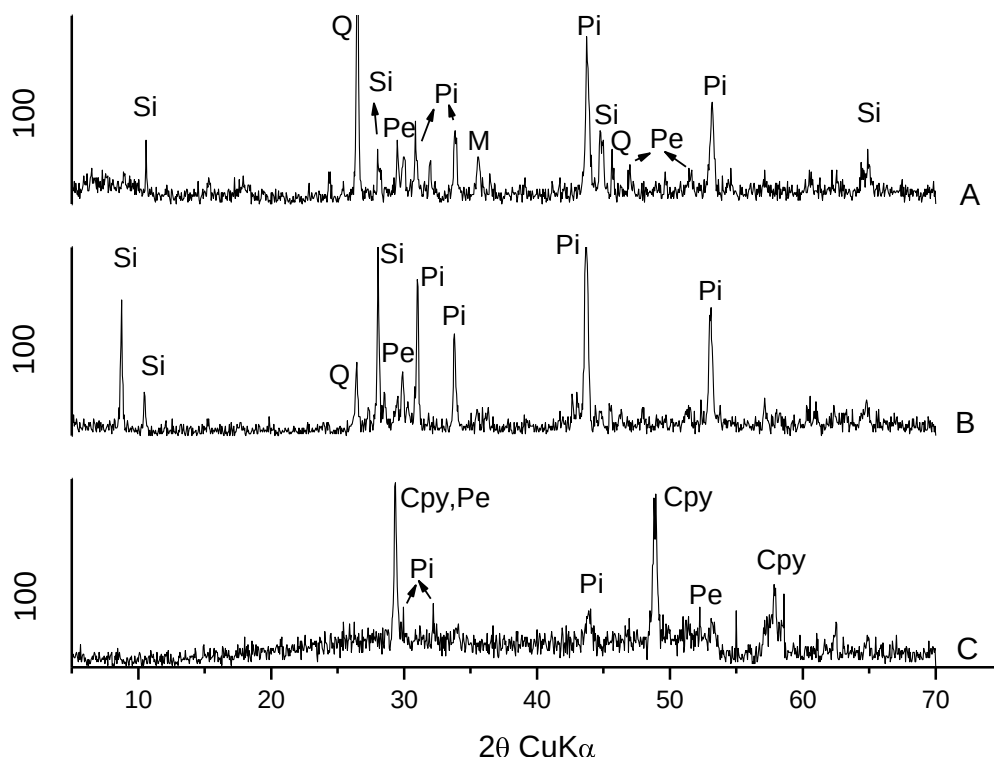


Figura 23. DRX da pentlandita original (A) e após a lavagem com EDTA-NaOH (B), e pirrotita original (C). Símbolos: Pe: pentlandita; Pi: pirrotita; Q: quartzo; Si: silicatos; M; magnesioferrita.

• Biolixiviação de pentlandita (1ª série)

Na Figura 24 estão apresentados os valores de pH durante a lixiviação da pentlandita com *A. ferrooxidans*-LR. Pode ser observado que houve uma elevação do pH durante as primeiras 2 semanas de ensaio e, portanto, foram necessárias várias correções de pH com ácido sulfúrico. Os frascos que foram acidificados anteriormente ao inóculo também apresentaram elevação de pH, principalmente nas primeiras 24 horas, evidenciando ser esta amostra mineral consumidora de ácido.

Após a segunda semana não foi realizada a correção de pH em nenhuma das condições testadas e este foi diminuindo de forma gradual em todos os frascos. Esta

diminuição de pH pode ser associada à hidrólise do íon férrico em solução, pela formação de precipitados, inicialmente visualizada e posteriormente confirmada pela análise de raios X. Contudo, nos frascos inoculados com *L. ferrooxidans* o pH no final do ensaio, foi mais alto comparado com o pH dos frascos inoculados com *A. ferrooxidans*, que pode ser justificado pelo fato de que esta espécie bacteriana não tem a habilidade de oxidar enxofre ou compostos reduzidos de enxofre e como consequência, a acidez produzida é menor.

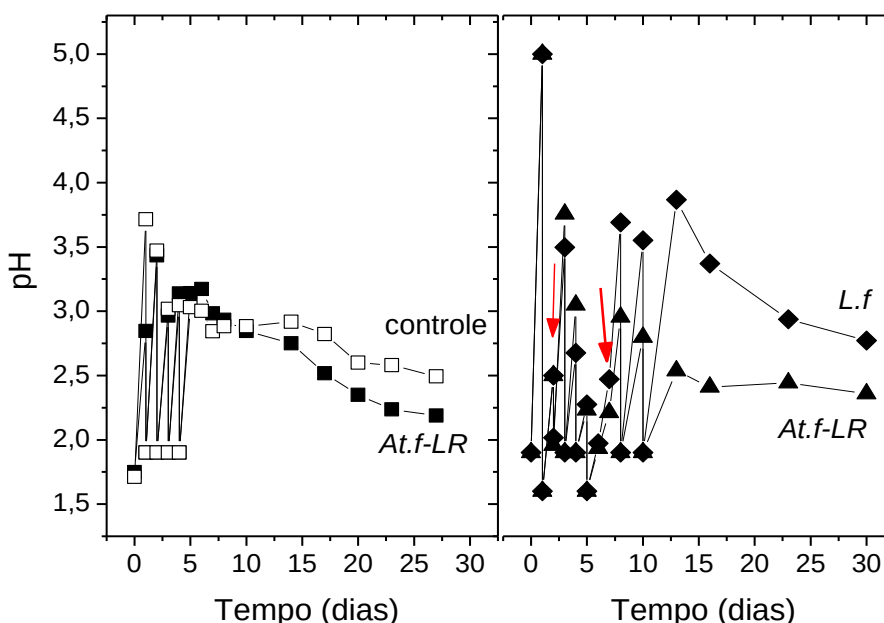


Figura 24. Variação de pH nos experimentos de biolixiviação de pentlandita. Frascos inoculados com símbolos cheios e frascos controle com símbolos vazios. As setas indicam o momento do reinóculo.

A solubilização de níquel, cobre e magnésio está apresentada na Figura 25. Em relação ao níquel, a solubilização final nos frascos inoculados com *A. ferrooxidans* foi ligeiramente inferior ao frasco controle. Na presença de *L. ferrooxidans* a extração de níquel foi consideravelmente menor. No caso do cobre a diferença foi mais significativa, chegando a ser da ordem de 4 vezes maior em solução nos frascos abióticos (9,0% e 2,4%). A presença das bactérias interferiu, positivamente, somente no caso da solubilização de magnésio.

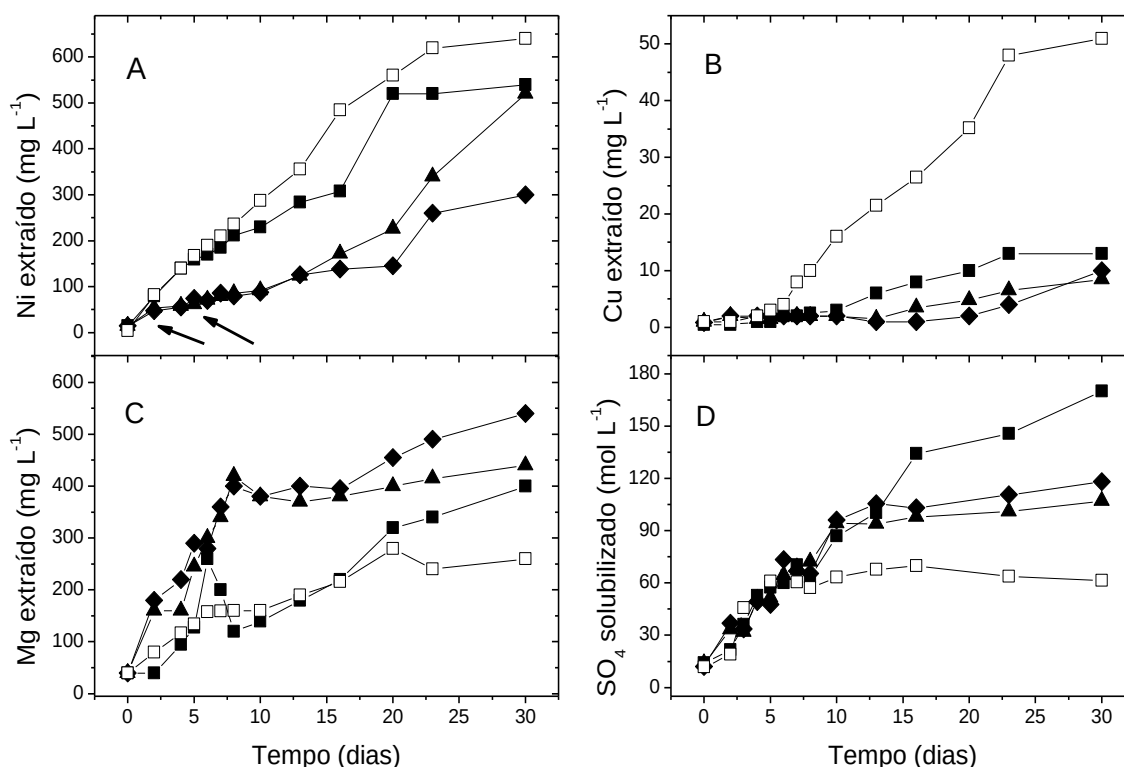
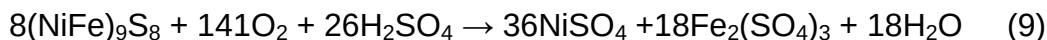


Figura 25. Solubilização de níquel (A), cobre (B), magnésio (C) e sulfato (D) nos experimentos de biolixiviação de pentlandita. Frascos com *At.ferrooxidans* (■) e controle (□) e frascos reinoculados com *At.ferrooxidans* (▲) e *L.ferrooxidans* (◆). As setas no gráfico do níquel indicam o momento do reinóculo.

Nos experimentos de biolixiviação foi determinada, também, a concentração de sulfato em solução pela técnica de cromatografia de troca iônica. Encontrou-se uma crescente formação de sulfato nos frascos (Figura 25D). Durante os primeiros 10 dias a concentração de sulfato, em ambos os sistemas, inoculado e controle, foram semelhantes alcançando menos de 70 mmol L⁻¹ de sulfato. A partir desse dia a concentração nos frascos controles permanece estável, enquanto nos frascos com bactérias a concentração continuou aumentando até alcançar pouco mais de 170 mmol L⁻¹ ao final do experimento. Nos frascos reinoculados a concentração final de sulfato foi de 107 e 118 mmol L⁻¹ com *A. ferrooxidans* e *L. ferrooxidans*, respectivamente.

Aparentemente, os sistemas biológicos tiveram um efeito negativo na solubilização de níquel e cobre. A maior produção de sulfato nos frascos inoculados a partir da oxidação da pentlandita revelou que as bactérias permaneceram ativas

durante todo o processo de biolixiviação, catalisando a dissolução do mineral, segundo as seguintes reações (WATLING, 2008):



Os resíduos sólidos após 30 dias de biolixiviação foram analisados por DRX. Na Figura 26 são apresentados os difractogramas de cada sólido.

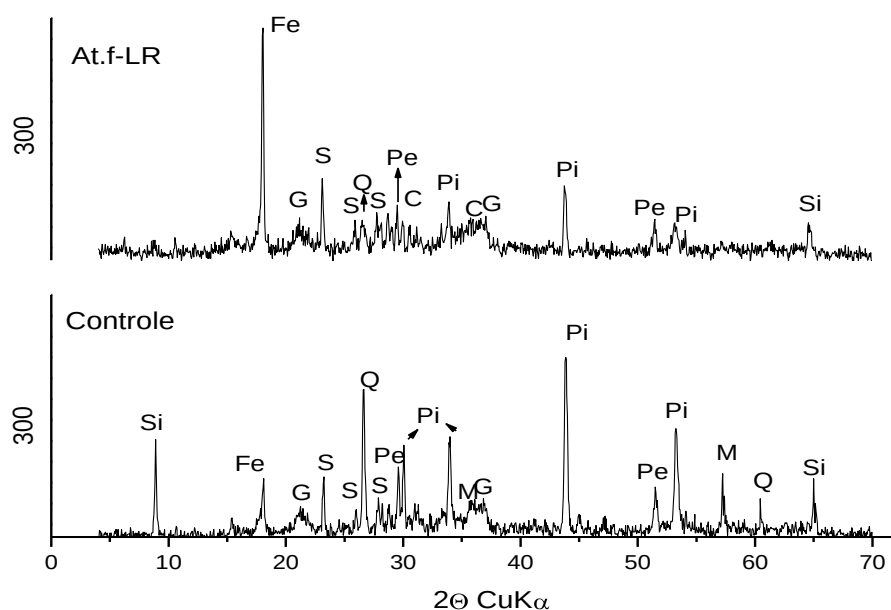


Figura 26. DRX dos resíduos sólidos após 30 dias de lixiviação da pentlandita (Inoculado e controle). Símbolos: Pe: pentlandita; Pi: pirrotita; Q: quartzo; M: magnetita; S: enxofre; Si: silicatos; G: goetita; C: cuprita; Fe: sulfato de ferro.

Avaliando-se os resultados de DRX observa-se que os sulfetos presentes na amostra original não foram oxidados completamente e, ainda, permaneceram picos de pirrotita e pentlandita, embora em menor intensidade que na amostra original. Em ambos os sistemas, inoculado e controle, houve o aparecimento de picos de goetita $[(\text{FeO}(\text{OH}))]$, enxofre e sulfatos de ferro.

Além da goetita, enxofre e precipitados de ferro são produtos naturais da oxidação da pirrotita (BHATTI et al., 1993; BELZILE et al., 2004). Bhatti et al., (1993) estudando pirrotita descreveram a formação de precipitados de ferro tipo jarosita e schwermannita. Em nosso estudo, foram detectados precipitados nas amostras inoculadas e controles que foram identificados como sulfatos de ferro, podendo ser do tipo butlerita $(\text{FeSO}_4\text{OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O})$, parabutlerita $(\text{FeSO}_4\text{OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O})$.

A presença de goetita é de relevância nestes experimentos, pois a formação deste precipitado pode levar a perda de níquel em solução por mecanismos de adsorção e/ou co-precipitação. Segundo Souza *et al.*, (no prelo) a goetita é um composto pobre e imperfeitamente cristalizado de grande área superficial com uma capacidade incomum para incorporar, adsorver e fixar íons de uma solução, e por estas características é usado como adsorvente. O valor de pH no qual foi formada a goetita também tem influência na capacidade de adsorção do óxido pelo níquel (BEUKES; GIESEKKE; ELLIOTT, 2000).

Outros óxidos e hidróxidos de ferro como ferrihidrita ($\text{FeOOH} \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$) e hematita (Fe_2O_3) também estão envolvidos no seqüestro de metais como níquel, cobalto, cobre e manganês (FORD; KEMNER; BERTSCH., 1999). Sílica amorfa e jarosita também podem conter níquel adsorvido ou co-precipitado (WHITTINGTON; JOHNSON, 2005). Ali e Dzombak (1996) reportaram que cobre e cálcio também podem ser adsorvidos por goetita.

De acordo com Ford, Kemner e Bertsch (1999) os óxidos e hidróxidos de ferro atuam como um reservatório permanente de metais adsorvidos como níquel que são estruturalmente compatíveis com goetita e hematita, enquanto que para outros metais como chumbo, eles atuam como reservatório temporário. O mecanismo de adsorção deste metal ainda não está claro, uma vez que o níquel pode ser adsorvido por grupos funcionais da superfície destes minerais ou ainda, formar fases secundárias (co-precipitação).

Todos estes trabalhos corroboram na interpretação dos dados experimentais deste estudo. Como pode ser observada na Figura 25, a concentração de níquel e cobre em solução nos frascos inoculados foi menor que nos controles. Uma possível explicação seria a adsorção/co-precipitação destes íons nos minerais presentes em solução ou inclusive de células microbianas, diminuindo assim a população bacteriana.

Segundo Maley, Bronswijk e Watling (2009a), o pH da solução tem um importante papel na dissolução, precipitação e adsorção de cobre a partir de minerais ricos em pirrotita, contendo níquel e cobre. Esses autores encontraram que a concentração de cobre foi estável em soluções com pH menores de 2,3. Já nas soluções com pH superiores, a concentração do metal foi notoriamente reduzida. Perda de cobre da solução também está diretamente relacionada à presença de

pirrotita, sugerindo que este mineral é parcialmente responsável pela demora na extração de cobre (MALEY; BRONSWIJK; WATLING 2009b).

Como observado na figura 24, o processo de lixiviação realizado nesta tese, foi altamente consumidor de ácido, levando a um incremento do pH maior do que 2,4 durante as 3 primeiras semanas do experimento. Isto poderia explicar as baixas concentrações de cobre encontradas na solução durante a biolixiviação da pentlandita associada com pirrotita.

• Ensaios de perda de metais

Para tratar de compreender os resultados da solubilização de metais nos ensaios de biolixiviação nos quais as concentrações de níquel e cobre foram menores nos frascos inoculados que nos controles, novos experimentos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar a perda de metais da solução causada pelos precipitados ou pela presença de sulfetos de ferro tipo pirrotita e pentlandita.

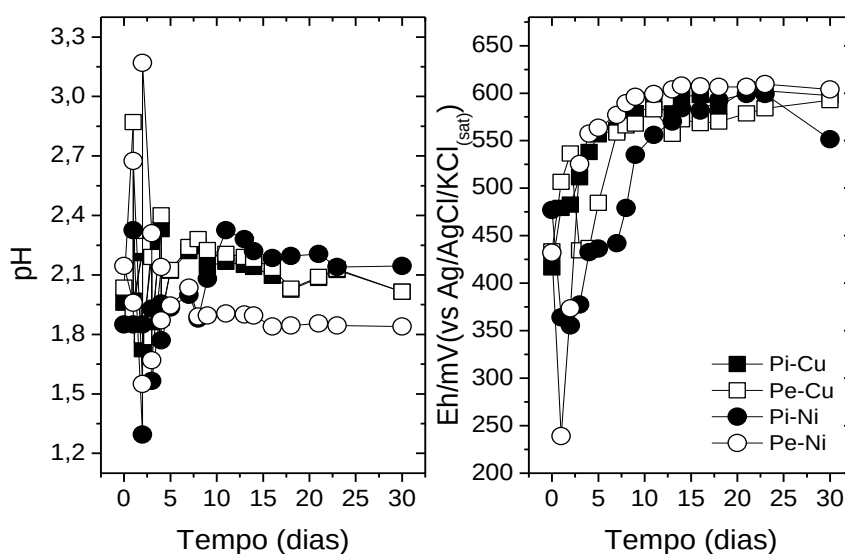


Figura 27. Variação do pH e Eh nos experimentos de adsorção de metais. Pi: pirrotita (símbolos cheios); Pe: pentlandita (símbolos vazios). Frascos com níquel (círculos) e frascos com cobre (quadrado).

Nestes ensaios, ao sulfeto mineral (pirrotita ou pentlandita) foram adicionadas soluções de níquel ou cobre (1 g L^{-1}), e inoculados com *A. ferrooxidans*. As curvas de pH e o potencial redox, durante 30 dias de ensaio, estão apresentadas na Figura 27. Pode ser observado que ambos os sulfetos consumiram ácido durante os primeiros

dias, sendo a pentlandita muito mais consumidora que a pirrotita. Este fato pode ser explicado pela presença de compostos de magnésio neste mineral, observados nos DRX como compostos de silicatos e magnesioferrita (Figura 23).

O potencial redox aumentou, continuamente, nas primeiras duas semanas, para todas as condições estudadas. Algumas variações de potencial neste período ocorreram e, provavelmente, estão associadas a erros de leitura. Depois deste período não houve alterações significativas nos valores de Eh que se estabilizaram ao redor de 600 mV.

As variações nas concentrações de cobre e níquel nestes mesmos ensaios estão representadas na Figura 28.

Com estes resultados foi evidenciado que o níquel pode ter sido co-precipitado, o que levou à diminuição de sua concentração na solução, tanto nos frascos com pirrotita ou com pentlandita. Este último mineral teve um efeito mais marcante na queda da concentração de níquel. No caso do cobre o efeito foi em menor magnitude; no entanto, também foi possível observar este fenômeno na presença dos sulfetos.

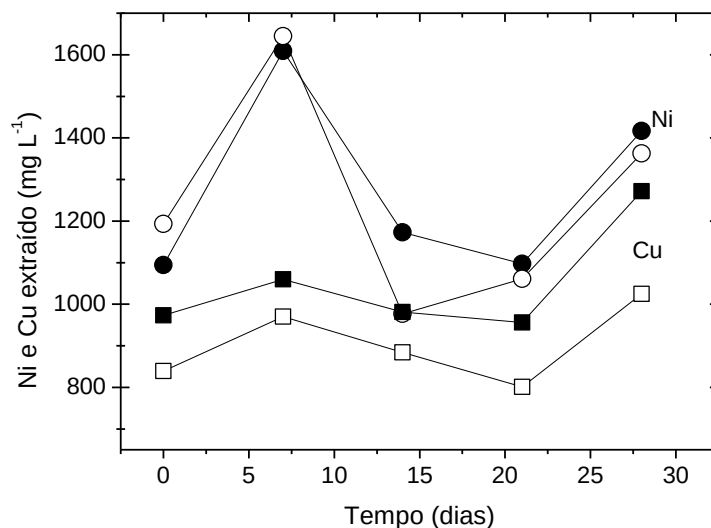


Figura 28. Extração de níquel (círculos) e cobre (quadrados) nos experimentos de adsorção de metais. Frascos com pirrotita e com pentlandita são representados por símbolos cheios e vazios, respectivamente.

Para avaliar a contribuição dos metais solubilizados a partir dos minerais foi determinada a concentração de níquel e cobre nos frascos em um ensaio sem

adição de níquel e cobre. Na Figura 29 estão representados os valores das concentrações destes metais em solução. Em comparação com os dados anteriores (Figura 28) as quantidades solubilizadas de cobre e de níquel foram bem menores, porém significativas, especialmente nos frascos com pirrotita. Em todas as condições testadas, as concentrações dos metais aumentaram progressivamente.

Analisando esses resultados, a concentração inicial teve um efeito no comportamento do metal em solução com relação ao fato de co-precipitar ou não, pois nos frascos com pentlandita a concentração de níquel caiu quando havia 1 g L^{-1} do metal na primeira semana; no entanto, no controle não se observou a perda do níquel. No caso da pirrotita, a perda dos metais só foi observada nos frascos que continham cobre e níquel adicionado (1 g L^{-1}).

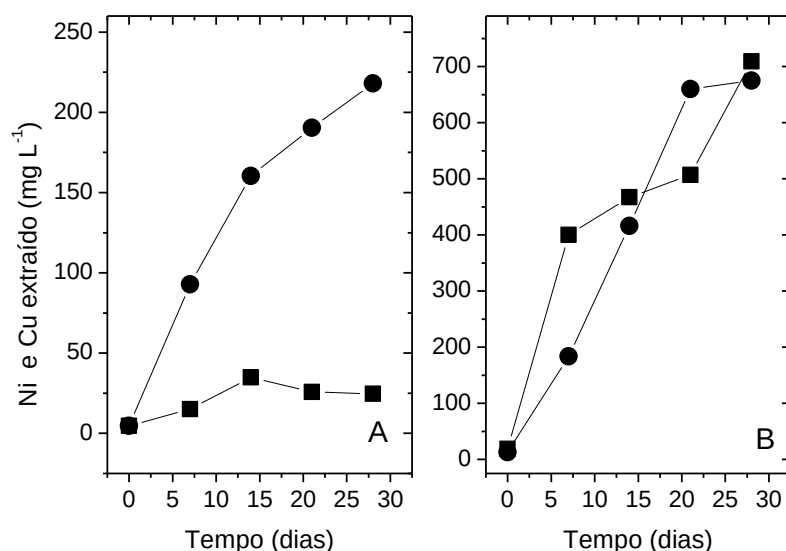


Figura 29. Extração de níquel (círculos) e cobre (quadrados) nos experimentos de perda de metais sem adição do metal. Frascos com pentlandita (A) e com pirrotita (B). Os círculos simbolizam o níquel e os quadrados simbolizam o cobre.

Um experimento parecido foi realizado por Maley; Bronswijk e Watling (2009b), mas nesse caso os testes foram realizados avaliando a adição de uma concentração conhecida de cobre, com diferentes sulfetos puros, em diferentes valores de pH e sem bactérias, por 70 horas de reação. Os resultados evidenciaram uma perda do cobre solúvel em todas as condições estudadas, especialmente nos frascos contendo sulfetos de ferro como pirita e pirrotita. Eles explicam que a baixa extração de cobre, durante a biolixiviação de minérios contendo cobre e níquel, é atribuída à interações dos íons cobre com a superfície da pirrotita.

Na Figura 30 estão apresentados os DRX dos sólidos dos ensaios de perda de metais com adição de níquel 1 g L^{-1} . Após 30 dias de ensaio com o minério de pirrotita evidenciou-se o desaparecimento dos picos da pirrotita e o aparecimento de picos de enxofre e jarosita. Os picos da calcopirita continuaram, revelando a pouca dissolução do mineral.

No caso da pentlandita (Figura 30B) os picos originais de pirrotita e pentlandita foram substituídos por picos de jarosita, vaesita-violarita $[\text{NiS}_2 - (\text{Ni,Fe})_3\text{S}_4]$, covelita (CuS) e digenita (Cu_2S). Os ensaios com adição de Cu 1 g L^{-1} , apresetaram DRX semelhantes aos descritos anteriormente para o níquel, com o que pode ser concluído que a adição dos diferentes metais não modificou os produtos das reações ocorridas nos frascos com os minérios.

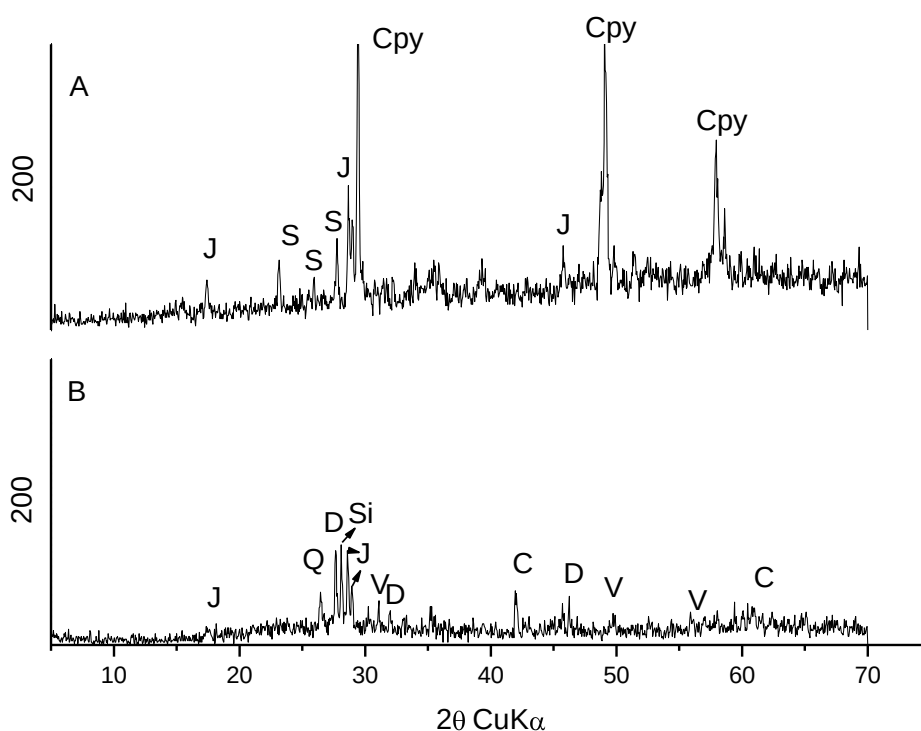


Figura 30. DRX dos sólidos após o ensaio de adição de níquel (1 g L^{-1}) com pirrotita (A) e pentlandita (B). Cpy: calcopirita; S: enxofre; V: violarita; C: cuprita; J: jarosita; Q: quartzo; Si: silicato; D: digenita.

• Biolixiviação de pentlandita 2 (cultivo misto)

Na Figura 31 estão apresentadas as curvas de pH e Eh durante a segunda série de ensaios de biolixiviação com os cultivos puros e mistos. O pH teve o mesmo

comportamento que nos ensaios anteriores (da primeira série) com um significativo consumo de ácido durante as duas primeiras semanas de ensaio. O pH final permaneceu entre 2,1 e 2,5, inclusive nos frascos com *A. thiooxidans*, nos quais era esperado uma maior produção de ácido.

O potencial redox nos frascos controle permaneceu constante em 350 mV. Em todos os frascos inoculados houve uma diminuição do potencial redox durante os 3 primeiros dias. Nos frascos com *A. thiooxidans*, o Eh esteve baixo (< 400 mV) durante 15 dias, aumentando, em seguida, superando os 500 mV até o final do ensaio.

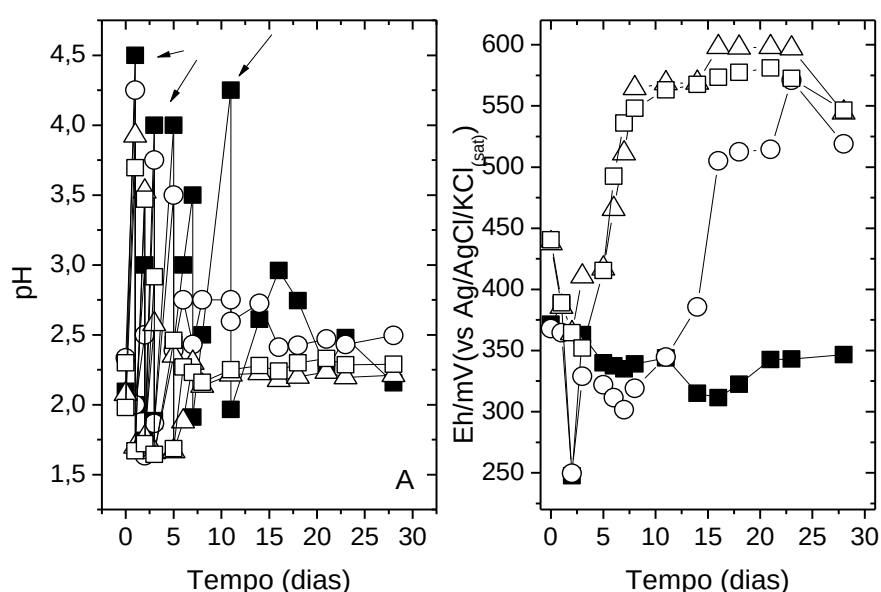
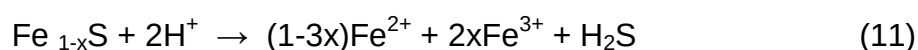
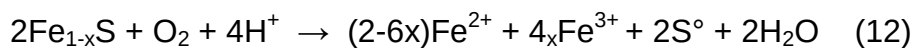


Figura 31. Variação do pH (A) e Eh (B) nos experimentos de biolixiviação de pentlandita. (círculo) *A. thiooxidans*-FG01; (quadrado) *A. ferrooxidans*-LR; (triângulo) ambas as linhagens. Frascos inoculados com símbolos vazios e frascos controle em símbolos cheios. As setas representam o momento das correções.

Já nas biolixiviações com o cultivo puro de *A. ferrooxidans* ou com o cultivo misto das duas linhagens, teve um incremento mais rápido, alcançando valores máximos de 581 e 598 mV, respectivamente.

O consumo de ácido, acompanhado da diminuição do potencial redox, são características do estágio inicial da dissolução da pirrotita e representa a combinação de reações oxidativas e não oxidativas (BHATTI et al., 1990):





Este comportamento foi, também, observado por Bhatti et al., (1990) e eles explicam que esta diminuição inicial do potencial redox indicou que a fase inicial da dissolução da pirrotita/pentlandita teve uma carência da oxidação do ferro.

As extrações de níquel e cobre durante as biolixiviações de pentlandita apresentadas na Figura 32, mostram que na primeira semana os ensaios alcançaram os valores máximos de concentração de níquel em solução nas diferentes condições exceto nos frascos com os cultivos mistos. Nesse tempo a maior concentração de níquel ocorreu nos frascos inoculados com *A. ferrooxidans*-LR com 345 mg L⁻¹. Na segunda semana todos os valores de níquel decresceram e posteriormente, aumentaram de novo.

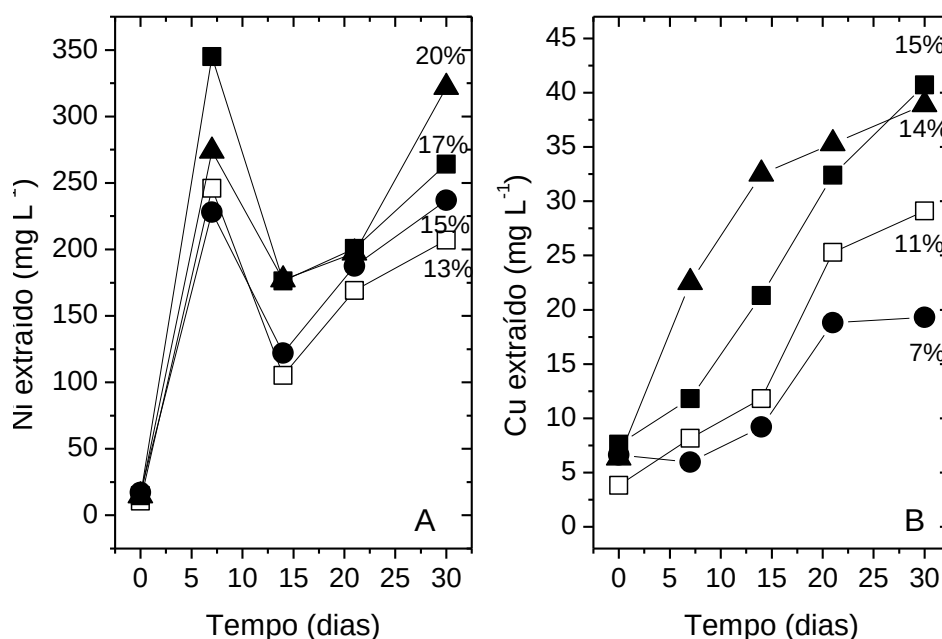


Figura 32. Extração de níquel (A) e cobre (B) nos experimentos de biolixiviação de pentlandita. (●) *A. thiooxidans*-FG01; (■) *A. ferrooxidans*-LR; (▲) ambas as linhagens. Frascos controle em símbolos vazios.

Este resultado evidencia a perda de níquel da solução como comentado anteriormente. Mas também esses resultados são diferentes em relação aos resultados obtidos nos primeiros ensaios de biolixiviação de pentlandita realizados no laboratório da Alemanha com a mesma linhagem *A. ferrooxidans*-LR. Pois na

primeira série de biolixiviação da pentlandita, as concentrações dos metais foram gradualmente crescentes.

As concentrações finais de níquel representam 13% do metal nos frascos controle; 15% nos frascos com a bactéria oxidante de enxofre; 17% com a bactéria oxidante de ferro e 20% com ambos os micro-organismos.

A solubilização do cobre incrementou gradualmente durante todo o tempo do ensaio, e a diferença com as primeiras biolixiviações (primeira série), os frascos inoculados com *A. ferrooxidans* e com o cultivo misto alcançaram valores de cobre mais altos que nos frascos não inoculados. Ao mesmo tempo encontrou-se que o cobre solubilizado com *A. thiooxidans*-FG01 foi menor que nos frascos controle. Ao finalizar os ensaios as porcentagens de cobre solubilizado foram 7, 11, 14 e 15% para os frascos com *A. thiooxidans*-FG01, controle, cultivo misto e *A. ferrooxidans*-LR, respectivamente.

A cinética de solubilização de cobre nos frascos com cultivo misto foi maior nos primeiros 10 dias de ensaio, porém os valores finais de solubilização foram muito próximos.

A concentração de ferro total em solução (Figura 33) foi outro parâmetro avaliado nestes testes. Durante os primeiros 5 dias as concentrações de ferro foram semelhantes em todos os frascos. Nos seguintes dias, nos frascos inoculados com os dois micro-organismos juntos, o valor do ferro foi constante alcançando um máximo de $2,7 \text{ g L}^{-1}$. No cultivo puro com *A. ferrooxidans*, após a primeira semana diminuiu progressivamente, passando de 2 g L^{-1} a $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Nos frascos inoculados com *A. thiooxidans*, o máximo atingido foi de $2,1 \text{ g L}^{-1}$ durante duas semanas e posteriormente, apresentou uma queda de maior magnitude na concentração de ferro em solução, chegando até $0,6 \text{ g L}^{-1}$.

Esta diminuição do ferro da solução foi causada pela precipitação do íon férrico. No caso da biolixiviação com *A. thiooxidans*-FG01, a queda tão marcada sem posterior recuperação da concentração pode ser explicada pelo fato de que a partir do dia 12, os frascos apresentaram formação de precipitados que estavam ausentes ou não foram evidentes até esse dia.

Os frascos controles apresentaram uma solubilização de ferro crescente durante todo o tempo do ensaio alcançando uma concentração muito maior que nos frascos

inoculados. Este aumento progressivo do ferro era esperado, considerando que a pirrotita (presente na amostra de pentlandita) é rapidamente oxidada em meio ácido gerando Fe^{2+} e H_2S de acordo com a equação 11 (BHATTI et al., 1990; BELZILE et al., 2004):

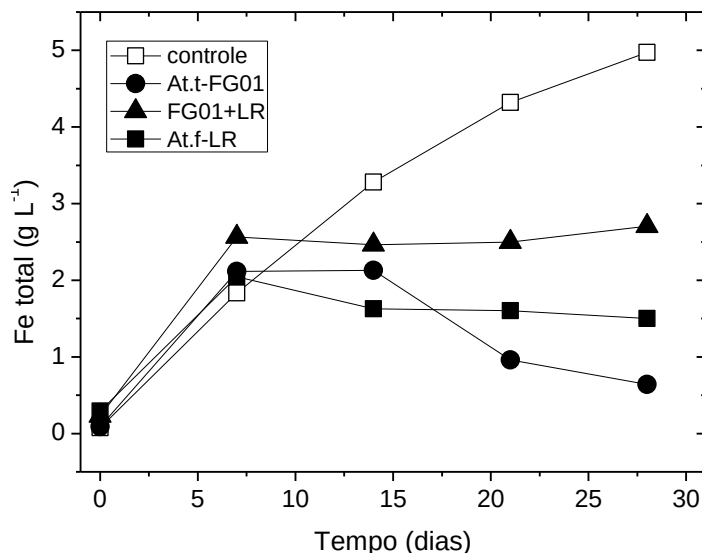


Figura 33. Solubilização de ferro total nos experimentos de biolixiviação de pentlandita. (●) *A. thiooxidans*-FG01; (■) *A. ferrooxidans*-LR; (▲) ambas as linhagens. Frascos controle em símbolos vazios.

Uma significativa quantidade de ferro total foi liberada na solução a partir dos minerais durante o processo de lixiviação e foi evidente que uma grande parte do ferro dissolvido se hidrolisou em seguida e precipitou como oxi-hidroxidos ou oxihidroxí-sulfatos férricos. A superfície da pirrotita oxida muito mais rapidamente que a superfície da pentlandita, mas é na superfície desta última que ocorrem as reações de formação de violarita, sulfatos de níquel e goetita. Uma contínua oxidação levaria ao consumo da violarita com acúmulo de sulfato de níquel na camada da goetita (LEGRAND; BANCROFT; NESBITT, 2005).

Na Figura 34 estão apresentados os difratogramas dos resíduos sólidos obtidos após 30 dias de biolixiviação com os cultivos puros e mistos de *A. ferrooxidans*-LR e *A. thiooxidans*-FG01. No resíduo controle não houve alteração em relação ao difratograma da amostra original. Nos resíduos sólidos dos frascos inoculados foi observado o desaparecimento de alguns dos picos previamente identificados na amostra original, e ao aparecimento de novos picos correspondentes a novas fases mineralógicas tais como jarosita e violarita $[(\text{Ni},\text{Fe})_3\text{S}_4]$. Outras fases mineralógicas como covelita (CuS), digenita (Cu_2S) e

cubanita (CuFe_2S_3) coincidem em alguns picos de menor intensidade, como também tenorita (Cu_2O) e cuprita (CuO) são muito próximos aos picos de magnesioferrita ($\text{MgFe}^{3+}_2\text{O}_4$).

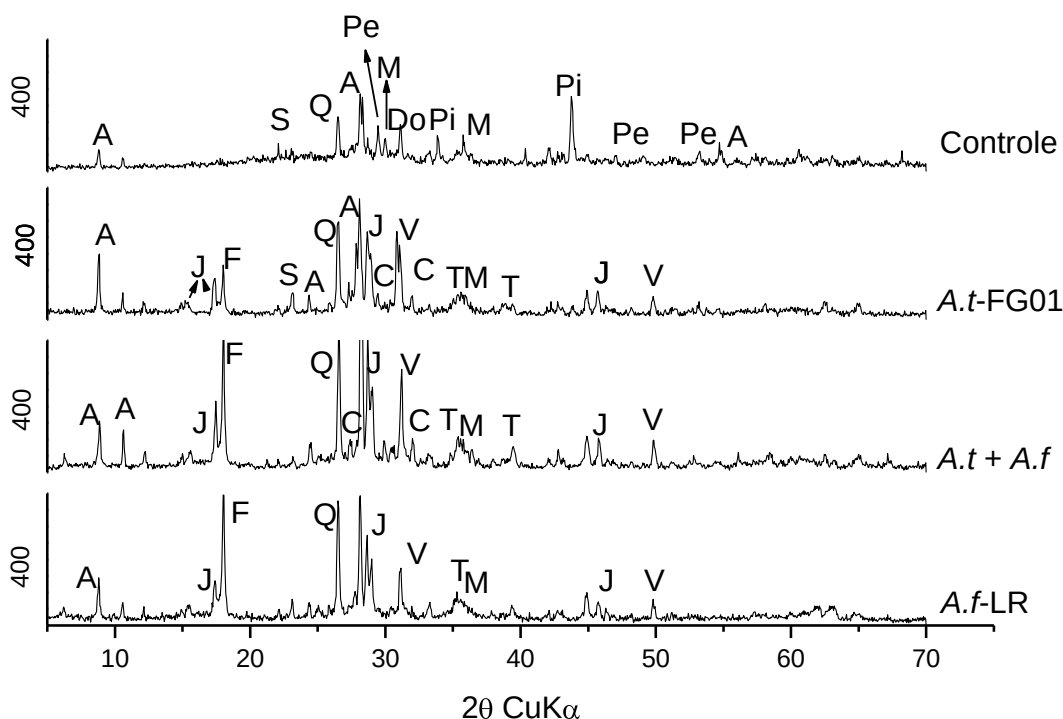


Figura 34. DRX dos resíduos sólidos após 30 dias de lixiviação biológica e abiótica. Pe: pentlandita; Pi: pirrotita; Q: quartzo; M: magnesioferrita; Do: dolomita; S: enxofre; A: alumino-silicatos; C: covelita; Fe: sulfato de ferro; J: jarosita; V: violarita; T: tenorita.

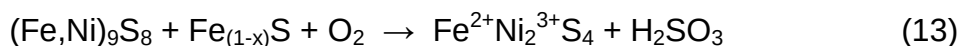
Estes resultados são significativamente diferentes daqueles DRX obtidos a partir dos sólidos da biolixiviação da primeira série, nos quais foi realizado o pré-tratamento do minério com lavagem e esterilização.

Segundo Maley, Bronswijk, Watling (2009) baixas recuperações de cobre, durante (bio)lixiviação de minérios complexos de cobre-níquel, ricos em pirrotita, são atribuídas às interações de íons cobre com a superfície da pirrotita. O cobre solúvel vai precipitar como sulfeto de cobre, principalmente covelita. Nesta tese, os DRX dos produtos da oxidação da pentlandita rica em pirrotita, revelaram a formação não só da covelita como também da digenita, outro sulfeto de cobre, coincidindo com os resultados encontrados pelos autores antes citados.

Mas os produtos da oxidação da pirrotita, rica em calcopirita, utilizada neste estudo, não foram os mesmos que para o outro minério. Não houve evidência da formação de sulfetos de cobre, apesar de que reações diretas entre íons cúpricos e calcopirita, para formar sulfetos secundários de cobre, são conhecidas, ocorrendo muito lentamente, levando a conclusão que os produtos das reações dependem, em grande parte, das características mineralógicas do minério que acompanha a pirrotita.

O fato mais relevante a destacar é a formação de sulfetos como a violarita. Uma rota de formação desse mineral é pela oxidação de sulfetos primários em um corpo mineralizado de sulfetos de níquel (CHAMBERALIN; DUNN, 1999).

A violarita é um membro do grupo de sulfetos-spinel, M_3S_4 (onde $M = Fe, Ni, Co, Cu, Cr$) (CRAIG, 1971). Seu processo de formação envolve oxidação de Ni^{2+} e Fe^{2+} os quais estão contidos dentro do conjunto pentlandita-pirrotita-pirita. Portanto, a violarita é produzida através da oxidação de ambos os sulfetos: pentlandita e pirrotita, com a seguinte reação:



A contínua oxidação da violarita leva a uma substituição por goetita com o níquel permanecendo como impureza dentro da goetita ou hematita. Segundo Legrand, Bancroft e Nesbitt (2005) a primeira resposta da pentlandita à oxidação é, consequentemente, produzir uma fina camada de goetita e uma camada mais fina ainda de violarita sob a goetita, ficando, assim, protegida da oxidação.

Além disso, a presença de pirrotita junto com a pentlandita tem um efeito catalisador na formação de violarita, consumindo íons níquel liberados da pentlandita e formando uma fase secundária de violarita. O papel catalítico da pirrotita na formação de violarita depende da forma física do mineral, a qual estimula as reações de alteração da pentlandita quando ambos os minerais são intercrescidos em uma escala muito fina (XIA et al., 2007).

3.3 Isolamento de micro-organismos a partir de rejeitos minerais

O crescimento de micro-organismos oxidantes de ferro (provenientes de cada rejeito) foi evidenciado em cada meio T&K (pH 1,8) pela mudança da cor após 3-4 dias. Em repiques posteriores em meio fresco, ocorreram crescimentos semelhantes à linhagem controle, *A. ferrooxidans*-LR (LR), em cerca de 48 horas.

Os cultivos sólidos, a partir dos cultivos enriquecidos, apresentaram colônias com diferentes morfologias (descritas na Tabela 15) e algumas delas apresentaram morfologias semelhantes à linhagem LR.

A maioria dos artigos reportam o isolamento de bactérias quimiolitotróficas oxidantes de ferro em meio sólido Feo descrito por Johnson (1995) no qual é adicionado caldo triptona e um inóculo de um microorganismo heterotrófico (*Acidiphilum* sp) a pH 2,5 com a técnica chamada de dupla camada (overlay), pois a rápida hidrólise da agarose em valores ácidos de pH ($\leq 2,0$) inibe totalmente o crescimento das bactérias acidófilas oxidantes de ferro.

Nosso trabalho avaliou o meio sólido T&K (com a mesma composição do meio líquido) mais agarose em pH 1,8, modificando as concentrações dos sais, especialmente de fosfato. Esse meio de cultivo forneceu um bom e rápido crescimento bacteriano (Tabela 15) sem precisar do inóculo heterotrófico nem do caldo de triptona, como descrito por Johnson (1995). Naqueles cultivos com menor quantidade de fosfato obteve-se um crescimento de colônias mais rápido, em cerca de 7 dias.

Tabela 15. Descrição das colônias crescidas em meio sólido a partir dos diferentes rejeitos.

Material de origem	Nome	Morfologia da colônia
Lama (L)	L-1 (Figura 44A)	Colônias circulares de 3 cores concêntricas, escuras, de tamanho médio (5 mm).
	L-2 (Figura 44B-45B)	Colônias irregulares tipo estrela, de cor marrom escuro, (3 mm).
Escória (ESC)	ESC (Figura 44C)	Colônias circulares de 3 cores concêntricas, claras, (10 mm)
Rejeito total (RT)	RT-1 (Figura 44D)	Colônias grandes de 2 cores tipo ovo frito (8 mm).
	RT-2 (Figura 44D-45A)	Colônias irregulares tipo estrela, de cor marrom escuro, (5 mm).
Rejeito não magnético (RNM) (Figura5)	RNM-1 (Figura 44E-45C)	Colônias grandes de 2 cores, irregulares (10 mm).
	RNM-2 (Figura 44E)	Colônias irregulares tipo estrela, de cor marrom escuro, (5 mm).
Linhagem de coleção - LR	LR (Figura 44F-45E)	Colônias pequenas (1-1,5 mm) marrom escuro, homogêneas.

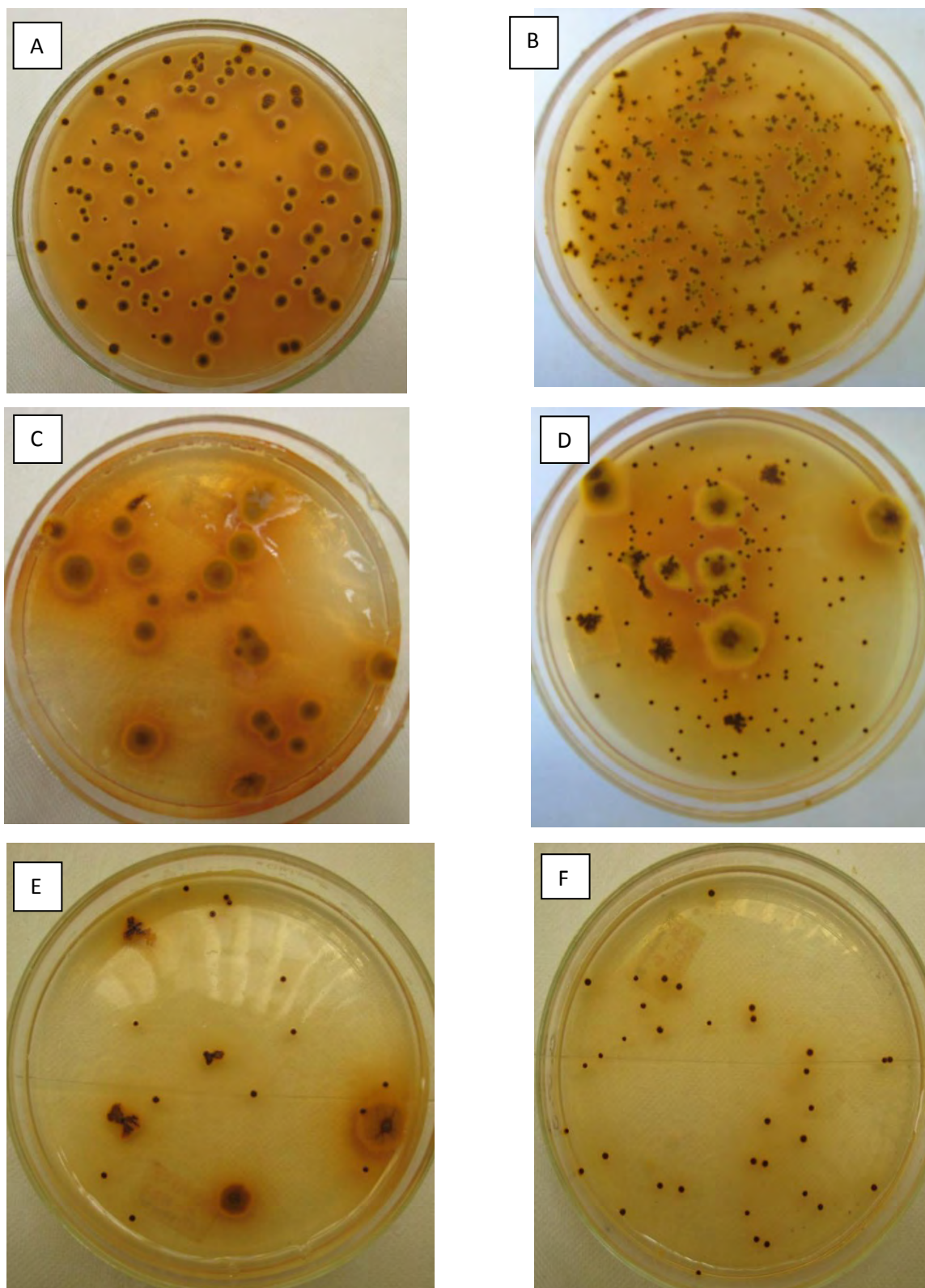


Figura 35. Colônias crescidas em meio T&K pH 1,8-agarose a partir dos diferentes rejeitos: lama (A e B), escória (C), rejeito total (D) e rejeito não magnético (E). Também as colônias da linhagem controle *A. ferrooxidans*-LR (F).

Na publicação de Johnson, Okibe e Hallberg (2005) encontra-se uma descrição da morfologia das colônias de micro-organismos quimiolitotróficos oxidantes de ferro (Tabela 16). As colônias obtidas, a partir dos isolados de lama e escória, são compatíveis com aquela descrita para *A. ferrooxidans* e duas delas apresentam uma morfologia de ovo frito (Figuras 35C, D, e 36B) como assinalada na tabela 16 para *Ferrimicrobium spp.*

Devido à diversidade de morfologias das colônias obtidas, sugeriu-se a possibilidade de que entre os isolados pudesse haver mais de uma espécie bacteriana. No entanto, os resultados dos testes de oxidação do enxofre, bem como da morfologia observada com coloração de Gram foi possível concluir que os micro-organismos isolados não são do gênero *Leptospirillum*, *Ferrimicrobium* ou *Ferroplasma* e, por tanto, se aproximam mais do gênero de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

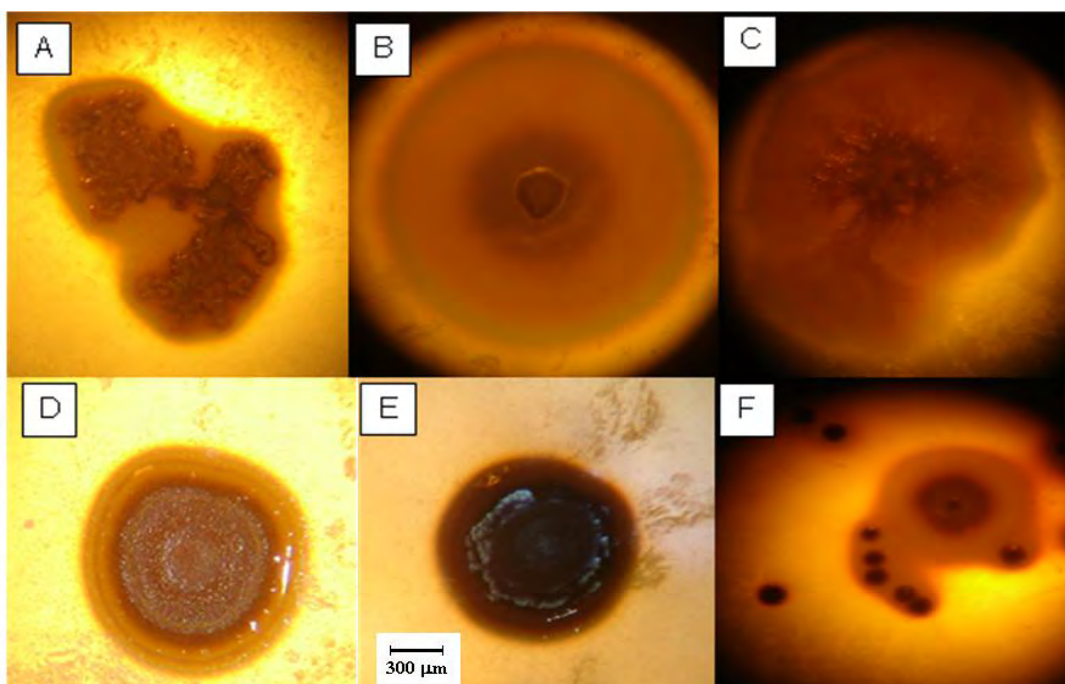


Figura 36. Fotografias em detalhe das colônias obtidas a partir dos cultivos de ferro ferroso em meio sólido T&K-agarose. A: colônia ramificada obtida nos cultivos de RT e RNM; B: colônia circular de 3 cores obtida nos cultivos de lama; C: colônia grande irregular obtida dos cultivos de RT e RNM; D: colônia pequena circular obtida em quase todos os cultivos exceto escória; E: colônia de LR; F: colônias misturadas com morfologia semelhante às descritas para B e D.

Tabela 16. Identificação presumível de micro-organismos acidófilos oxidantes de ferro baseada na morfologia de colônia (JOHNSON; OKIBE; HALLBERG., 2005).

Morfologia das Colônias	Possível identificação
Mesófilos em meio Feo	
Pequena a grande; laranja-marrom; forma variável (inteira a irregular)	<i>At ferrooxidans</i>
Pequena (às vezes muito pequena); laranja; forma inteira.	<i>T.ferrooxidans</i> – m-1
Pequena (às vezes muito pequena); laranja; forma inteira.	<i>Leptospirillum spp</i>
Forma de ovo frito	<i>Ferrimicrobium spp</i>
Termófilos Moderados em meio Feo	
Pequena (às vezes muito pequena); laranja; forma inteira.	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>
Pequena (às vezes muito pequena); laranja; forma inteira.	<i>Ferroplasma spp</i>

Schrader e Holmes (1988) descrevem a habilidade de *A. ferrooxidans* em modificar a morfologia de sua colônia se for utilizado outro meio de cultivo baseado em uma mistura de ferro e tiosulfato. Neste caso este aparecimento de uma colônia de uma morfologia distinta é inerente à célula, indicando uma base genética e que pode representar uma forma importante para a geração de diversidade fenotípica e genética no ambiente, o qual poderia explicar a capacidade de *A. ferrooxidans* em se adaptar às mudanças externas, tais como, maior acidez ou altas concentrações de metais. Porém, esta mudança de morfologia de colônias descritas por Schrader e Holmes (1988), está baseada na composição do meio sólido contendo tiosulfato em maior ou menor quantidade que o ferro. Sendo assim, é compreensível que a bactéria mude a morfologia de sua colônia dependendo do substrato em que se encontra (ROHWERDER et al., 2003; GHOURI; OKIBE; JOHNSON, 2007). Em nosso trabalho, as diferentes morfologias se apresentaram no mesmo meio sólido e somente com íon ferroso.

Manning (1975), em estudos com isolados bacterianos a partir de drenagens ácidas de minas, encontrou também diferentes morfologias de colônias em um mesmo meio sólido contendo ferro. A morfologia de colônia mais freqüente em seus resultados foi, geralmente, circular com borda inteira, que mudava de cor de amarelo a marrom escuro, com superfície lisa e uma protuberância no centro. Ele também assinalou que algumas colônias lisas desenvolveram setores que emanavam desde um ponto da colônia, às vezes em forma de ventilador. Estes setores podiam se alongar como ondas de crescimento que se estendiam de um lado do setor a outro, e este alongamento dos setores podia englobar completamente a colônia.

Outro aspecto do crescimento secundário de algumas colônias é o crescimento em forma de extensão branca fina que vem de uma porção da colônia. Também podem ser encontradas colônias em forma de estrela, com 4 a 5 braços, ou lobuladas ou radiadas contendo 4 a 6 braços, onde o crescimento parte do centro da colônia. Uma quinta morfologia de colônia é descrita como de irregular e ampla, disseminada finamente, que muda de cor passando de quase transparente até marrom escuro à medida que a massa celular vai envelhecendo (MANNING, 1975).

As bactérias isoladas neste trabalho apresentaram morfologia de colônias semelhantes às aquelas descritas por Manning (1975) para micro-organismos oxidantes de ferro. Neste artigo o autor expõe que é difícil especular o que inicia o rápido crescimento secundário de uma colônia.

Posteriormente a biomassa de cada isolado (obtida de forma semelhante à técnica de determinação de proteína a partir de 1L de cultivo bacteriano) foi enviada ao laboratório de Microbiologia do Solo da USP-ESALQ para realizar uma análise com a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient gel electrophoresis* - eletroforese em gel de gradiente desnaturante) para tentar elucidar se estes isolados correspondiam a diferentes espécies ou linhagens já que apresentavam diferenças morfológicas em suas colônias. Neste caso foi utilizado o protocolo com o kit FastDNA^R de reagentes da marca MPBIO.

Com esta técnica obteve-se bandas de rDNA dos isolados (Figura 37, linhas 4 a 10) semelhantes às bandas das linhagens de coleção (*A. ferrooxidans* LR e ATCC-23270) (Figura 39, linhas 1 a 3)

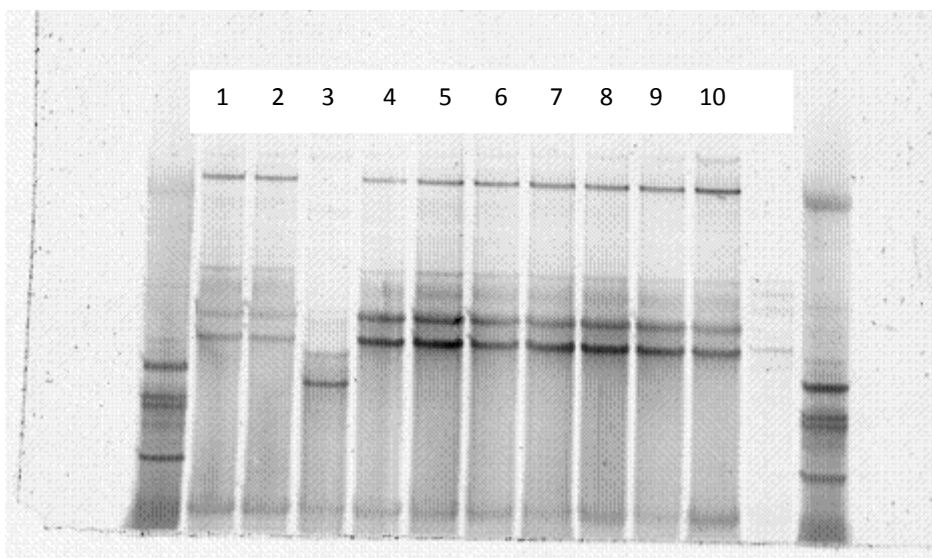


Figura 37. Produtos da amplificação do DNA em gel de electroferese com a técnica de DGGE. *A. ferrooxidans*-LR, linha 1; *A. ferrooxidans*-ATTCC-23270, linha 2; *A. thiooxidans*-FG01, linha 3; RT 1, linha 4; RT 2, linha 5; Lama 1, linha 6; ESC, linha 7; RNM1, linha 8; RNM2, linha 9 e RNM3, linha 10. Linhas externas correspondem ao marcador.

Os resultados da técnica de DGGE não revelaram polimorfismo de espécie nem de linhagem, embora alguns autores tenham reportado uma considerável heterogeneidade nas linhagens de *A. ferrooxidans*. Karavaiko et al., (2003), por exemplo, publicaram os resultados de estudos filogenéticos realizados em 25 linhagens de *A. ferrooxidans*. Eles concluíram que esta espécie bacteriana é classificada ao menos em dois níveis de heterogeneidade filogenética e esta particularidade, indistinguível fenotipicamente, sugere a ocorrência de processos microevolutivos em diferentes nichos ecológicos.

Adicionalmente foi realizada a coloração de Gram a fim de se observar a morfologia das células microbianas de cada colônia. Em todas as amostras foram encontrados bacilos Gram negativos.

A partir de colônias puras realizou-se o enriquecimento em meio líquido T&K com 120 mmol L⁻¹ de Fe²⁺ e em meio 9K-S° para diferenciação entre bactérias oxidantes de ferro e de enxofre, ou somente oxidantes de ferro. Todas as linhagens isoladas tiveram a capacidade de crescer utilizando ambos os substratos como fonte de energia.

A partir do crescimento microbiano em meio sólido, repicou-se uma colônia de

cada morfologia em meio líquido fresco com íon ferroso e após seu crescimento foi repicado duas vezes mais para enriquecer o cultivo e prosseguir com os testes de consumo de oxigênio, crescimento em alta acidez e resistência a metais.

- **Consumo de Oxigênio**

Os testes de respirometria foram realizados em três diferentes temperaturas com o objetivo de avaliar diferenças fisiológicas nas linhagens isoladas. Estas linhagens testadas foram RT1 e RT2, RNM1, RNM2 e RNM3, ESC e as de coleção A.f-LR e ATTCC-23270. As outras bactérias isoladas não foram testadas porque não foram obtidas massas celulares suficientes ou houve contaminação do cultivo.

Em todas as temperaturas (Figura 40) RNM 2 foi a linhagem que consumiu menos oxigênio. ESC e RNM 3 obtiveram um consumo ligeiramente melhor a 35°C que a 30°C enquanto que RT1 e LR demonstraram comportamento distinto, respirando melhor a 30°C do que a 35°C. A 45°C a maioria das cepas, exceto ESC e RNM 2, diminuíram muito sua capacidade de respirar o íon ferroso. LR a 45°C teve uma curva um pouco incomum.

Nos gráficos com as curvas de consumo de oxigênio pelas bactérias isoladas a diferentes temperaturas pode se observar que algumas delas têm um comportamento parecido com as linhagens de coleção. Algumas, inclusive, tiveram um consumo mais rápido a 30°C em comparação com as linhagens de coleção, e outras a 35°C.

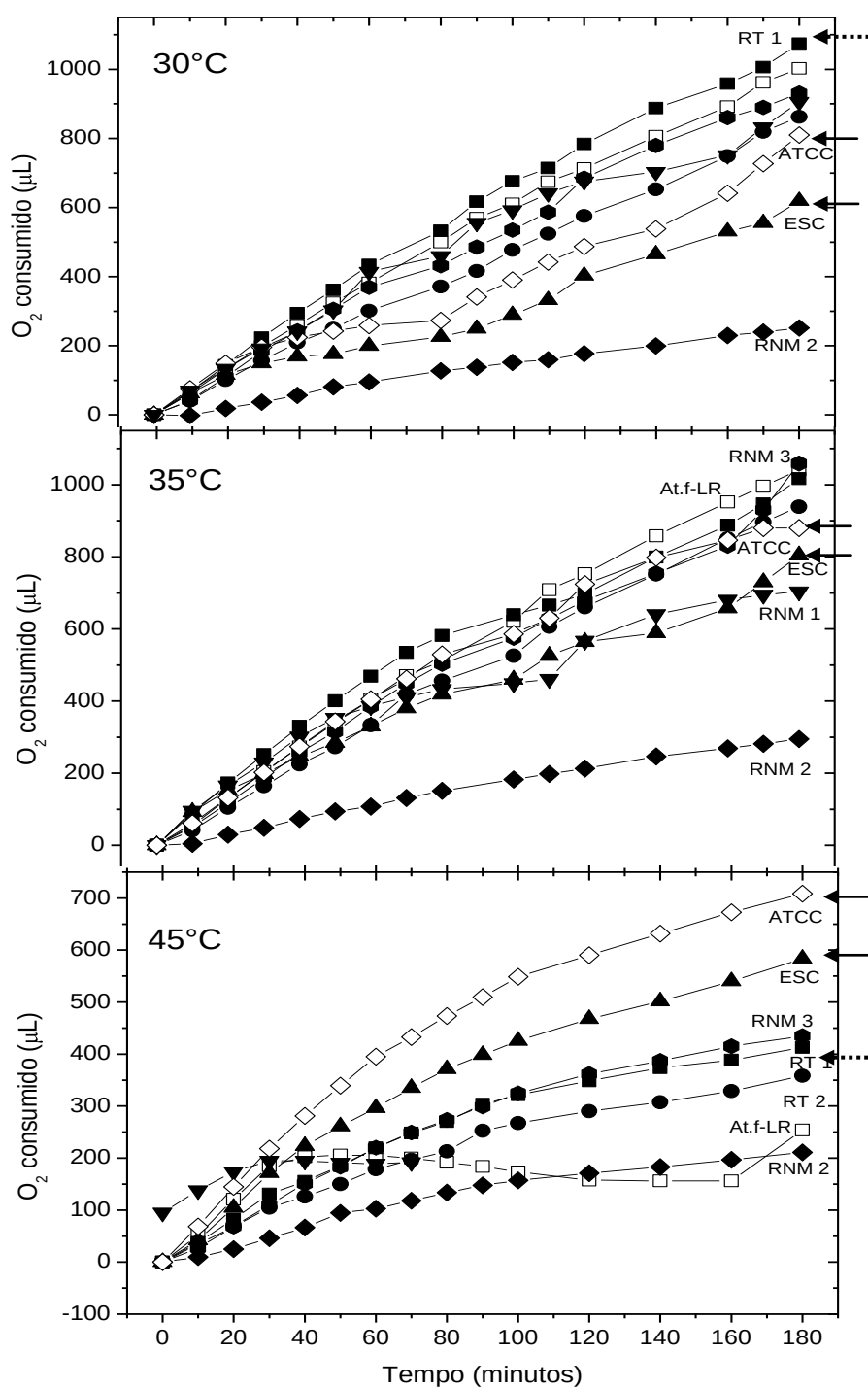


Figura 38. Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com linhagens de coleção (LR e ATCC) a diferentes temperaturas (30, 35 e 45°C). (□) At.f-LR; (●) RT2; (◆) RT1; (▼) RNM1; (▲) RNM2; (●) ESC; (*) RNM3; (◇) ATCC. Proteína de cada linhagem: 300 μg .

Em analisando a Figura 38 pode ser observado que a variação de temperatura de 30°C a 45°C não alterou, significativamente, o consumo de oxigênio

das linhagens ESC e ATCC-23270. Diferentemente, a linhagem RT1 teve um consumo final de O₂ consideravelmente menor quando a temperatura subiu a 45°C alcançando apenas 30% do consumo obtido a 30°C.

- **Crescimento em meio ácido**

Na Figura 39 se encontram as curvas de crescimento das células estudadas avaliando sua capacidade de oxidar íon ferroso em valores baixos de pH (1,4 - 1,8 - 2,2). Pode observar-se que nos quatro valores de pH a maioria das células crescem bem conseguindo oxidar o ferro durante as primeiras 72 horas.

De maneira particular, em pH 2,2 a linhagem RT2 foi a única que apresentou uma forte inibição em seu crescimento. Em pH 1,8 as linhagens ESC e RNM2 mostraram um evidente atraso na oxidação do íon ferroso em relação às outras cepas; RT1e RT2, ao contrário, são as linhagens que obtiveram uma fase exponencial mais rápida.

Em pH 1,4, as linhagens Lama1 e LR demoraram 24 horas a mais para alcançar entre 80-100% de oxidação da fonte de energia. Nesta condição também, a linhagem RT 2 é inibida novamente.

O crescimento em meio ácido demonstrou a característica acidófila das linhagens microbianas avaliadas. Os micro-organismos acidófilos, de forma similar aos neutrófilos, requerem um pH intracelular próximo a neutralidade. No entanto, os acidófilos toleram gradientes de pH ($\Delta pH = pH_{in} - pH_{ex}$) de várias ordens de magnitude maior que os outros micro-organismos. Este gradiente, através da membrana citoplasmática, está intrinsecamente ligado à bioenergética das células (BAKER-AUSTIN; DOPSON, 2007). A acidez do meio é requerida para esses micro-organismos, já que baixos valores de pH favorecem o ciclo do íon ferroso como doador de elétrons sob condições aeróbicas e do íon férrico em anaerobiose.

As bactérias acidófilas representam um grupo de micro-organismos ecológica e economicamente importante. Duas válidas razões para isto são i) os ciclos biogeoquímicos e seu impacto ambiental e ii) processos biotecnológicos sustentáveis, além de serem fontes de produtos gênicos como enzimas ácido-

estáveis com aplicações industriais (BAKER-AUSTIN; DOPSON, 2007).

Apesar de que todos os valores de pH testados suportaram o crescimento bacteriano, deve ser considerado, também, que o pH 1,8 permite, ainda, a formação de precipitados de sulfatos de ferro do tipo jarosita, o qual não é desejável em bioprocessos. A tolerância e o crescimento a valores mais baixos de pH evitaria a geração destes precipitados pois nestes valores a solubilidade do íon férrico é maior (RAWLINGS, 2005).

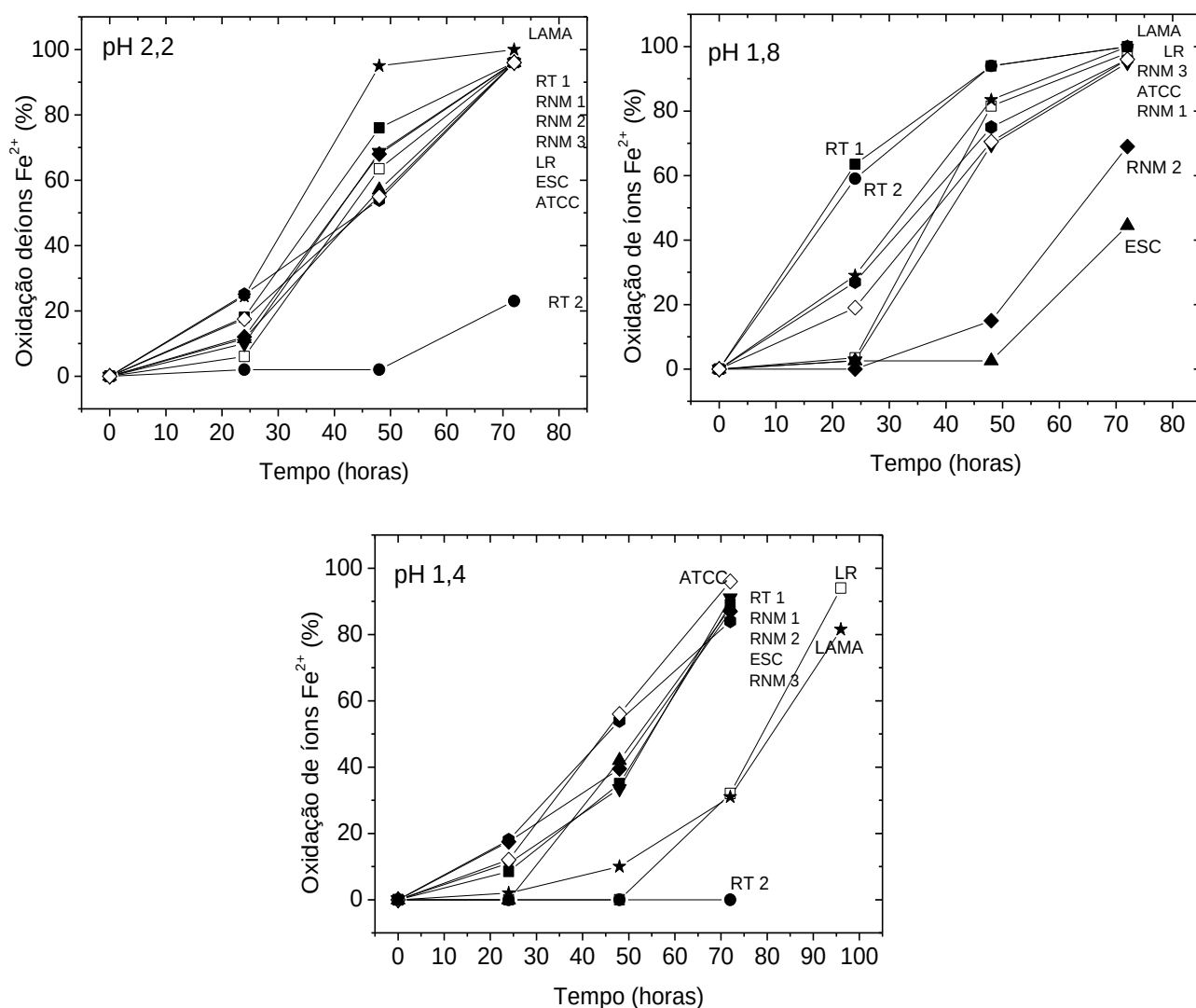


Figura 39. Porcentagem de oxidação de ferro ferroso em diferentes valores de pH (2,2 – 1,8 – 1,4 – 1,3) pelas bactérias isoladas e as de coleção. (□) LR; (*) Lama1; (■) RT1; (●) RT2; (▼) RNM1; (◆) RNM2; (▲) ESC; (●) RNM3; (◇) ATCC

• Oxidação de substratos

Para quase todas as linhagens testadas, a lama foi o substrato que menos consumo de oxigênio proporcionou chegando só entre 20 e 60 μL durante 3 horas de respirometria. Neste experimento a linhagem RNM1 conseguiu consumir muito mais oxigênio que as outras linhagens alcançando até 150 μL (Figura 40).

A escória moída como substrato na respirometria apresentou valores maiores de consumo de oxigênio para as cepas LR, LAMA e RNM3 chegando a 100 e 150 μL . As outras linhagens consumiram também entre 20 e 60 μL de oxigênio (Figura 40).

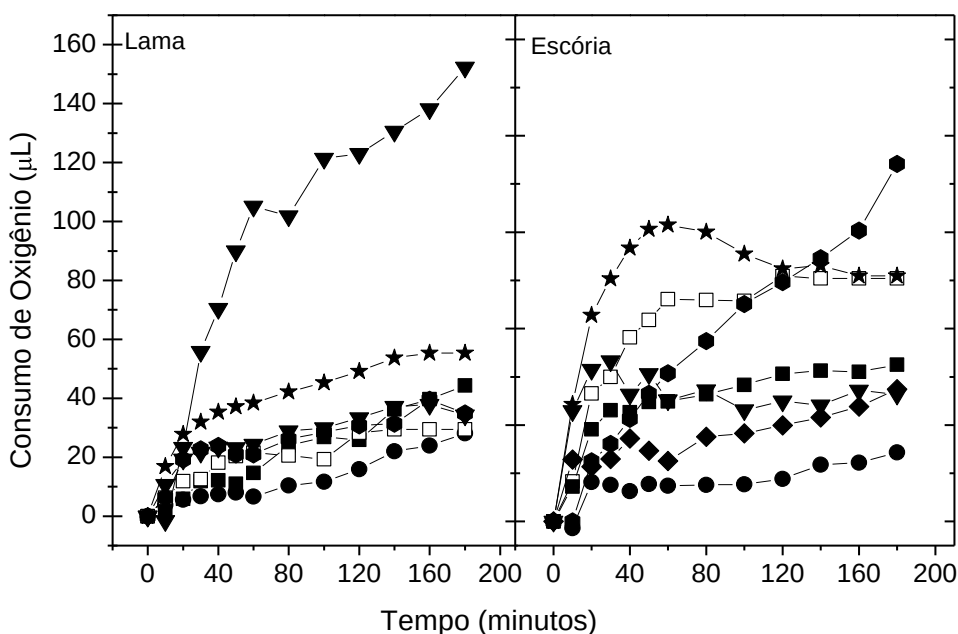


Figura 40. Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com a linhagem de coleção *A. ferrooxidans* – LR em lama ou escória como substratos. (□) LR; (■) RT1; (●) RT2; (▼) RNM1; (◆) RNM2; (●) RNM3; (*) LAMA.

O consumo de oxigênio a partir da oxidação de sulfetos está mostrado na Figura 41. A oxidação da pentlandita foi muito melhor que nos outros substratos, obtendo-se valores entre 200 e 500 μL de oxigênio. Com os três substratos encontrou-se que não houve uniformidade na hora de oxidar os diferentes sulfetos já que para cada um deles uma linhagem bacteriana diferente conseguiu consumir o valor mais alto de oxigênio. Assim RNM1 foi melhor para a pentlandita, LR para pirita e LAMA para calcopirita. No caso particular da calcopirita encontrou-se que duas

linhagens isoladas (LAMA e RT2) consumiram mais oxigênio que a cepa de coleção LR.

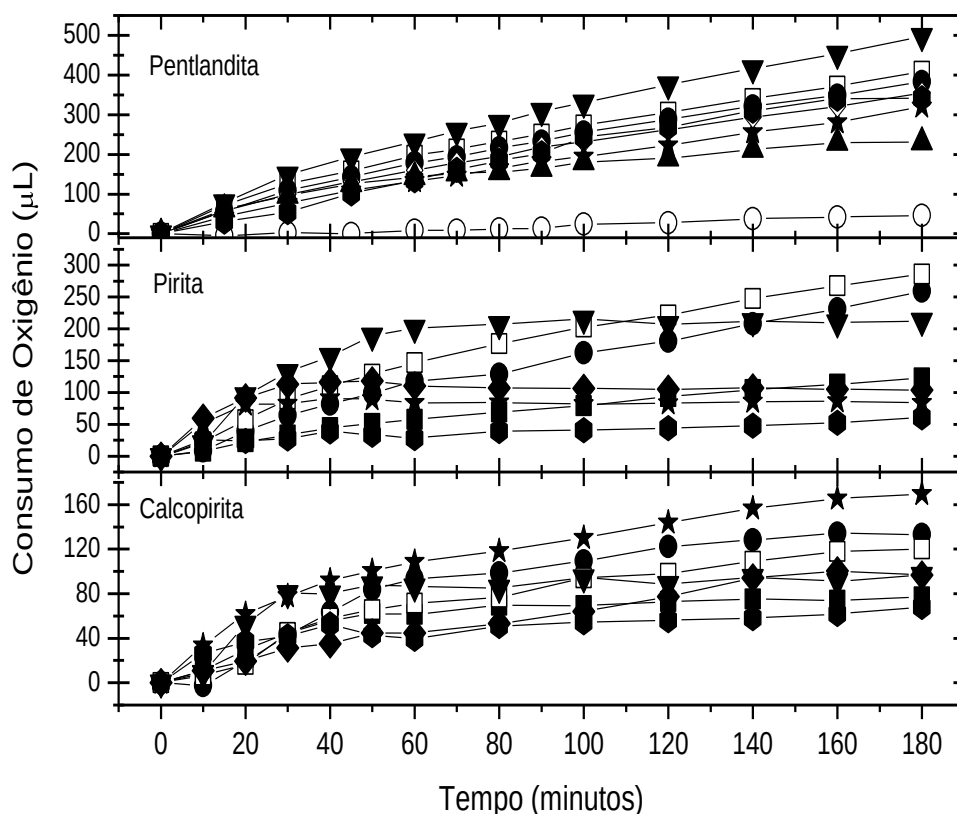


Figura 41. Consumo de oxigênio das linhagens isoladas comparadas com a linhagem de coleção *A. ferrooxidans* – LR em pentlandita, pirita ou calcopirita como substratos. (□) LR; (■) RT1; (●) RT2; (▼) RNM1; (◆) RNM2; (●) RNM3; (*) LAMA; (○) controle abiótico.

• Testes de resistência a metais

Nas Figuras 42 a 44 se encontram as curvas de oxidação de íon ferroso pelas bactérias isoladas em presença de diferentes concentrações de níquel, cobalto ou cobre comparando-as com a linhagem de *A. ferrooxidans*-LR.

Micro-organismos habitando drenagens ácidas de minas ou ambientes de biolixiviação encontram considerável pressão seletiva para desenvolver mecanismos de resistência a íons metálicos, favorecendo-os com uma vantagem seletiva e competitiva. Como resultado, a efetividade de diferentes mecanismos de resistência a metais pode desempenhar um papel significativo afetando as características funcionais e estruturais das comunidades microbianas dos ambientes ácidos

(DOPSON et al., 2003). A variabilidade de linhagens de *A. ferrooxidans* é uma característica que tem sido bem documentada (FRATTINI; LEDUC; FERRONI, 2000; KARAVAIKO et al., 2003; WALTENBURY; LEDUC; FERRONI, 2005) e é esperado que diferentes linhagens desta bactéria poderão diferir em sua resposta a condições de stress como no caso de altas concentrações de metais. Esta particularidade será avaliada, a seguir, com cada linhagem estudada.

Dentre os micro-organismos acidófilos *A. ferrooxidans* é uma das bactérias com maior habilidade em resistir altas concentrações de metais. Em muitas bactérias tem sido evidenciada a resistência a metais conferida por plasmídeos e muitos autores tem postulado que esta resistência em *A. ferrooxidans* esteja ligada a plasmídeos também. Crisholm, Leduc e Ferroni (1998) encontraram isolados com e sem plasmídeos. Através da transformação de células de *Escherichia coli* com os plasmídeos dos isolados de *A. ferrooxidans*, estes autores encontraram que estes plasmídeos não conferiram resistência a cobre às células de *E.coli* crescidas em meio com 2 mM de Cu^{2+} , e inclusive um dos plasmídeos recombinantes parece ter diminuído a tolerância a cobre em *E.coli*.

De acordo com Rawlings (2001 e 2005), vários plasmídeos têm sido encontrados e estudados em linhagens de *A. ferrooxidans*. Este autor também expõe que os níveis de resistência mostram considerável variação de linhagem e por tanto a resistência é devida à combinação de genes que estão presentes no cromossoma da maioria dos isolados e genes móveis adquiridos por um isolado específico. Um exemplo de genes presentes no cromossoma da maioria das bactérias são os genes de efluxo para arsênico, cobre, prata, cádmio e alguns outros cátions. Um exemplo de genes móveis para resistência de metais ou metalóides que poderiam estar em certos isolados, mas não em outros da mesma espécie, são os genes presentes nos plasmídeos, como no caso da resistência a mercúrio, arsênico e outros elementos.

- **Resistência a níquel**

A resistência a níquel, ou sua inibição, no crescimento e atividade de *A. ferrooxidans* tem sido reportada por muitos autores (FELÍCIO; GARCIA; NOVO, 2003; CABRERA; GOMEZ; CANTERO, 2005; RAWILINGS, 2005) e os resultados indicam uma grande tolerância a este metal, mas ao mesmo tempo, uma grande

variação entre linhagens, por exemplo desde 0,1 mmol L⁻¹ até 850 mmol L⁻¹ (~1,7 – 50 g L⁻¹) (WATLING, 2008).

Em nosso trabalho as linhagens estudadas apresentaram diferentes respostas em sua resistência a metais. Estas são discutidas a seguir (Figura 42).

- **LR** apresentou uma pequena inibição na oxidação de íon ferroso quando crescida nas concentrações de 12 e 24 g L⁻¹ (24 a 48 horas a mais para atingir 100% de oxidação), enquanto em concentrações menores conseguiu oxidar 100% do íon ferroso em 72 horas. O interessante deste comportamento é que a inibição não aconteceu na fase lag do crescimento, mas sim na exponencial. Novo *et al.*, 2000, estudaram a tolerância de *A. ferrooxidans*-LR em diferentes concentrações de metais e neste caso, esta linhagem cresceu em uma concentração de 600 mM (~36 g L⁻¹) de níquel oxidando o total de Fe²⁺ em 150 horas mas com uma inibição na fase lag de quase 100 horas.
- **RNM1** não teve efeito inibitório na oxidação do ferro em presença de níquel e com todas as concentrações ≤ 12 g L⁻¹, 100 % de ferro foi oxidado em 72 horas. Na presença de 24 g L⁻¹ de níquel a fase lag demorou 2 dias e ao final das 72 horas teve 80% do ferro oxidado.
- **RNM2** teve um comportamento muito particular porque i) em 0 e 3 g L⁻¹ de níquel não teve fase lag, mas as fases exponenciais foram de diferentes inclinações, chegando em ambos os casos aos 100% de oxidação do ferro em 3 dias; ii) em 6 e 12 g L⁻¹ de níquel apresentaram o mesmo comportamento, com uma inibição nas primeiras 24 horas de crescimento, alcançando 90% de íon ferroso oxidado após 72 horas; iii) na presença de 24 g L⁻¹ de Ni a curva apresentou, também, uma fase lag de 24 horas, no entanto a fase exponencial foi muito mais rápida que nas 2 concentrações anteriores e depois de 48 horas estava quase igual ao controle.
- **RT1** crescendo em concentrações ≤ 12 g L⁻¹ de níquel chegou a oxidar 100% de íon ferroso em 72 horas e sem fase lag, mas nestas concentrações a atividade oxidante foi mais rápida que na ausência de níquel. A presença de íons de níquel parece ter tido um efeito positivo para esta linhagem com relação à oxidação do substrato. Com 24 g L⁻¹ de Ni foi observado um atraso de 24 horas a mais para oxidar 90 % do íon ferroso com uma inibição inicial nos primeiros 2 dias.
- **RT2** teve uma oxidação total do ferro em 3 dias com as concentrações de 0 a 12

g L^{-1} , mas a presença de níquel também favoreceu a oxidação do substrato após as primeiras 24 horas. Com a concentração maior teve uma forte inibição alcançando 70% do íon ferroso oxidado em 96 horas de ensaio.

- **LAMA1** parece ter sido inibida por quase todas as concentrações de níquel alcançando 70-80% de oxidação do íon ferroso em 72 horas enquanto o controle, nesse mesmo tempo, já tinha esgotado a fonte de energia. Na presença de 12 g L^{-1} de níquel houve uma diferença na cinética de oxidação do íon ferroso; porém, em 72h, 100 % dos íons ferrosos haviam sido oxidados, da mesma forma que no controle.

Estes resultados parecem demonstrar que a linhagem RNM1 pode crescer e oxidar íon ferroso na presença de concentrações de níquel $\leq 12 \text{ g L}^{-1}$ mais rápido que as outras linhagens, incluindo a linhagem de coleção. Além disso, LR, Lama1 e RNM2 resistem a uma maior concentração de níquel sem serem inibidas fortemente.

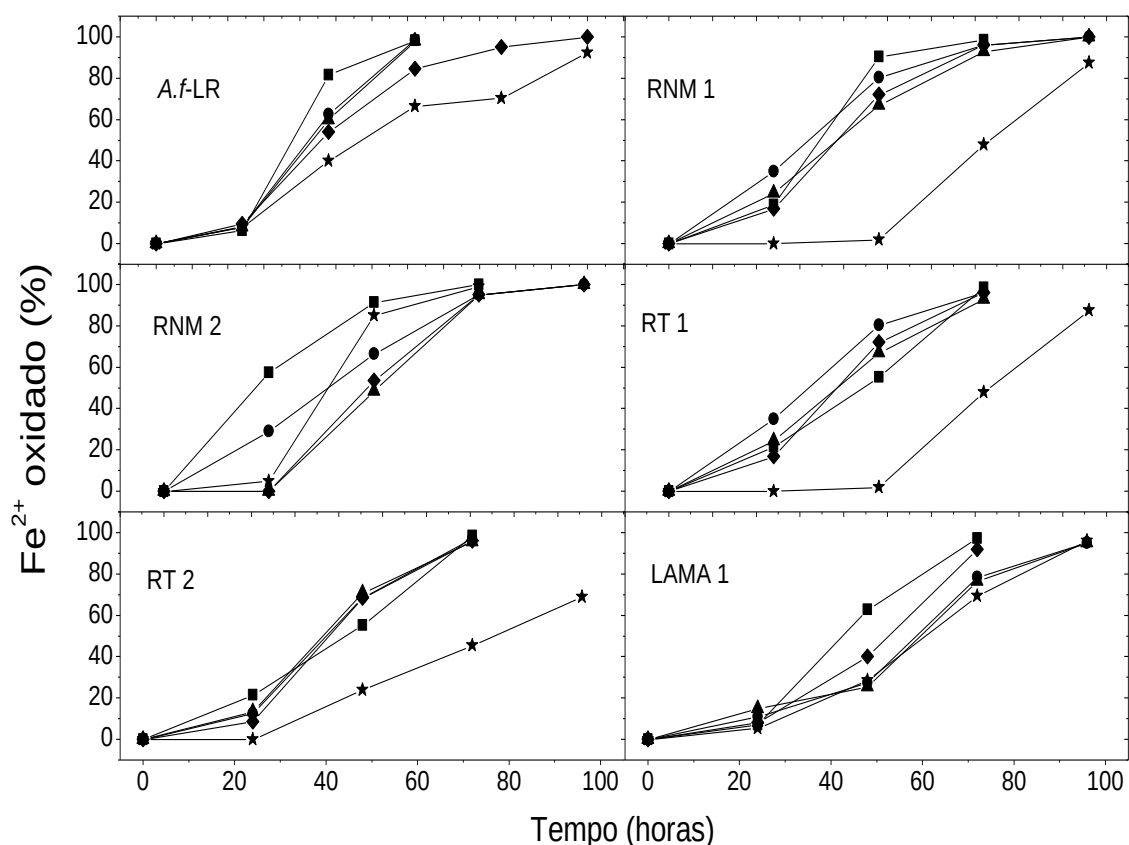


Figura 42. Porcentagens de oxidação do íon ferroso das linhagens isoladas comparadas com a de coleção LR em presença de diferentes concentrações de níquel: (■) 0 g L^{-1} ; (●) 3 g L^{-1} ; (▲) 6 g L^{-1} ; (◆) 12 g L^{-1} ; (*) 24 g L^{-1} .

- **Resistência a cobalto**

- **LR** teve uma forte inibição por cobalto inclusive em uma baixa concentração ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), a qual apresentou inibição na fase lag durante as primeiras 24 horas. Nas outras concentrações a inibição se estendeu até 168 horas. Estes resultados foram definitivamente inesperados, já que outros estudos com essa linhagem, em que foi testada sua habilidade para resistir a diversas concentrações de cobalto, foi observado crescimento da bactéria até a concentração de 250 mmol L^{-1} , ($\sim 15 \text{ g L}^{-1}$) (SILVA; GARCIA, 1989). Por tanto, nossos resultados podem ser interpretados como uma perda da capacidade desta linhagem em resistir a este metal. Isto pode ser justificado por sucessivos repiques para a manutenção da linhagem no meio de cultura a cada dois meses, que podem ter provocado uma perda do plasmídeo que confere a resistência a cobalto.
- **RNM1 e RT1** não foram inibidos pelas concentrações de cobalto, oxidando o íon ferroso da mesma forma que o controle sem o metal em 72 horas.
- **RNM2** surpreendentemente teve uma melhor atividade oxidante do Fe^{2+} em presença de cobalto que o controle, inclusive a maior concentração de Co favoreceu tanto que alcançou 90% da oxidação em apenas 48 horas ou alguma classe de efeito catalisador do íon metálico. Algo semelhante foi reportado por Sampsom e Phillips (2001) em seu estudo sobre a influência de metais de base na habilidade oxidante de bactérias acidofílicas.
- **ESC** apresentou curvas de crescimento semelhantes à LR, mas com uma inibição mais forte, levando até mais de 300 horas para oxidar o íon ferroso com as concentrações de $0,4$ e $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de Co.
- **RT2** foi a linhagem mais afetada com a presença de cobalto, sendo inibida, totalmente, em todas as concentrações testadas.

Pelos resultados anteriores parece que as linhagens RNM1 e RT1 foram os cultivos que melhor resistiram às diferentes concentrações de cobalto. O efeito aparentemente catalisador do cobalto na linhagem RNM2 pode ser coerente quando se compara com os resultados reportados por Sampsom e Phillips (2001), que explica que este metal pode ter uma influência positiva na oxidação de ferro ferroso em altas concentrações, diferentemente das baixas concentrações quando pode ser inibitório, por exemplo 1 mM de Co^{2+} . LR, inesperadamente, foi inibida por este metal

inclusive em baixas concentrações.

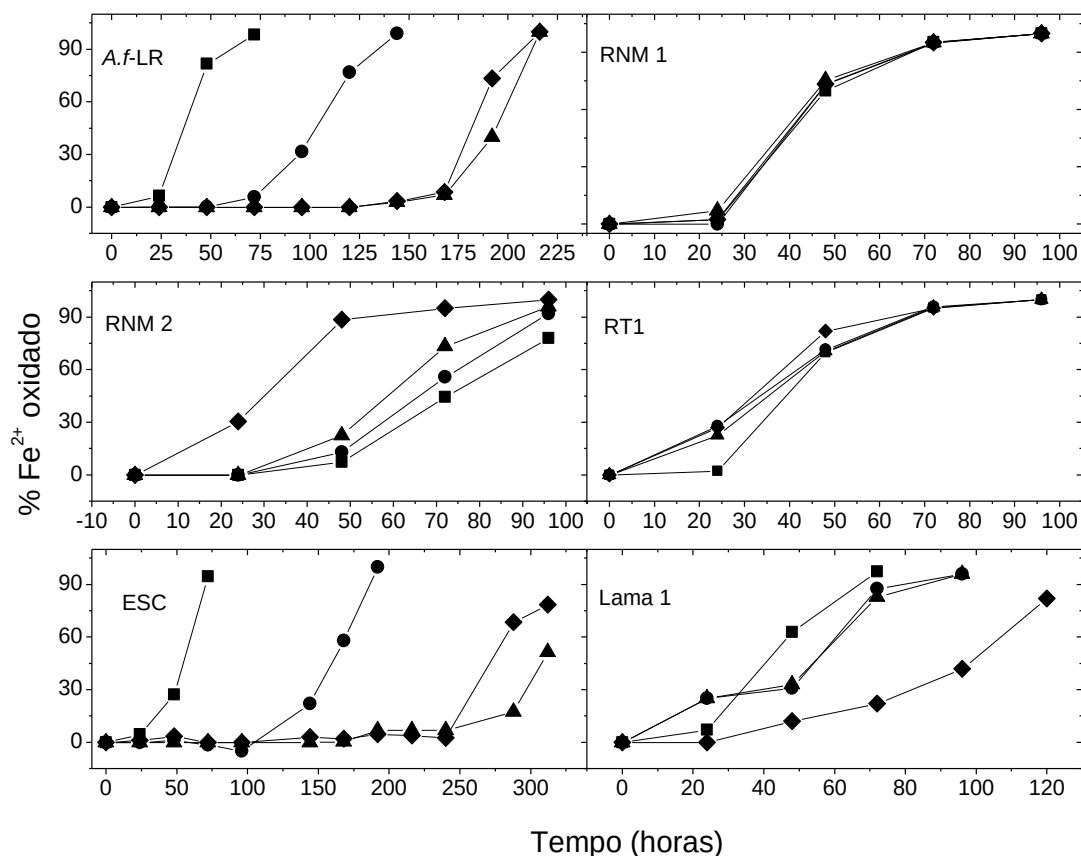


Figura 43. Porcentagens de oxidação de ferro ferroso das linhagens isoladas comparadas com a cepa de coleção A.f-LR em presença de diferentes concentrações de cobalto: (■) 0 g L⁻¹; (●) 0,2 g L⁻¹; (▲) 0,4 g L⁻¹ (◆) 0,8 g L⁻¹.

Segundo Nies (2003), a resistência a cobalto em procariotas é dada pelos plasmídeos pMOL28 e pMOL30 (encontrados a primeira vez na bactéria *Ralstonia metallidurans*). O primeiro deles confere resistência a níquel e cobalto enquanto o segundo aos metais Co²⁺, Zn²⁺ e Cd²⁺, sendo este plasmídeo quem atribui uma resistência maior à célula. Outro mecanismo de resistência a cobalto está presente na família de proteínas facilitadoras de difusão de cátions (CDF). No entanto, existem evidências de que estas proteínas não conferem resistência a Co²⁺ em todas as bactérias.

Segundo Barreto et al., (2003), um dos mecanismos de resistência a metais é por meio dos sistemas de transporte (entrada e saída) de cátions onde os sistemas de afluxo e efluxo são separados e específicos para quase cada cátion de importância biológica. Segundo esses autores, existe um sistema de transporte para

entrada e saída de Mg^{2+} com substratos alternativos, como Ni^{2+} e Co^{2+} , realizado pelo complexo CorA (chamado assim por seu papel na resistência a altos níveis de cobalto). O Ni^{2+} também pode ser tomado e excretado por proteínas de transporte diferentes.

É possível que a cepa de coleção (LR) tenha perdido seu plasmídeo que lhe conferia resistência a cobalto, mas não a níquel. Então outros ensaios deverão ser feitos para conferir a perda ou presença do(s) plasmídeo(s).

• Resistência a cobre

Nestes ensaios foi observado que as linhagens testadas foram fortemente inibidas pelas concentrações de cobre, com exceção da LR que conseguiu oxidar o íon ferroso em 96 horas na presença de uma concentração de cobre de 80 mmol L⁻¹.

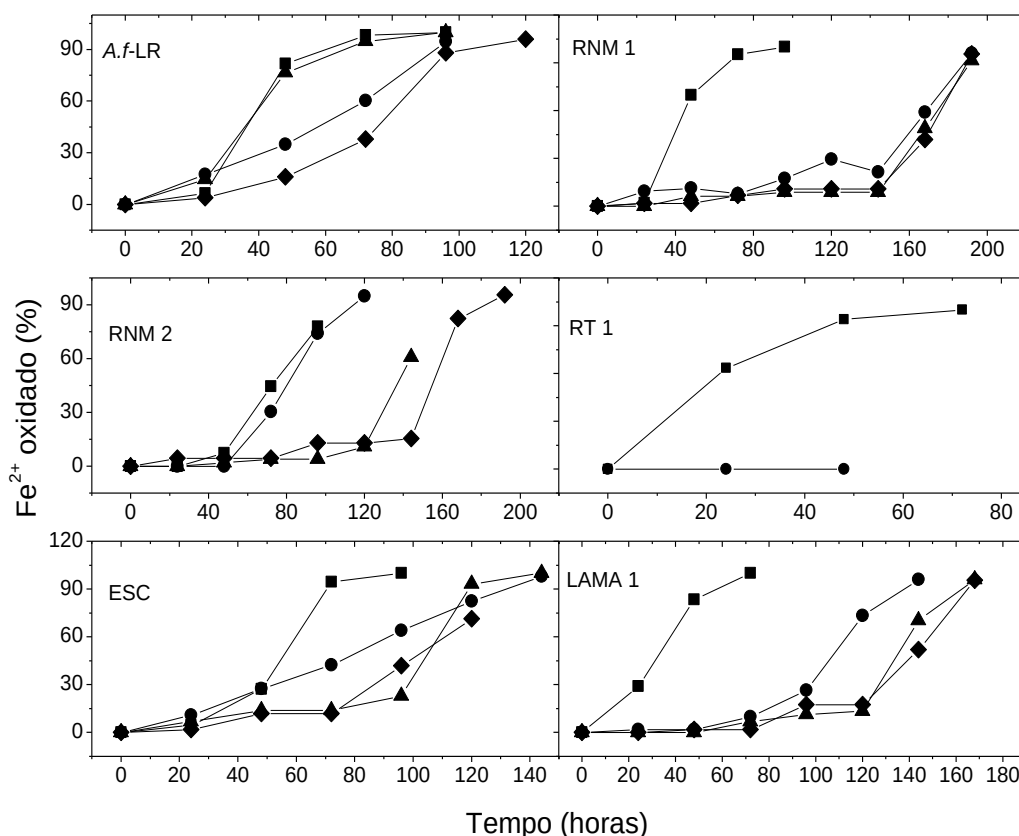


Figura 44. Porcentagens de oxidação de ferro ferroso das linhagens isoladas comparadas com a cepa de coleção A.f-LR em presença de diferentes concentrações de cobre: (■) 0 g L⁻¹; (●) 1,25 g L⁻¹; (▲) 2,5 g L⁻¹; (◆) 5 g L⁻¹.

Novo et al., (2000); Felício, Garcia e Novo, (2003) reportam o crescimento de LR em meio com 200 mmol L⁻¹ de cobre chegando a 100% de oxidação de Fe²⁺ em

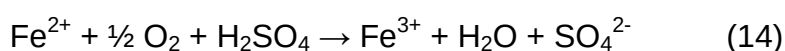
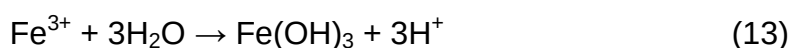
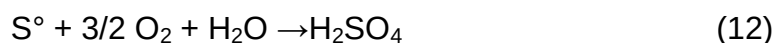
200 e 72 horas, respectivamente. Esta discrepância pode ser devida a que diferenças experimentais, pois no trabalho de Felício, Garcia, Novo. (2003) a concentração de íons ferrosos em solução não foi medida, a determinação do crescimento bacteriano foi dado pela mudança de cor no meio de cultivo nas 72 horas de ensaio. Silva e Garcia (1991) que também trabalharam com esta cepa, reportaram uma resistência de cobre de até 100 mmol L⁻¹, e uma inibição total do crescimento a 250 mmol L⁻¹ de Cu²⁺.

Nosso trabalho foi, somente, testado até uma concentração de 80 mmol L⁻¹ e, além disso, nenhuma das linhagens foi adaptada; por tanto, é esperado que em novos experimentos com LR e com as outras linhagens adaptadas consiga-se uma melhor oxidação do ferro em menor tempo e com maiores concentrações de cobre.

3.3.1 Estudos de biolixiviação de lama e escória com consorcio de cepas isoladas

- pH e Eh

O comportamento do pH e Eh (Figura 45) durante a biolixiviação de lama e escória com o conjunto de bactérias isoladas sozinhas ou com a linhagem de coleção A.f-LR foi muito semelhante, o que pode ser interpretado como que estes parâmetros não variam com o tipo de linhagem ou quantidade de células adicionadas ao sistema. Normalmente nos ensaios de biolixiviação ocorre, sempre, um aumento do pH nas primeiras 24 horas causado por consumo de ácido pelo minério e pela reação de oxidação do íon ferroso (BEVILAQUA et al., 2002), sendo necessários ajustes periódicos da acidez até se estabilizar o pH em valores baixos. Esta estabilização é dada pela produção de ácido sulfúrico pelas bactérias oxidando os sulfetos contidos na polpa mineral ou, ainda, à hidrólise do Fe³⁺ segundo as seguintes reações (FRANCISCO; BEVILAQUA; GARCIA, 2007):



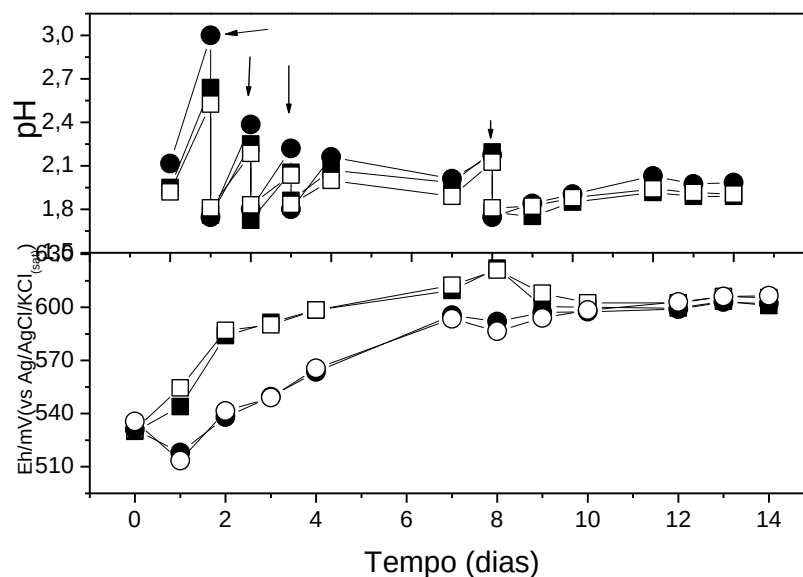


Figura 45. Variação dos valores de pH e potencial redox (Eh) das biolixiviações de lama (círculos) e escória (quadrados). Símbolos cheios correspondem às extrações com o consorcio de linhagens isoladas e os símbolos vazios às extrações com *A. ferrooxidans*-LR. Culturas crescendo em meio T&K.

Com relação ao potencial redox pode ser notado que no caso da escória durante a primeira semana de biolixiviação, os valores estiveram mais altos que aqueles nos frascos contendo a lama. A partir do dia 9 os valores de potencial redox se igualam e permanecem estáveis o resto do tempo. Esta diferença no comportamento do ORP pode ser devida à ação oxidante do Fe^{3+} sobre os sulfetos contidos na lama. Esta reação faz diminuir a concentração do ferro oxidado em solução e fazem com que o potencial não suba de forma linear ou constante.

- **Solubilização de níquel e cobalto**

Na Figura 46 observam-se as curvas de porcentagem de extração de níquel e cobalto a partir dos rejeitos biolixiviados com o consorcio microbiano de linhagens isoladas ou com a cepa de coleção. Aqui pode ser notado que a eficiência de extração de metal foi igual em cada caso.

A solubilização do cobalto está apresentada na Figura 46b. Similarmente ao caso anterior não houve diferença na extração do metal com relação às células utilizadas, mas se encontrou uma maior porcentagem de solubilização do cobalto na lama, alcançando 20% comparado com a escória que obteve 6% de cobalto em solução.

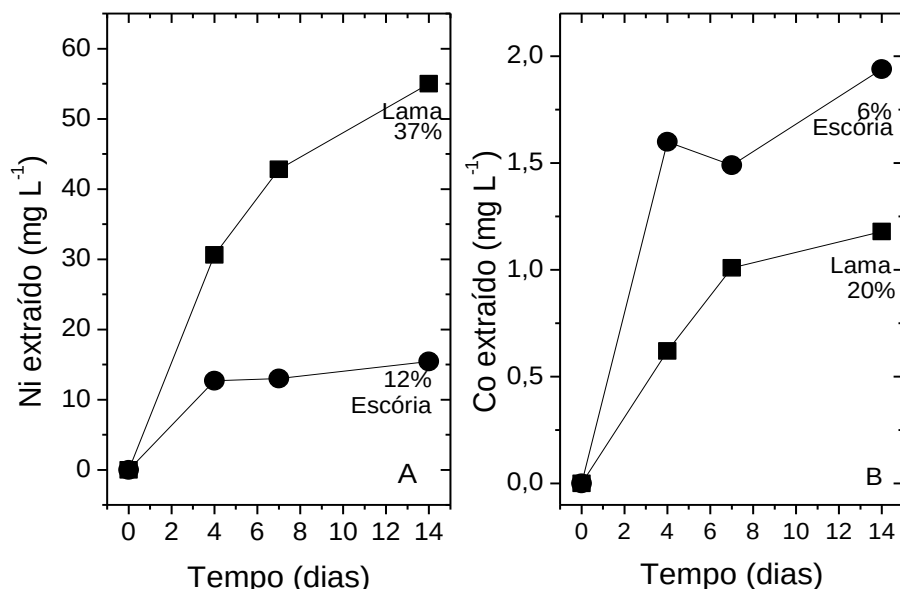


Figura 46. Extração de níquel e cobalto a partir de lama (quadrados) e escória (círculos) com o consórcio microbiano isolado.

3.3.2 Isolamento de micro-organismos oxidantes de enxofre

O cultivo microbiano em meio 9K e pH 2,8 teve como resultado o crescimento de bactérias que utilizam o enxofre como fonte de energia. Este crescimento foi detectado pelas mudanças do meio de cultivo, como turbidez, degradação do enxofre insolúvel e maior acidez do meio (em pH 1,0-1,2), fenômeno este causado pela produção de ácido sulfúrico.

Estas células crescidas foram observadas ao microscópio e encontraram-se bacilos Gram negativos curtos, do tipo *Acidithiobacillus*. Já que tanto a espécie *A. ferrooxidans* como *A. thiooxidans* podem crescer a expensas do enxofre, alíquotas desta cultura foram repicadas em meio T&K com ferro com o objetivo de diferenciar entre estas duas espécies. Este meio T&K apresentou crescimento bacteriano utilizando o ferro como fonte de energia.

Outras tentativas em isolar *A. thiooxidans*, a partir de lama e escória, resultaram insatisfatórias, pois de cada cultivo em enxofre repicado em ferro repetia-se o mesmo resultado anterior. Paralelamente, os cultivos em meio sólido com tiosulfato ou enxofre não apresentaram crescimento de colônias bacterianas.

Uma modificação do meio sólido, adicionando ferro junto com tiosulfato, apresentou colônias bacterianas crescidas às expensas do ferro.

4. Conclusões

- **Solubilização de níquel, cobre e cobalto a partir de rejeitos minerais**

A recuperação de níquel dos rejeitos escória e lama foi analisada através da lixiviação química (ácida) e bacteriana. O metal de interesse na recuperação foi analisado nos rejeitos, constatando-se que apenas parte do teor de níquel era solúvel. O teor de metal solúvel e total na lama é aproximadamente o mesmo, enquanto na escória este valor é muito diferente. Apenas 26% do níquel presente na escória é solúvel.

A escória apresentou recuperação maior que 100% do níquel solúvel com a lixiviação ácida em pH 0,5. Isto equivale a, aproximadamente, 560 kg de ácido por tonelada de minério. Convém ressaltar que este consumo pode ser diminuído alterando-se algumas variáveis do processo. Para a recuperação de níquel deste rejeito sugere-se lixiviação ácida e não bacteriana.

Posterior aos ensaios de lixiviação por agitação foram escolhidas duas metodologias para tratar a escória: i) lixiviação pela técnica de cura e lavagem realizada em bandeja formando uma pilha com o mineral, e ii) lixiviação estática em béquer encharcando o mineral. Estas duas técnicas representaram uma boa alternativa para lixiviar rejeitos tipo escória por serem de fácil execução e potencialmente aplicáveis.

A lama apresentou a mesma concentração de níquel do que a escória, no entanto, mais de 80% do metal foi solúvel neste rejeito. Apesar da lixiviação ácida alcançar, aproximadamente, 30% de recuperação de níquel, com a lixiviação bacteriana este valor aproximou-se de 50% com 14 dias de ensaio e de 90% com tempos superiores a 20 dias de processo. A atmosfera oxidante proporcionada pela atividade bacteriana neste substrato propiciou esta recuperação mais eficiente de níquel.

Em rejeitos de lama, contendo ainda sulfetos metálicos, a presença do íon férrico no meio, desde o início dos experimentos, além do tempo experimental, influenciou, positivamente, na maior extração dos metais.

Os difratogramas de raios X dos produtos sólidos dessas lixiviações mostraram que o ferro liberado ou adicionado no meio de cultivo foi biooxidado, representado nos picos de jarosita. A escória apesar de ser uma matriz de sílica (aparentemente inerte), proporciona os íons Fe^{2+} que a bactéria utiliza para seu crescimento, mas não modifica os picos de faialita e/ou forsterita que compõem a escória.

Os difratogramas da lama apresentaram uma evidente mudança nos picos do material original, com fases mineralógicas coerentes com a dissolução do rejeito que levou à precipitação de cristais.

- **Isolamento de micro-organismos**

Estes mesmos rejeitos foram materiais de isolamento de novas linhagens de bactérias oxidantes de ferro e enxofre. A partir da escória se obteve uma colônia pura de um microorganismo semelhante à *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A lama, por sua vez, originou duas colônias morfologicamente diferentes denominadas Lama1 e Lama2.

Os outros rejeitos proporcionados pela empresa Votorantim Metais, um rejeito não magnético e outro rejeito total, também constituídos de lama, que foram pelotizados, também forneceram o isolamento de novas linhagens bacterianas. Destes rejeitos foram obtidas 3 colônias com morfologias diferentes a partir de cada material, denominadas RNM1, RNM2, RNM3, RT1, RT2 e RT3. Todas as linhagens estudadas crescem bem, tanto em íon ferroso quanto em enxofre como fontes únicas de energia, por tal motivo, somado ao fato de que as análises de DGGE revelaram as mesmas bandas de fragmentos DNA que as linhagens de coleção (*A. ferrooxidans* linhagens LR e ATCC-23270), pode se considerar que estes novos isolados pertencem à espécie bacteriana *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Algumas delas foram testadas em sua capacidade de oxidar Fe(II) sob diferentes condições como: baixo pH inicial (1,4; 1,8 e 2,2) , consumo de oxigênio em diferentes temperaturas, crescimento em meio sólido suplementado com ferro ferroso (com diferentes concentrações de sais) ou em meio ferro-tiosulfato e resistência a metais (Ni^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+}).

Como já discutido por vários autores, a resposta a cada condição depende da

variação de linhagem, encontrando-se assim que todos os isolados foram notoriamente inibidos pelas concentrações de cobre e pouco ou nada afetados pela presença de íons níquel. Quanto ao cobalto, este metal inibiu e favoreceu o crescimento de algumas e outras linhagens.

Em relação à tolerância à acidez, observou-se que a maioria dos isolados crescem bem em meio com íon ferroso em baixos valores de pH (<2,2), obtendo crescimento celular inclusive no valor de pH 1,4 da mesma maneira que aconteceu com a linhagem de coleção ATCC-23270. A linhagem LR apresentou um atraso de 24 horas no crescimento em pH 1,4.

Nos ensaios de respirometria encontrou-se que a lama é o substrato que apresentou menor consumo de oxigênio tanto para a linhagem de coleção LR, quanto para as linhagens isoladas, embora uma delas tenha consumido 100% a mais. No caso da escória, este substrato forneceu um maior consumo de oxigênio, com velocidades iniciais superiores que as obtidas no substrato anterior. Isto pode ser explicado, talvez, porque o íon ferroso da escória está mais disponível que aquele a partir da lama. Além disso, substâncias contidas na lama, provenientes do processo de flotação, podem afetar o desenvolvimento celular. Os sulfetos metálicos proporcionaram um melhor substrato para as células respirarem e destes a pentlandita foi a que apresentou valores muito mais altos de consumo de oxigênio, alcançando valores entre 100 e 500 μL de oxigênio ao final de 3 horas de respirometria.

A biolixiviação dos rejeitos com o consórcio microbiano, das linhagens isoladas oxidantes de ferro, obteve o mesmo comportamento e porcentagem de extração de metais que a biolixiviação realizada pela linhagem da coleção LR, alcançando, aproximadamente, 40% e 10% de níquel total em solução a partir da lama e escória respectivamente. As extrações de cobalto, por sua vez, foram de 32% a partir da lama e 5% com a escória. Verificou-se, novamente, que a presença de micro-organismos é a melhor alternativa para lixiviar metais contidos em rejeitos de flotação tipo lama, enquanto para a escória deve ser considerada a adição de ácido para uma maior liberação de metais.

A partir dos resultados obtidos no isolamento de micro-organismos oxidantes de enxofre pode ser concluído que a espécie bacteriana que mais predomina nos rejeitos tratados foi *A. ferrooxidans* e seu número de células ou sua melhor habilidade para oxidar substratos podem ter diminuído ou inibido a população de *A. thiooxidans*.

Todos estes estudos foram realizados com as células não adaptadas nem a presença de metais nem a maior acidez no meio de cultivo. Excetuando-se a linhagem RT1, que foi inibida fortemente pelo cobre, os resultados aqui apresentados indicam que, de maneira geral, as linhagens toleram moderadas concentrações de certos metais sem um acondicionamento prévio. A adaptação das bactérias a altos níveis de íons metálicos, poderá permitir uma boa dissolução de polpas de interesse contendo metais sem alterar o desempenho microbiano, tal como se espera em um biorreator industrial.

Os organismos adaptados têm maior aplicabilidade que os organismos não adaptados. Na indústria biohidrometalúrgica a adaptação em condições ambientais especiais, cultivando seletivamente, é o método mais convencional e praticado para melhorar os processos de biolixiviação e muito da literatura especializada reporta seus resultados baseados em testes com células pré-adaptadas. Por tal motivo é possível esperar que os resultados aqui apresentados sejam melhorados com as linhagens pré-condicionadas aos diferentes ensaios.

- **Biolixiviação de pentlandita**

Semelhante aos trabalhos de Bhatti et al., (1990) e Salo-Zieman, Kinnunen e Puhakka (2006), o minério de níquel utilizado neste estudo apresentou uma característica altamente consumidora de ácido durante os primeiros 15 dias dos ensaios. Este consumo de ácido foi atribuído à presença de pirrotita e compostos de magnésio presentes na amostra de pentlandita.

Nos ensaios da segunda biolixiviação com cultivos puros e mistos de *A. ferrooxidans*-LR e *A. thiooxidans*-FG01, constatou-se uma queda do potencial redox nas primeiras 24 horas. Este fato pode ser atribuído à combinação de reações oxidativas e não oxidativas da pirrotita presente no minério, o que leva a considerar

que a presença de células oxidantes de ferro teve pouca influencia na primeira fase da dissolução do mineral.

As extrações de níquel e cobre com *A. ferrooxidans* ou com *L. ferrooxidans*, nos primeiros ensaios de biolixiviação (série 1), foram menores do que as alcançadas nos frascos controle, inclusive quando os frascos foram reinoculados dias depois. Enquanto que na segunda serie de experimentos, com cultivos puros e mistos de *A. ferrooxidans*-LR e *A. thiooxidans*-FG01, as concentrações finais de níquel foram maiores. Esta diferença nos resultados pode ser devida ao pré-tratamento do minério realizado na primeira série de ensaios com a lavagem com EDTA-NaOH e com a esterilização a 120°C.

Os testes de perda de metais evidenciaram uma significativa perda de níquel da solução na primeira semana do experimento, quando adicionado a uma concentração de 1 g L⁻¹. A recuperação do metal, na primeira semana, foi de 80% e 92%, nos frascos com pirrotita e pentlandita, respectivamente. Contudo, ao finalizar o experimento, a recuperação de níquel foi de 71% e 76% nos frascos com pirrotita e pentlandita, respectivamente.

Os resultados de DRX evidenciaram o acúmulo de enxofre nos sólidos após 30 dias de experimento, tanto nos ensaios de biolixiviação quanto nos de perda de metais, inclusive com adição de uma linhagem bacteriana oxidante de enxofre. Este acúmulo de enxofre pode ser um dos motivos pelos quais a oxidação dos sulfetos foi incompleta, pois ele atua como uma barreira passivadora do mineral. Foi detectada também, a formação de precipitados de ferro, como óxidos do tipo da goetita e hematita ou hidroxissulfatos como jarositas. Novas fases mineralógicas foram encontradas como cuprita, tenorita, digenita, vaesita e violarita.

A perda de níquel foi evidenciada, mas a relação dessa perda com a concentração de níquel inicial não foi esclarecida. Uma possível explicação dessa perda de níquel da solução pode ser devida a formação de novos sulfetos secundários de níquel como violarita.

A lavagem do mineral ante dos experimentos de biolixiviação e/ou a esterilização com atmosfera de nitrogênio pôde ter influenciado para a maior ou mais

rápida formação de goetita sobre o mineral e, portanto, um seqüestro maior dos metais de interesse.

Análises adicionais dos resíduos sólidos, por diferentes técnicas, seriam necessárias para determinar a retenção de níquel, cobre ou outros metais nos precipitados, especialmente naqueles sólidos dos frascos biológicos onde houve menor quantidade de metais em solução.

REFERÊNCIAS

AHONEN, L.; TUOVINEN, O. H. Bacterial leaching of complex sulfide ore samples in bench-scale column reactors. **Hydrometallurgy**, v. 37, p. 1-21, 1995.

ALI, M. A.; DZOMBAK, D. Effects of simple organic acids on sorption of Cu^{2+} and Ca^{2+} on goethite. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 60, p. 291-304, 1996.

ALTUNDONGAN, H. S.; BOYRAZLI, M.; TUMEN, F. A study on the sulphuric acid leaching of copper converter slag in the presence of dichromate. **Mineral Engineering**, v. 17, p. 465-467, 2004.

ANTONIJEVIC, M. M.; DIMITRIJEVIC, M. D.; STEVANOVIC, S. M.; SERBULA, S. M.; BOGDANOVIC, G. D. Investigation of the possibility of copper recovery from the flotation tailings by acid leaching. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 23-34, 2008.

ARSLAN, C.; ARSLAN, F. Recovery of copper, cobalt and zinc from copper smelter and converter slags. **Hydrometallurgy**, v. 67, p. 1-7, 2004.

BAGHALHA, M.; PAPANGELAKIS, V. G.; CURLOOK, W. Factors affecting the leachability of Ni/Co/Cu slags at high temperature. **Hydrometallurgy**, v. 85, p. 42-52, 2007.

BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p. 139-152, 2003.

BAKER-AUSTIN, C.; DOPSON, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 165-171, 2007.

BANZA, A. N.; GOCK, E.; KONGOLO, K. Base metals recovery from copper smelter slag by oxidising leaching and solvent extraction. **Hydrometallurgy**, v. 67, p. 63-69, 2002.

BARRETO, M.; QUATRINI, R.; BUENO, S.; ARRIAGADA, C.; VALDES, J.; SILVER, S.; JEDLIKI, E.; HOLMES, D. S. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 97-105, 2003.

BELZILE, N.; CHEN, Y. W.; CAI, M. F.; LI, Y. A review on pyrrhotite oxidation. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 84, p. 65-76, 2004.

BEUKES, J. P.; GIESEKKE, E. W.; ELLIOTT, W. Nickel retention by goethite and hematite. **Minerals Engineering**, v. 13, p. 1573-1579, 2000.

BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 587-592, 2002.

BHATTI, M. T.; BIGHAM, J. M.; CARLSON, L.; TUOVINEN, O. H. Mineral products of pyrrhotite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1984-1990, 1993.

BOON, M. The mechanism of “direct” and “indirect” bacterial oxidation of sulphide minerals. **Hydrometallurgy**, v. 62, p. 67-70, 2001.

BRIERLEY, C. L. How will biomining be applied in future? **Transactions Nonferrous Metals Society of China**, v. 18, p. 1302-1310, 2008.

BRIERLEY, J. A. A perspective on development in Biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 94, p. 2-7, 2008.

BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 233-239, 2001.

CABRERA, G.; GOMEZ, J. M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2683-2687, 2005.

CHAMBERLAIN, A. C.; DUNN, J. G. The relationship between stoichiometry and reactivity for violarite. **Termochimica Acta**, v. 340-341, p. 367-376, 1999.

COBALT DEVELOPMENT INSTITUTE. **About cobalt**. Disponível em: < www.thecdi.com/about-cobalt >. Acesso em: 8 jan. 2010.

CRAIG, L. R. Violarite stability relations. **American Mineralogist**, v. 56, p. 1303-1311, 1971.

CRAMB, A. W. **A short history of metals**. Disponível em: <www.neon.mems.cmu.edu/cramb/Processing/history.html>. Acesso em: 8 jan. 2010.

CRHISHOLM, I. A.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 245-254, 1998.

DAOUD, J.; KARAMANEV, D. Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v. 9, p. 960-967, 2006.

DIXON, E. M.; GARDNER, M. J.; HUDSON, R. The comparability of sample preparation techniques for the determination of metals in sediments. **Chemosphere**, v. 35, p. 2225-2236, 1997.

DOPSON, M.; BAKER-AUSTIN, C.; KOPPINEEDI, P. R.; BOND, P. L. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. **Microbiology**, v. 149, p. 1959-1970, 2003.

EUROPEAN COPPER INSTITUTE. **El mundo del cobre**. Disponível em: <www.eurocopper.org/cobre/aplicaciones-cobre.html> Acesso em 9 jan. de 2010.

FELICIO, A. P. **Efeito dos metais cobre, cádmio, zinco e níquel na respiração, crescimento e no perfil de proteínas periplasmáticas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

FORD, R. G.; KEMNER, K. M.; BERTSCH, P. M. Influence of sorbate-sorbent interactions on the crystallization kinetics of nickel-and lead-ferrihydrite coprecipitates. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 63, p. 39-48, 1999.

FRANCISCO JUNIOR, W.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JUNIOR, O. Estudo da dissolução oxidativa microbiológica de uma complexa amostra mineral contendo pirita (FeS_2), Pirrotita (Fe_{1-x}S) e Molibdenita (MoS_2). **Química Nova**, v. 30, p. 1095-1099. 2007.

FRATTINI, C. J.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 57-64, 2000.

GARCIA JUNIOR, O.; MUKAI, J. K.; ANDRADE, C. B. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 279-282, 1992.

GARCIA JUNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Review of Microbiology**, v. 20, p. 1-6, 1991.

GARCIA JUNIOR, O.; BIGHAM, J. M.; MORETTO, R.; TUOVINEN, O. H. Products of oxidative dissolution of a complex sulfide mineral system by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM IBS 97, 12th, 1997, Sydney. **Proceedings...** Glenside: Australian Mineral Foundation, 1997. M7.2.1-M7.2.9.

GBOR, P. K.; AHMED, I. B.; JIA, C. Q. Behaviour of Co and Ni during aqueous sulphur dioxide leaching of nickel smelter slag. **Hydrometallurgy**, v. 57, p. 13-22, 2000.

GHAURI, M. A.; OKIBE, N.; JOHNSON, D. B. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: the significance of species and strain variations. **Hydrometallurgy**, v. 85, p. 72-80, 2007.

GEHRKE, T.; TELEGDI, J.; THIERRY, D.; SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2743-2747, 1998.

GEOVIC MINING CORP. **Cobalt in demand**. Disponível em: < www.geovic.net/cobalt_mining.php >. Acesso em: 22 jun. 2010.

GROENEVELD, O. **The technology environment for the 21st century – The mining industry**. Disponível em: < www.atse.org.au >. Acesso em: 2 mar. 2010.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

INTERNATIONAL COPPER ASSOCIATION. **Copper products**. Disponível em: < www.copperinfo.com/cproducts/index.html >. Acesso em: 10 jan. 2010.

INTERNATIONAL NICKEL STUDY GROUP. **The world of nickel**. Disponível em: <<http://www.insg.org/whatnickel.aspx>>. Acesso em: 9 jan. 2010.

JENSEN, A. B.; WEBB, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 225-236, 1995.

JOHNSON, D. B. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 23, p. 205-218, 1995.

JOHNSON, D. B.; OKIBE, N.; HALLBERG, K. B. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. **Journal of Microbiology Methods**, v. 60, p. 299-313, 2005.

KARAMANEV, D. G.; NIKOLOV, L. N.; MAMATARKOVA, V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 341-346, 2002.

KARAVAIKO, G. I.; TUROVA, T. P.; KONDRATEVA, T. F.; LYSENKO, A. M.; KOLGANOVA, T. V.; AGEEVA, S. N.; MUNTIAN, L. N.; PIVOVAROVA, T. A. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 53, p.113-119, 2003.

KE, J.; LI, H. Bacterial leaching of nickel-bearing pyrrhotite. **Hydrometallurgy**, v. 82, p. 172-175, 2006.

LEGRAND, D. L.; BANCROFT, G. M.; NESBITT, H. W. Oxidation/alteration of pentlandite and pyrrhotite surfaces at pH 9.3: Part 1. Assignment of XPS spectra and chemical trends. **American Mineralogist**, v. 90, p. 1042-1054, 2005.

LI, H. M.; KE, J. J. Influence of Cu^{2+} and Mg^{2+} on the growth and activity of Ni^{2+} adapted *Thiobacillus ferrooxidans*. **Minerals Engineering**, v. 14, p. 113-116, 2001.

LI, Y.; PEREDERIY, I.; PAPANGELAKIS, V. G. Cleaning of waste smelter slags and recovery of valuable metals by pressure oxidative leaching. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 607-615, 2008.

LI, Y.; PAPANGELAKIS, V. G.; PEREDERIY, I. High pressure oxidative acid leaching of nickel smelting slag: characterization of feed and residue. **Hydrometallurgy**, v. 97, p. 185-193, 2009.

MacKINTOSH, M. E. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of General Microbiology**, v. 105, p. 215-218, 1978.

MALEY, M.; VAN BRONSWIJK, W.; WATLING, H. R. Leaching of a low-grade, copper-nickel sulfide ore 2. Impact of aeration and pH on Cu recovery during Abiotic leaching. **Hydrometallurgy**, v. 98, p. 66-72, 2009a.

MALEY, M.; VAN BRONSWIJK, W.; WATLING, H. R. Leaching of a low-grade, copper-nickel sulfide ore 3. Interactions of Cu with sulfide minerals. **Hydrometallurgy**, v. 98, p. 73-80, 2009b.

MANNING, H. L. New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. **Applied Microbiology**, v. 30, p. 1010-1016, 1975.

MASON, L. J.; RICE, N. M. The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel-iron sulphide concentrates. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 795-808, 2002.

MORIN, D.; PINCHES, T.; HUISMAN, J.; FRIAS, C.; NORBERG, A.; FOSSBERG, E. Progress after three years of BioMine-research and technological development project for a global assessment of biohydrometallurgical processes applied to European non-ferrous metal resources. **Hydrometallurgy**, v. 94, p. 58-68, 2008.

NEMATİ, M.; HARRISON, S. T. L.; HANSFORD, G. S.; WEBB, C. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 1, p.171-190, 1998.

NICKEL INSTITUTE. **Nickel in society**: an understanding of sustainable development. Disponível em: <http://www.nidi.org/index.cfm/ci_id=2288la-id=1>. Acesso em: 8 jan. 2010.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, p. 313-339, 2003.

NOEL, N. **Comparative study of planktonic and sessile cells in cultures of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus caldus* on pyrite**. 2008. 53f. Thesis (Master of Science) - Chemistry Department, University Duisburg-Essen, Duisburg, 2008.

NOVO, M. T.; SILVA, A. C. da; MORETO, R.; CABRAL, P. C.; COSTACURTA, A.; GARCIA JUNIOR, O.; OTTOBONI, L. M. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 187-195, 2000.

OJUMU, T. V.; PETERSEN, J.; SEARBY, G. E.; HANSFORD, G. S. A review of rate equations proposed for microbial ferrous-iron oxidation with a view to application to heap bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 83, p. 21-28, 2006.

PRADHAN, N.; NATHSARMA, K. C.; SRINAVASA, R. K.; SUKLA, L. B.; MISHRA, B. K. Heap bioleaching of chalcopyrite: a review. **Minerals Engineering**, v. 21, p. 355-365, 2008.

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

RAWLINGS, D. E. Review characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p.1-15, 2005.

RAWILINGS, D.; DEW, D.; PLESSIS, C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 38-44, 2003.

RIEKKOLA-VANHANEN, M. Talvivaara black schist bioleaching demonstration plant. **Advanced Materials Research**, v. 20-21, p. 30-33, 2007.

RIEKKOLA-VANHANEN, M. **Finnish expert report on best available techniques in nickel production**. Disponível em: < www.environment.fi>. Acesso em: 16 out. 2006.

RODRIGUEZ, Y.; BALLESTER, A.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J. A. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 37-46, 2003.

ROHWERDER, T.; GEHRKE, T.; KINZLER, K.; SAND, W. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 63, p. 239-248, 2003.

RUDNIK, W.; BURZYNSKA, L.; GUMOWSKA, W. Hydrometallurgical recovery of copper and cobalt from copper converter slag. **Minerals Engineering**, v. 22, p. 88-95, 2009.

SALO-ZIEMAN, V.; KINNUNEN, P.; PUHAKKA, J. Bioleaching of acid-consuming low-grade níkel ore wiyh elemental sulfur addition and subsequent acid generation. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 81, p. 34-40, 2006.

SAMPSON, M. I.; PHILLIPS, C. V. Influence of base metals on the oxidising ability of acidophilic bacteria during the oxidation of ferrous sulfate and mineral sulfide concentrates, using mesophiles and moderate thermophiles. **Minerals Engineering**, v. 14, p. 317-340, 2001.

SAND, W.; GEHRKE, T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 49-56, 2006.

SANTELLI, C. M.; WELCH, S. A.; WESTRICH, H. R.; BANFIELD, J. F. The effect of Fe-oxidizing bacteria on Fe-silicate mineral dissolution. **Chemical Geology**, v. 180, p. 99-115, 2001.

SANTOS, L. R. G.; BARBOSA, A. F.; SOUZA, A. D.; LEAO, V. A. Bioleaching of a complex nickel-iron concentrate by mesophile bacteria. **Minerals Engineering**, v. 19, p. 1251-1258, 2006.

SCHRADER, J.; HOLMES, D. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3915-3923, 1988.

SILVA, L. L. **Efeito de metais na oxidação do Fe^{2+} e no crescimento de diferentes linhagens de *Thiobacillus ferrooxidans***. 1989. 26 f. Monografia (Graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1989.

SOUZA, W. F.; GUIMARAES, I. R.; OLIVEIRA, L. C. A.; GIROTO, A. S.; GUERREIRO, M. C.; SILVA, C. L. T. Effect of Ni incorporation into goethite in the catalytic activity for oxidation of nitrogen compounds in petroleum. **Applied Catalysis A: General**, 2010. In press.

STOTT, M. I.; WATLING, H. R.; FRANZMANN, P. D.; SUTTON, D. The role of iron-xydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching. **Minerals Engineering**, v. 13, p. 1117-1127, 2000.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with CO₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives Microbiology**, v. 88, p. 285-298, 1973.

VALIX, M.; TANG, J. Y.; CHEUNG, W. H. The effects of mineralogy on the biological leaching of nickel laterite ores. **Minerals Engineering**, v. 14, p. 1629-1635, 2001.

VOGEL, A. I. **Textbook of quantitative inorganic analysis, including elementary instrumental analysis**. 4th ed. London: Longman, 1977. 925 p.

WALTENBURY, D. R.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. The use of RAPD genomic fingerprinting to study relatedness in strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 62, p. 103-112, 2005.

WATLING, H. R. The bioleaching of nickel-copper sulfides. **Hydrometallurgy**, v. 98, p. 70-88, 2008.

WELCH, S. A.; BANFIELD, J. F. Modification of olivine surface morphology and reactivity by microbial activity during chemical weathering. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, p. 213-221, 2002.

WHITTINGTON, B. I.; JOHNSON, J. A. Pressure acid leaching of arid-region nickel laterite ore. Part III: effect of process water on nickel losses in the residue. **Hydrometallurgy**, v. 78, p. 256-263, 2005.

XIA, F.; ZHOU, J.; PRING, A.; NGOTHAI, Y.; O'NEILL, B.; BRUGGER, J.; CHEN, G.; COLBY, C. The role of pyrrhotite (Fe₇S₈) and the sample texture in the hydrothermal transformation of pentlandite [(Fe,Ni)₉S₈] to violarite [(Ni,Fe)₃S₄]. **Reaction Kinetics and Catalysis Letter**, v. 92, p. 257-266, 2007.

XU, Y. B.; XIE, Y. T.; LAN, Y.; YANG, R. D. A new method for recovering valuable metals from low-grade nickeliferous oxide ores. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 280-286, 2005.

YANTING, X.; YANBIN, X.; LAN, Y.; RUDONG, Y. Recovery of nickel, copper and cobalt from low-grade Ni–Cu sulfide tailings. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 54-58, 2005.

YANBIN, X.; YANTING, X.; LAN, Y.; RUDONG, Y. A new method for recovering valuable metals from low-grade nickeliferous oxide ores. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 280-285, 2005.

YANNOPOULOS, J. C. **The extractive metallurgy of gold**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 281 p.

ZHANG, J.; WU, A.; WANG, Y. Experimental research in leaching of copper-bearing tailings enhanced by ultrasonic treatment. **Journal China University of Mining and Technology**, v. 18, p. 98-102, 2008.