

BC/11668
IB/80475



INSTITUTO DE BIOLOGIA

ESTUDOS DA BIOLIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS
DE URÂNIO POR *Thiobacillus ferrooxidans*

T/UNICAMP

CAMPINAS SP

G165_e

OSWALDO GARCIA JÚNIOR



Este exemplar corresponde a relação final da tese defendida pelo candidato Oswaldo Garcia Junior e aprovada pela Comissão julgadora.

Arruda

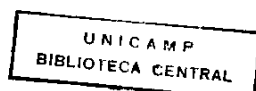
20 de junho 1989

ESTUDOS DA BIOLIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS
DE URÂNIO POR *Thiobacillus ferrooxidans*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Arruda

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de Concentração Genética.

1989



CLASSIF.	T
AUTOR	6163 v
V.	EX
TOMBO BC	11669
	187930

Este trabalho foi desenvolvido na sua quase totalidade, no laboratório de Processos de Poços de Caldas - MG, das extintas Empresas Nucleares Brasileiras S/A - NUCLEBRAS, atualmente Indústrias Nucleares do Brasil S/A. Iniciado em 1979, o trabalho foi e ainda é, parte do programa de desenvolvimento científico e tecnológico da hidrometalurgia de minérios uraníferos do referido laboratório, atualmente sob o controle da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN. Alguns estudos aqui apresentados (respirometria), foram desenvolvidos no Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, a qual desde 1986, vem desenvolvendo um programa de biometalurgia, com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

O excelente apoio da direção da NUCLEBRAS na época, através da diretoria de Engenharia Mineral, Dr. John M.A. Forman (diretor), Dr. Nadin A.S. Din e Dr. José Milton Sampaio (superintendentes), Dr. Eugênio Conceição (chefe de departamento) e Dr. Wilson Cervi da Costa (chefe de divisão), bem como a permissão para a realização desse programa de doutoramento, foram fundamentais para a execução dos trabalhos. Dessa forma quero expressar o meu reconhecimento e a minha gratidão à empresa e aos seus dirigentes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pela amizade, confiança e estímulo para a realização deste programa.

Ao Dr. Wilson Cervi da Costa que antes de chefe, foi um amigo e entusiasta durante a execução dos trabalhos, e hoje, é mais amigo e entusiasta ainda.

A todo o pessoal da NUCLEBRAS (Laboratório, Mina e Geologia e Engenharia Mineral) pelo grande apoio e coleguismo durante a época em que estive na empresa.

Aos companheiros do "Projeto Figueira" (Maran, Zé Pereira, Wilsinho, Carlão, Mané, Gentil, Torraca, Bratek e outros) pela profunda amizade e total dedicação aos trabalhos realizados na mina de Figueira - PR.

Aos Profs. Bruno, Cecília, Zé Roberto, Célia, Rubens e Tito e aos funcionários do Departamento de Bioquímica do IQAr - UNESP, pelo carinho e amizade com que me receberam.

Ao Prof. Dermeval C. Lima, também do Departamento de Bioquímica, pela amizade e ajuda em alguns experimentos e na correção da tese.

Ao Zé Carlos e Gaspar pela ajuda na parte gráfica do trabalho.

À Direção do Instituto de Química - UNESP, Profs. Drs. Antonio C. Massabni e Nilso Barelli, pelo apoio que me vem sendo dado.

Ao Prof. Dr. Olli H. Tuovinen da Ohio State University-EUA pelas sugestões e orientação em alguns estudos do trabalho.

À minha querida Herivan, esposa e companheira, sempre pronta a me dar apoio e cooperação.

Ao CNPq pelo apoio através de projetos e bolsas.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Dedico e ofereço aos pedaços de mim,
Herivan, Carolina, Juliana e Gustavo.

À memória de minha mãe que infelizment
te não pôde ver esta etapa da minha
vida e à presença de meu pai, que fel
lizmente, está entre nós.

RESUMO

O objetivo deste trabalho, foi desenvolver um programa de lixiviação bacteriana de minérios de urânio, constituído por três pontos fundamentais: a) isolamento e purificação de *Thiobacillus ferrooxidans* (e também *Thiobacillus thiooxidans*); b) estudos fisiológicos de crescimento e de metabolismo respiratório da espécie *T. ferrooxidans*; c) lixiviação do urânio de dois tipos distintos de minério, pela ação do *T. ferrooxidans*, em escalas de laboratório, semi-piloto e piloto.

Utilizando-se amostras líquidas ou sólidas, de diferentes minas contendo minerais sulfetados, conseguiu-se purificar treze isolados de *T. ferrooxidans* e oito isolados de *T. thiooxidans*. Estes isolados foram identificados por testes fisiológicos, de utilização de compostos inorgânicos como fonte de energia para crescimento e pelos padrões de crescimento colonial em meio sólido.

Nos ensaios de crescimento, constatou-se a utilização de Fe^{2+} , S^0 e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ pelos isolados de *T. ferrooxidans*, como substrato energético oxidável. Como era esperado, *T. thiooxidans* utilizou somente S^0 e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Nos ensaios de respirometria, utilizou-se suspensões celulares em repouso de *T. ferrooxidans*. Foram constatadas diferenças significativas entre quatro isolados distintos de *T. ferrooxidans*, quanto às taxas de respiração celular sob condições diferentes de concentração de substrato (Fe^{2+}) e de metais tóxicos (U, Mo e Hg) e em diferentes valores de pH. As diferenças observadas nos parâmetros cinéticos avaliados, sugerem uma variabilidade genética natural entre os isolados.

Os estudos de biolixiviação dos minérios de urânio, foram realizados em frascos agitados, em colunas de percolação (laboratório e semipiloto) e em pilhas de lixiviação estática (piloto). A potencialidade dos dois minérios avaliados frente à técnica bacteriana, foi inicialmente evidenciada nos ensaios em frascos. Devido a presença de pirita (FeS_2) nas duas amostras de minério, houve produção de H_2SO_4 e Fe^{3+} pela atividade oxidativa bacteriana. Esses dois componentes, determinaram maiores rendimentos de extração de urânio (e o molibdênio associado), e menores consumos de ácido sulfúrico nos frascos contendo bactérias, em comparação aos frascos esterilizados como controle. Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios de lixiviação estática em colunas de percolação, ainda em escala de laboratório.

Em função desses resultados positivos, prosseguiu-se nos estudos realizando-se experimentos em escalas ampliadas. Em escala semipiloto usou-se colunas de percolação e, em piloto, pilhas de lixiviação estática. Em ambos, foram obtidos resultados compatíveis com os dos outros ensaios.

Os promissores resultados de processo alcançados, além da experiência adquirida em operações de lixiviação em pilhas, a mesma utilizada em escala industrial, acenam com possibilidades reais, para uma eventual aplicação da lixiviação bacteriana em escala de produção, dos minérios uraníferos estudados.

ABSTRACT

The purpose of this work, was to develop a bacterial leaching program for uranium ores, under three basic points: a) isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans*, as well *Thiobacillus thiooxidans*; b) physiological studies of growth and respiratory metabolism of *T. ferrooxidans*; c) uranium leaching from two types of ore by *T. ferrooxidans* action, on laboratory, semipilot and pilot scales.

Thirteen cultures of *T. ferrooxidans* and eight cultures of *T. thiooxidans* were purified from solid or liquid samples, collected at different mines containing sulfide minerals. These cultures were identified, using physiological tests of inorganic compounds utilization as energy source for growth and by colonial growth pattern on solid medium.

The utilization of Fe^{2+} , S^0 and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ as oxidizable energetic substrates by all *T. ferrooxidans* cultures, was detected in growth tests. As expected, the cultures of *T. thiooxidans* were able to utilize only S^0 and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Resting cell suspensions of *T. ferrooxidans* cultures were utilized in respiratory experiments. Significant differences in the respiratory rates were observed among four *T. ferrooxidans* cultures, under different conditions of substrate concentration (Fe^{2+}), pH and toxic metal concentration (U, Mo and Hg). The differences observed in the kinetic parameters, suggests a natural genetic variability among these cultures.

The bacterial leaching studies, were carried out in shake flasks, percolation column (laboratory and semipilot) and in heap

leaching (pilot). The potential of the two ores studied in relation to bacterial action, was first showed in shake flask experiments. The production of H_2SO_4 and Fe^{3+} was a result of the bacterial activity on both ore samples containing pyrite (FeS_2). These two bacterial products, resulted in a higher uranium and molybdenum extraction and a lower sulfuric acid consumption compared to the sterilized treatments. Similar results were obtained in percolation column at the same scale (lab).

As consequence of these positive results, scale up of the process was carried out. Percolation columns and heap leaching were used in semipilot and pilot scale, respectively. In both scales, comparable results to the lab assays were obtained.

The promising process results and the experience acquired in heap leaching operations (this technique is used in industrial scale), showed real possibilities for an eventual application of the bacterial leaching for the uranium ores studied in this work, in a production scale.

Í N D I C E

	pág.
I. INTRODUÇÃO -----	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	9
II.1. HISTÓRICO -----	9
II.2. AS BACTÉRIAS DO PROCESSO -----	14
II.3. <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> -----	17
II.3.1. Características fisiológicas básicas -----	17
II.3.2. Oxidação do Fe^{2+} e fixação do CO_2 atmosférico -----	22
II.3.3. Oxidação de outros substratos -----	26
II.3.4. Estudos genéticos -----	31
II.4. A BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS -----	37
II.4.1. Mecanismo da lixiviação bacteriana -----	37
II.4.2. Desenvolvimento experimental do processo -----	40
II.4.3. Lixiviação bacteriana de urânio -----	46
II.5. A BIOMETALURGIA NO BRASIL -----	50
III. OBJETIVOS -----	54
IV. MATERIAIS E MÉTODOS -----	56

	pág.
IV.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE <i>T. ferrooxidans</i> e <i>T. thiooxidans</i> -----	56
IV.1.1. Coleta de amostras -----	56
IV.1.2. Meios de cultura -----	57
IV.1.2.1. Meio para <i>T. ferrooxidans</i> -----	57
IV.1.2.2. Meio para <i>T. thiooxidans</i> -----	62
IV.1.3. Procedimento prático -----	64
 IV.2. ALGUNS ESTUDOS FISIOLÓGICOS BÁSICOS -----	 66
IV.2.1. Oxidação de diferentes substratos pelos isolados obtidos -----	66
IV.2.2. Efeito da temperatura e agitação no crescimento de <i>T. ferrooxidans</i> -----	66
IV.2.3. Crescimento do <i>T. ferrooxidans</i> -----	67
IV.2.4. Efeito do urânio no crescimento de <i>T. ferrooxidans</i> -----	68
 IV.3. ALGUNS ESTUDOS RESPIROMÉTRICOS EM <i>T. ferrooxidans</i> -----	 70
IV.3.1. Preparo das suspensões celulares lavadas -----	70
IV.3.2. Efeito da concentração de substrato (Fe^{2+}) ---	71
IV.3.3. Efeito do pH -----	73
IV.3.4. Efeito de metais pesados -----	73
 IV.4. LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIO DE URÂNIO POR <i>T. ferrooxidans</i> -----	 75
IV.4.1. Amostras minerais utilizadas -----	75

	pág.
IV.4.1.1. Minério de Figueira - PR. -----	75
IV.4.1.2. Minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG -----	77
IV.4.2. Ensaaios em frascos agitados -----	79
IV.4.3. Ensaaios em colunas de percolação (laboratório) ----	84
IV.4.4. Ensaaios em colunas de percolação (semipiloto) ----	86
IV.4.5. Ensaaios em pilhas (piloto) -----	92
IV.4.5.1. Unidade piloto de Figueira - PR. -----	93
IV.4.5.2. Unidade piloto de Poços de Caldas - MG.--	106
IV.5. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS -----	117
IV.5.1. Amostras líquidas -----	117
IV.5.1.1. pH e Eh (potencial de oxi-redução) -----	117
IV.5.1.2. Fe ²⁺ e Fe ³⁺ -----	117
IV.5.1.3. Acidez livre (H ⁺) -----	118
IV.5.1.4. Tiosulfato (S ₂ O ₃ ²⁻) -----	118
IV.5.1.5. Urânio -----	119
IV.5.1.6. Molibdênio -----	120
IV.5.2. Amostras sólidas -----	120
IV.5.2.1. Urânio, Molibdênio e Fe total -----	120
IV.5.2.2. Sulfeto e S total -----	120
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	122
V.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE <i>T. ferrooxidans</i> e <i>T.</i> <i>thiooxidans</i> -----	122

	pág.
V.2. ALGUNS ESTUDOS FISIOLÓGICOS BÁSICOS -----	132
V.2.1. Oxidação de diferentes substratos pelos isolados bac <u>terianos</u> -----	132
V.2.2. Efeito da temperatura e agitação no crescimento de <i>T. ferrooxidans</i> -----	136
V.2.3. Crescimento de <i>T. ferrooxidans</i> -----	140
V.2.4. Efeito do urânio no crescimento de <i>T. ferrooxidans</i>	150
V.3. ALGUNS ESTUDOS RESPIROMÉTRICOS EM <i>T. ferrooxidans</i>	161
V.3.1. Efeito da concentração de substratos (Fe^{2+}) -----	162
V.3.2. Efeito do pH -----	168
V.3.3. Efeito de metais pesados -----	174
V.4. LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE URÂNIO POR <i>T. ferrooxidans</i>	183
V.4.1. Ensaio em frascos agitados -----	183
V.4.2. Ensaio em colunas de percolação (laboratório) ----	193
V.4.3. Ensaio em colunas de percolação (semipiloto) ----	202
V.4.4. Ensaio em pilhas de lixiviação (piloto) -----	213
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	223
VII. BIBLIOGRAFIA -----	227

1. INTRODUÇÃO

Mineral pode ser definido como um elemento químico ou uma substância inorgânica de composição química definida, encontrada naturalmente na crosta terrestre. Por outro lado, entende-se minério como um ou mais minerais associados, que sob certas condições podem ser processados, objetivando a recuperação de um ou mais elementos ou substâncias (metálicas ou não metálicas) de interesse econômico. A definição de economicidade da exploração de uma jazida mineral, baseia-se fundamentalmente no teor e quantidade do elemento de interesse, e no custo dos processos envolvidos para sua extração do minério.

Ao longo dos anos, o homem vem utilizando os bens minerais nas mais variadas atividades exercidas em nosso planeta pela espécie humana. Sabe-se que a cerca de 20 mil anos atrás, o homem já praticava uma metalurgia rudimentar. Na chamada idade do bronze, já se produzia uma liga de cobre e estanho. Calcula-se que os egípcios usavam aproximadamente 30 bens minerais. Hoje são utilizados cerca de 300 bens minerais, dos quais 50 são metais.

Com o avanço tecnológico, metais raros como urânio, tório, germânio, nióbio e muitos outros, tornaram-se materiais importantes devido suas utilizações em vários segmentos da tecnologia de ponta (eletrônica, óptica, energia atômica, etc.).

Devido a busca incessante e da descoberta de novas aplicações, o aumento da demanda mundial desses bens é praticamente inevitável. Dessa ação, resulta um progressivo esgotamento das reservas minerais contendo altos teores dos metais de interesse econômico,

salientando-se que tais recursos são, obviamente, não renováveis. Pode-se citar como exemplo o caso do minério de cobre. Até o final do século passado, considerava-se econômico a exploração de um minério que apresentasse um teor de cobre da ordem de 10%. Na década de 20 já se processava minério de cobre contendo de 1 a 2% do metal. Para isso novas técnicas foram então desenvolvidas. Atualmente utilizando-se técnicas de concentração prévia, utiliza-se minérios contendo cerca de 0,3% do referido metal. Abaixo desse valor, a recuperação do cobre pelos métodos convencionais é praticamente inviável sob o ponto de vista econômico. Pelo método pirometalúrgico convencional, somente minérios de altos teores ou concentrados prévios são aproveitáveis, devido ao alto custo dessa técnica em função dos gastos excessivos de energia.

Dessa forma, torna-se imperioso o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de minérios contendo baixos teores do metal de interesse. O uso de técnicas hidrometalúrgicas vem merecendo crescente atenção dos técnicos e empresários do setor mineiro-metalúrgico. Nesses processos, soluções ácidas (ou básicas) oxidantes são contactadas com o material mineral, causando a solubilização do metal desejado, o qual é então recuperado da solução.

Dentre esses processos hidrometalúrgicos, a utilização de microrganismos para promover a solubilização de metais - lixiviação bacteriana ou biometalurgia como atualmente é denominada - apresenta-se como uma alternativa promissora não só para recuperação de cobre, como também para uma série de outros metais de interesse econômico.

Essa potencialidade decorre de uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados:

1. economia dos insumos utilizados num processo hidrometalúrgico convencional, (ácido e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos.
2. baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico e mesmo a um processo hidrometalúrgico sob agitação (lixiviação ácida agitada).
3. baixo investimento de capital inicial e mesmo baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações.
4. reduzida necessidade de mão-de-obra especializada na operação.
5. não poluição atmosférica pois não ocorre emissão de SO_2 como na pirometalurgia. Como se sabe o SO_2 é agente causador da "chuva ácida".

Além do aproveitamento de rejeitos minerais (minérios de baixos teores) a lixiviação de metais por bactérias pode ser ainda uma alternativa para o aproveitamento de jazidas de pequeno porte, ou de localização adversa, isto é, muito longe de centros com infraestrutura adequada.

Atualmente a lixiviação bacteriana é aplicada em escala industrial para recuperação de cobre e urânio em vários países, destacando-se E.U.A., Canadá, África do Sul, URSS, Espanha, México, Bulgária, Chile e Peru. Destaca-se que cerca de 18% da produção do cobre no final dos anos 70 nos E.U.A. (~200.000 t) foi obtida através dessa técnica (Tabela 1).

Em função de toda essa potencialidade, inúmeras patentes industriais tem sido requeridas. TUOVINEN e NICHOLAS (1975) apresentam e discutem uma série dessas patentes na área biometalúrgica, essencialmente na lixiviação de cobre e de urânio.

TABELA 1 - Produção de cobre nos E.U.A. em 1978

Companhia	Produção de Cu (t)		% do total de Cu por lixiviação
	concentração	lixiviação	
Kennecott	287.200	88.200	23,5
Phelps-Dodge	283.600	34.550	10,8
Duval	112.300	10.200	8,3
Anamax Mining	67.200	35.810	34,8
Asarco	85.780	10.720	11,1
Cities Service	72.800	7.750	9,6
Corpus Mines	61.600	12.150	46,5
Inspiration Copper	20.700	18.000	46,5
	<u>991.180</u>	<u>217.380</u>	<u>18,0</u>

Dados apresentados por A.E. Torma (New México Institute of Mining - E.U.A.) na "Reunion Tecnologica sobre lixiviacion bacteriana", realizada na Universidade Católica de Valparaiso, Chile, de 22 a 26-07-1985.

O processo operacional da biometalurgia é conduzido de forma quase rudimentar, aproveitando-se a ação natural de bactérias já presentes nos minérios apropriados, isto é, aqueles que apresentam em sua constituição mineralógica, formas reduzidas de enxofre e ferro, sendo que a pirita (FeS_2) é o principal substrato mineral utilizado pelas bactérias. Destaca-se que a principal espécie bacteriana envolvida na solubilização de metais de seus minerais, é o *Thiobacillus ferrooxidans*, apesar do envolvimento de outras espécies, como será visto posteriormente.

Resumidamente o processo consiste na deposição de grandes quantidades de minério sobre uma base impermeabilizada, seguida de uma irrigação na superfície da pilha formada, com uma solução de ácido sulfúrico (pH $\sim 3,0$). Essa solução, coletada após a percolação pelo minério, é reciclada constantemente pela pilha, ocasionando uma intensificação da atividade bacteriana no substrato mineral referido acima (pirita). Dessa ação, resulta uma elevação da acidez e do poder oxidante da solução, pela produção biológica de ácido sulfúrico e do íon Fe^{3+} , com a conseqüente solubilização do metal desejado. Após essa etapa, o metal é extraído da solução por processos convencionais. Um esquema do processo operacional, pode ser visto na figura 1.

Existem várias características da bactéria *T. ferrooxidans* que a tornam um interessante microrganismo para estudos básicos de fisiologia, bioquímica e genética, bem como para desenvolvimento de processos industriais em atividades hidrometalúrgicas:

1. crescimento em condições ambientais extremas, sobretudo elevada acidez e altas concentrações de metais.

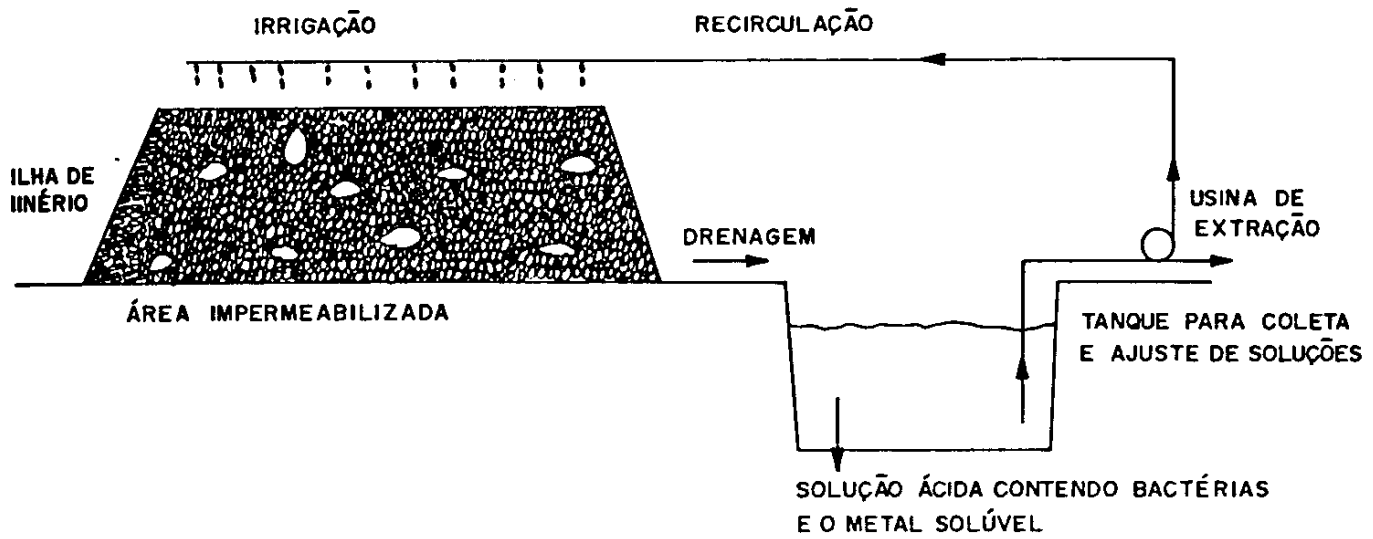


FIGURA 1 - Esquema básico do processo de lixiviação bacteriana de metais em pilhas.

2. crescimento autotrófico (fixação de CO_2 atmosférico) proporcionado pela energia liberada da oxidação de compostos inorgânicos, como o íon ferroso e formas reduzidas de enxofre.
3. significativa resistência a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos, provavelmente condicionada por genes plasmidiais.
4. capacidade de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao seu metabolismo oxidativo que produz eficientes agentes da lixiviação ácida de metais (íon férrico e ácido sulfúrico).

Inúmeros estudos de laboratório tem demonstrado que além do cobre e urânio, outros metais podem ser solubilizados de seus minerais, pela atividade de lixiviação bacteriana. Podem ser citados metais de interesse econômico, tais como ouro, prata, zinco, níquel, etc..

Sob o nome de "Biometalurgia" ou "Biogeotecnologia", são englobados ainda outros processos baseados na atividade geoquímica dos microrganismos. A nível de laboratório, já se estuda em vários países a participação microbiana na dessulfurização do carvão, objetivando minimizar o teor de enxofre do mesmo, para que durante sua utilização industrial, ocorra uma redução na emissão de SO_2 para atmosfera. Além desse, podem ainda ser citados outros tipos de atividade natural microbiana, com potencial para se tornarem processos industriais: redução de sulfato por bactérias para produção de enxofre, remoção de metais pesados de efluentes industriais por biomassa de microrganismos, solubilização de rochas fosfáticas por fungos, etc..

No Brasil, as pesquisas em biometalurgia podem ainda ser consideradas incipientes. Apesar de alguns indícios promissores, co

mo será discutido posteriormente, pouco tem sido feito nesse setor em nosso país. Iniciativas para o desenvolvimento da biometalurgia, sobretudo a lixiviação de metais por bactéria, devem ser estimuladas, pois a pesquisa nessa área é bastante atrativa para o Brasil e para os países em desenvolvimento em geral, por uma série de razões: o estágio de conhecimento a nível mundial ainda não é muito avançado; nenhuma necessidade de sofisticação de equipamentos e materiais utilizados nesse tipo de trabalho; metodologia operacional bastante simples, a nível de processo industrial; a especificidade de cada minério, isto é, o seu aproveitamento depende de um processo desenvolvido localmente (DAGNINO, 1985; GENTINA e ACEVEDO, 1985).

Esses são alguns fatores que associados à necessidade de se desenvolver métodos alternativos para o tratamento de minérios de baixo teor, justificam a implantação e consolidação de pesquisas nessa área.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. HISTÓRICO

A recuperação do cobre de efluentes naturais de minas, isto é, do cobre lixiviado naturalmente do minério, foi provavelmente praticada de forma intensa na região mediterrânea a cerca de 1000 anos A.C. (BRIERLEY, 1982). Segundo MURR (1980), os fenícios, romanos e espanhóis já observavam e utilizavam esse processo natural para recuperar o cobre nessa época.

A utilização sistemática do processo natural de lixiviação do cobre, foi iniciada no final do século XV no norte da Hungria. KARAVAIKO & GROUDEV (1985) comentam que em 1566 um ciclo completo de lixiviação e recuperação do cobre foi desenvolvido no mesmo local, utilizando-se um sistema de irrigação.

Por volta de 1700, o método de lixiviação natural do cobre em pilhas (grandes montes de minérios) foi estabelecido nas minas do rio Tinto na Espanha (TAYLOR & WHELAN, 1942) e ainda é aplicado até hoje. Conforme citações de KARAVAIKO & GROUDEV (1985), aplicações similares da lixiviação natural de cobre foram desenvolvidas na Alemanha e URSS no final do século passado.

Desde o início da aplicação sistemática da lixiviação de minérios de baixo teor de cobre nos Estados Unidos da América, ocorrido em 1914 (ARGALL, 1963), essa prática tem se propagado em estados do sudoeste americano. Existem operações em Nevada, Utah, Montana, Arizona e Novo México. Posteriormente, outros países começaram a utilizar essa técnica para recuperar cobre de minérios de baixo teor: Peru, África, Austrália, Japão, Bulgária, Iugoslávia, etc. A

aplicação dessa técnica para recuperação de urânio de minério de baixo teor, foi posteriormente utilizada no Canadá, África do Sul, Portugal e também nos E.U.A. (KARAVAIKO & GROUDEV, 1985).

Apesar de ser uma prática antiga e bastante utilizada, a participação ativa de microrganismos no processo de lixiviação natural, era totalmente desconhecida até a bem pouco tempo. A participação de microrganismos na formação e degradação de depósitos minerais, a geomicrobiologia, é um estudo relativamente recente.

No final do século passado, o cientista russo Winogradsky, após uma série de estudos, formulou o conceito de litotrofia. Segundo esse princípio, certas bactérias obtêm energia da oxidação de substratos inorgânicos para fixar o CO_2 atmosférico. Os estudos de Winogradsky com a bactéria *Beggiatoa* sp., permitiram demonstrar que essa bactéria oxida H_2S a enxofre elementar, como forma de obter energia para seu crescimento (EHRlich, 1981).

Em 1902, Nathanshon cultivou uma bactéria em um meio mineral contendo tiosulfato de sódio como fonte energética. Dois anos mais tarde o microbiologista alemão Beijerinck caracterizou essa bactéria como sendo *Thiobacillus thioparus* (VISHNIAC & SANTER, 1957).

Uma das primeiras evidências da utilização de sulfetos metálicos como fonte de energia para o crescimento de bactéria foi estabelecida por RUDOLFS & HELBRONNER (1922). Nesse trabalho foi demonstrada a oxidação do sulfeto de zinco e da pirita (FeS_2) por microrganismos oxidantes de enxofre, porém não identificados.

Nesse mesmo ano, WAKSMAN & JOFFE (1922) conseguiram isolar e purificar uma bactéria que rapidamente oxidava enxofre elementar ao ácido sulfúrico. Foi utilizada uma mistura de enxofre, rocha fosfática e solo em água e o pH inicial de 6,2 caiu à 1,8 em trinta

dias. Utilizando essa suspensão como inóculo de um meio sintético estritamente mineral contendo enxofre como fonte de energia, e através de repiques sucessivos, conseguiu-se a purificação da espécie que eles denominaram *Thiobacillus thiooxidans*. Nessas condições, o pH do meio de cultura decresceu até aproximadamente 0,5.

Paralelamente a essas descobertas, um problema sério de poluição ambiental nas proximidades de minas de carvão começava a despertar a atenção de pesquisadores, sobretudo nos E.U.A. Águas efluentes dessas minas, e águas pluviais que percolavam pelos grandes montes de rejeitos contendo pirita, apresentavam alta acidez e significativas concentrações de elementos metálicos. Foi estimado em 1932, que cerca de 3.000.000 t de ácido sulfúrico foram lançadas no rio Ohio (Pennsylvania, E.U.A.), através da drenagem de minas de carvão dessa região norteamericana (PARAB *et alii*, 1972). Na década de 40, estudos realizados por pesquisadores do "U.S. Bureau of Mines" revelaram que bactérias oxidantes do enxofre estavam presentes nesses efluentes ácidos e que a oxidação do íon ferroso que ocorria nas águas ácidas de minas era muito mais rápida, se comparada a uma oxidação puramente química.

No final dos anos 40, COLMER & HINKLE (1947) evidenciaram claramente a participação de microrganismos na oxidação do íon ferroso presente nos efluentes ácidos de minas abandonadas. Dessa oxidação resulta a formação do íon férrico que nas condições desses efluentes (pH 2,0 - 3,0) precipita na forma de hidróxido de ferro (FeOH_3), o qual apresenta uma cor marron avermelhado. Em seus experimentos preliminares, esses autores constataram que se deixassem incubando um frasco contendo água ácida recém coletada (ainda sem precipitados), após uma semana ocorria a formação do precipitado mar-

ron. Utilizando vários agentes bactericidas (formol, fenol, mercúrio) e também esterilizando a água ácida por filtração em membrana, a formação do íon férrico não ocorria, mesmo após vários meses de incubação.

Em continuidade a esses estudos, COLMER *et alii* (1950) e TEMPLE & COLMER (1951) conseguiram isolar e purificar a bactéria responsável pela produção do íon férrico e também da acidez dos efluentes de minas de carvão nos E.U.A. Nesse último trabalho o nome específico *Thiobacillus ferrooxidans* foi sugerido, pois foi demonstrada a capacidade da bactéria em oxidar formas reduzidas de enxofre (*Thiobacillus*) e do ferro (*ferrooxidans*). Posteriormente, LEATHEN *et alii* (1956) isolaram uma bactéria com características básicas semelhantes ao *Thiobacillus ferrooxidans*. Como eles não conseguiram demonstrar a oxidação do enxofre por esse isolado, foi sugerido o nome *Ferrobacillus ferrooxidans*. Logo após, KINSEL (1960) isola uma cultura e sugere o nome *Ferrobacillus sulfooxidans*, pois a mesma apresentou capacidade de oxidar tanto o ferro quanto o enxofre.

Entretanto, conforme estudos minuciosos de HUTCHINSON *et alii* (1969) e de KELLY & TUOVINEN (1972), essas designações foram virtualmente abandonadas, pois esses autores não detectaram diferenças entre esses isolados e o *Thiobacillus ferrooxidans*. Dessa forma, apesar de ambos os nomes terem sido utilizados nas décadas de 50 e 60 por vários autores, hoje somente se utiliza *Thiobacillus ferrooxidans* para designar as bactérias que utilizam formas reduzidas de ferro e enxofre como fontes de energia.

Durante a década de 50 e início dos anos 60, foram publicados vários trabalhos, reportando o isolamento dessa espécie de águas ácidas de minas contendo sulfeto de cobre (BRYNER & JAMESON,

1960; CORRICK & SUTTON, 1961; RAZZEL & TRUSSELL, 1963). Nesses trabalhos foi evidenciada a ação oxidativa da bactéria sobre o sulfeto de cobre e assim definitivamente correlacionada a ativa participação bacteriana na "lixiviação natural" do cobre.

Assim, o período de 1947 a 1960 se caracterizou pelas principais descobertas e também pelos primeiros estudos básicos da fisiologia das bactérias que atuam no processo de biolixiviação de metais.

II.2. AS BACTÉRIAS DO PROCESSO

Além do *T. ferrooxidans*, que conforme salientado é a principal bactéria do processo de biolixiviação de metais, o *Thiobacillus thiooxidans* é também uma espécie que sempre está presente num ambiente de biolixiviação, e cuja participação no processo está suficientemente demonstrada. Entretanto, tem sido verificada a presença de outros tipos de microrganismos em pilhas de lixiviação de metais, alguns dos quais também participando do processo.

GROUDEV *et alii* (1978), investigando durante vários anos a microflora existente em uma pilha de lixiviação bacteriana, contendo cerca de 30 milhões de toneladas de minério sulfetado de cobre (Bulgária), detectaram a presença dos seguintes microrganismos: bactérias do gênero *Thiobacillus* (*T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*); bactérias do enxofre (sulfo-bactérias incolores, verdes e púrpura); bactérias do ferro (*Gallionella* e *Leptothrix*); bactérias redutoras de sulfato (*Dessulfovibrio*); bactérias heterotróficas (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*); alguns tipos de fungos (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, etc.); microalgas (*Ulothrix*); protozoários (*Amoeba*, *Euglena*, *Eutrephia*) e uma alga verde (*Hormidium*).

Obviamente, a população microbiana existente em um ambiente mineral é extremamente variável, em função da própria variação dos minerais presentes e das diferentes condições ecológicas do local. Mesmo presentes nesse ambiente de condições relativamente extremas (alta acidez e presença de metais tóxicos), a participação ativa da maioria desses microrganismos no processo de lixiviação não tem sido demonstrada.

Além do *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, poucas outras espécies tem a capacidade de utilizar sulfetos como fonte de energia para seu crescimento, tendo assim, alguma participação na lixiviação de metais. BALASHOVA *et alii* (1974) isolaram *Leptospirillum ferrooxidans* de depósito de cobre na Armênia (URSS) e demonstraram sua capacidade de crescer utilizando somente Fe^{2+} solúvel como fonte de energia, oxidando-o a Fe^{3+} .

Tendo sido demonstrada também, a oxidação de sulfeto metálico por espécies termófilas do gênero *Thiobacillus*, as quais diferem profundamente do *T. ferrooxidans* quanto à temperatura de crescimento (50 - 60°C) e a composição de DNA (% G + C). Tais espécies foram isoladas de pilhas de lixiviação, onde a temperatura no interior atinge até 80 - 90°C, e de fontes termais sulfurosas (BRIERLEY & LeROUX, 1977; BRIERLEY & LOCKHOOD, 1977; BRIERLEY, 1977; BRIERLEY & BRIERLEY, 1978; MARSH & NORRIS, 1983).

Tem sido demonstrada ainda, a presença em sistemas de lixiviação, de bactérias acidófilas e termófilas extremas. BROCK *et alii* (1972) isolaram e caracterizaram a espécie *Sulfolobus acidocaldarius*, a qual oxida compostos reduzidos de enxofre e ferro em temperaturas ao redor de 80°C e a pH em torno de 1,0.

Sobre a presença ativa ou não de microrganismos nos sistemas naturais de lixiviação ou ainda em condições de laboratório, existem várias revisões que discutem exaustivamente o assunto. Podem ser destacadas: TUOVINEN & KELLY (1974c), BRIERLEY (1978); LUNDGREN & SILVER (1980); KELLY *et alii* (1981); HARRISON, Jr. (1984); EHRLICH (1986).

Como já salientado anteriormente, a espécie *T. ferrooxidans* é uma das principais bactérias envolvidas na solubilização aci

da de metais contidos em minérios. Dessa forma e dentro do próprio objetivo do presente trabalho, serão apresentadas a seguir, as características básicas dessa espécie bacteriana.

II.3. *Thiobacillus ferrooxidans*

II.3.1. Características fisiológicas básicas

T. ferrooxidans é uma espécie não patogênica que se apresenta como pequenos bastonetes Gram-negativos, com dimensões médias de 0,5 a 0,8 μm de largura por 0,9 a 1,5 μm de comprimento e sua reprodução é por divisão binária simples (PIVOVAROVA & GOLOVACHEVA, 1985). A presença de um flagelo polar, que confere a propriedade de motilidade à espécie foi demonstrada (VISHINIAC, 1974). DiSPIRITO *et alii* (1982) demonstraram também a presença de flagelo e de "pelos" (fimbrias) em *T. ferrooxidans*.

A faixa de temperatura de seu crescimento situa-se entre 5° a 40°C, sendo que em torno de 30°C está a temperatura ótima de crescimento (LANDESMAN *et alii*, 1966). A espécie é aeróbica estrita e o pH ótimo de crescimento é aproximadamente 2,0, ocorrendo porém, crescimento numa faixa de 1,2 a 4,0 (GOLOMZIK & IVANOV, 1965; TUOVINEN & KELLY, 1972; PIVOVAROVA & GOLOVACHEVA, 1985). Diversos estudos tem mostrado um tempo de geração médio de 4 a 7 horas, dependendo das condições de cultivo desse microrganismo (McGORAN *et alii*, 1969; SHAFIA & WILKINSON, 1969; TUOVINEN & KELLY, 1975a; MANDL, 1984; LUNDGREN *et alii*, 1986).

T. ferrooxidans utiliza somente substratos inorgânicos para o seu crescimento, conforme amplamente demonstrado (SILVERMAN & LUDGREN, 1959a; UNZ & LUNDGREN, 1961; RAWLINGS, 1981). Basicamente a bactéria necessita de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (BECK & SHAFIA, 1964; HOWARD & LUNDGREN, 1970; TUOVINEN & KELLY, 1972; TUOVINEN *et alii*, 1979) e um substrato oxidável, que pode ser

o íon Fe^{2+} na forma de sulfato ferroso, enxofre elementar, tiosulfato ou ainda um sulfeto metálico, como por exemplo a pirita (FeS_2).

Conforme demonstraram CORRICK & SUTTON (1961) e LUNDGREN *et alii* (1964), sais de nitrito e aminoácidos (TUOVINEN *et alii*, 1979) não são utilizados como fonte de nitrogênio. Amônio, como sulfato, é a forma facilmente assimilada de nitrogênio, porém sais de nitrato também podem ser utilizadas por *T. ferrooxidans* (STEVENS & TUOVINEN, 1986). MacINTOSH (1971) investigou a capacidade de fixação do N_2 atmosférico por *T. ferrooxidans* e obteve resultados positivos. Mais recentemente, STEVEN *et alii* (1986), demonstraram a capacidade dessa espécie crescer sem adição de nitrogênio no meio de cultura, porém em uma taxa muito menor do que na presença desse elemento. Foi detectada inclusive, atividade da enzima nitrato redutase. Apesar desses estudos, dados mais conclusivos seriam necessários para se considerar o *T. ferrooxidans* como um fixador típico de nitrogênio atmosférico.

O isolamento dessa espécie é conseguido com uma certa facilidade, utilizando-se amostras (sólidas ou líquidas) provenientes de minas contendo minério sulfetado. Normalmente utiliza-se efluentes dessas minas, os quais já se apresentam ácidos devido à própria atividade da bactéria nos sulfetos presentes.

Dessa forma, consegue-se um rápido enriquecimento da espécie, por redução de outras eventualmente presentes, inoculando-se essas amostras em meios seletivos e realizando-se transferências sucessivas nesses meios. Após algumas passagens, a presença do *T. ferrooxidans* no meio, é praticamente exclusiva. Um dos meios mais utilizados nos estudos com essa bactéria é o chamado meio "9K", desenvolvido por SILVERMAN & LUNDGREN (1959a). Outro meio também utiliza

do é o meio "T & K", desenvolvido por TUOVINEN & KELLY (1973a), que se diferencia do primeiro na concentração do Fe^{2+} (~ 9 g/l no "9K" e ~ 6 g/l no "T & K" e dos outros nutrientes (N, P e Mg), bem como no pH inicial do meio: 2,8 no meio "9K" e 1,3 no "T & K".

Vários outros tipos de meios também foram desenvolvidos por outros pesquisadores, porém as diferenças são apenas nas concentrações de nutrientes (em alguns casos eliminação de algum) e no pH inicial (TEMPLE & COLMER, 1951; BECK & ELSDEN, 1958; BECK, 1960; CORRICK & SUTTON, 1961; UNZ & LUNDGREN, 1961).

Se por um lado o cultivo em meio líquido é simples, a obtenção de colônias em meio sólido requer cuidados especiais. É praticamente descartado o uso de agar comum como agente solidificante do meio de cultura, pois a presença no agar de açúcares solúveis, normalmente a galactose, inibe o crescimento da espécie. Apesar de alguns trabalhos indicarem o uso de agar como agente solidificante (COLMER *et alii*, 1950; LEATHEN *et alii*, 1956), foi demonstrado por TUOVINEN & KELLY (1973a) que somente tipos purificados de agar permitem o crescimento do *T. ferrooxidans*. Nesse trabalho, somente em agarose e "Japanese agar" (ultra puros), os autores obtiveram um crescimento colonial significativo. Outros tipos testados com resultados positivos foram "OXOID-L28" (MANNING, 1975) e "BAPCO agar" e carragenato (outro tipo de gelatina de algas marinhas), conforme demonstrado por MISHRA *et alii* (1983).

Outra alternativa para solidificação de meio de cultura para *T. ferrooxidans*, é o gel de ácido silícico. Esse ácido pode ser obtido pela passagem de uma solução de silicato de sódio em uma resina catiônica forte. Os íons Na^+ são trocados com o H^+ da resina, eluindo dessa forma o ácido silícico. Vários trabalhos apresentam téc

nicas simples baseadas nesse princípio, para obtenção do gel de ácido silícico (KINGSBURY & BARGHOORN, 1954; ROSLYCKY, 1972; THATCHER & WEAVER, 1974). Especificamente para cultivo de *T. ferrooxidans* em gel de ácido silícico, destaca-se a metodologia de GOODMAN *et alii* (1980).

T. ferrooxidans é uma bactéria quimiolitotrófica. Isto é, a energia necessária para o seu crescimento é obtida pela oxidação de substratos inorgânicos, a qual é utilizada para fixação do CO₂ atmosférico. Apesar de alguns trabalhos indicarem uma possível utilização de substrato orgânico para seu crescimento, tornando-a assim uma autotrófica facultativa (SHAFIA & WILKINSON, Jr., 1969; TABITA & LUNDGREN, 1971; TUOVINEN & NICHOLAS, 1975; TUOVINEN & KELLY, 1978), um minucioso trabalho de HARRISON Jr., *et alii* (1980) mostrou a presença de uma bactéria heterotrófica acidófila como um contaminante quase sempre presente, nas culturas "puras" de *T. ferrooxidans*. Logo em seguida esse mesmo autor (HARRISON Jr., 1981) isolou, purificou e caracterizou esse contaminante heterotrófico como *Acidiphilium cryptum*, o qual utiliza compostos orgânicos liberados no meio de cultura pelo metabolismo do *T. ferrooxidans*.

Entretanto, BARROS *et alii* (1984) demonstraram inequivocamente crescimento mixotrófico (Fe²⁺ + glicose) de uma linhagem de *T. ferrooxidans*. Foi demonstrada a ausência de *A. cryptum* da cultura, conforme indicado pelo conteúdo em % molar do DNA (G + C), específico do *T. ferrooxidans*.

Independente desses estudos, que mostram a possibilidade de heterotrofia e mixotrofia em algumas linhagens de *T. ferrooxidans*, é importante destacar novamente, que em condições naturais (por exemplo em uma pilha de lixiviação) e que na maioria das culturas dessa bactéria, estudada por inúmeros pesquisadores, a autotrofia é uma

definição da espécie e a inibição do crescimento por compostos orgânicos (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos) é praticamente aceita como uma característica geral em *T. ferrooxidans* (GALE & BECK, 1967; MATIN, 1978).

Por outro lado, uma característica fisiológica marcante nessa espécie, é a sua generalizada resistência a altas concentrações de íons metálicos, aspecto esse de elevado interesse prático no processo biometalúrgico. De acordo com as revisões de BRIERLEY (1978), LUNDGREN & SILVER (1980) e HUTCHINS *et alii* (1986), *T. ferrooxidans* apresenta resistência ao alumínio (0,37M), zinco (0,15M), cobalto (0,17M), manganês (0,18M), cobre (0,16M), cromo (0,1M) e urânio (0,01M). Por outro lado, existem elementos que são tóxicos ao *T. ferrooxidans*, mesmo em baixas concentrações. São os casos da prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M) e molibdênio (10^{-3} M). Ânions de selênio, telúrio e arsênio são também inibidores em concentrações relativamente baixas ($\sim 10^{-3}$ M).

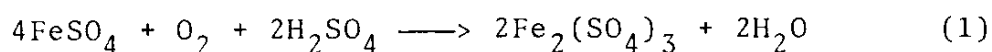
É interessante notar que o íon ferroso (Fe^{2+}), substrato para o crescimento da bactéria, e o íon férrico (Fe^{3+}) produto da oxidação bacteriana, podem ser inibidores do *T. ferrooxidans*, dependendo de suas concentrações, conforme demonstrado por WONG *et alii* (1974), KELLY & JONES (1978) e JONES & KELLY (1983).

A rigor, essa quase generalizada resistência a metais em *T. ferrooxidans* é mais ou menos lógica, pois no próprio ambiente natural onde essa espécie vive, a presença de metais dissolvidos é uma constante. Assim, a seleção de tipos resistentes aconteceu ao longo da evolução da espécie. Os mecanismos dessa resistência em espécies do gênero, bem como no próprio *T. ferrooxidans* não são muito conhecidos. Acredita-se que genes presentes em plasmídios (a ser discuti

do no item II.3.4.) são os codificadores dessa resistência (CHAKRABARTY, 1978; DAVIDSON & SUMMERS, 1983; HUTCHINS *et alii*, 1986), pois em bactérias heterotróficas, a correlação entre genes plasmidiais e resistência a metais tóxicos tem sido bem demonstrada (HEDGES & BAUMBERG, 1973; SUMMERS & JACOBY, 1977; TETAZ & LUKE, 1983). Entre alguns mecanismos fisiológicos relacionados à resistência a metais tóxicos (concentração intracelular e inativação do metal, redução da absorção do metal a nível de parede celular, etc.), a metilação, e conseqüente volatilização do metal, é um mecanismo demonstrado em *T. ferrooxidans*. OLSON *et alii* (1981, 1982) e BOOTH & WILLIAMS (1984), estudando a toxicidade do mercúrio nessa espécie, demonstraram de forma inequívoca esse mecanismo, porém sem correlacionar com a possível codificação por plasmídios. Boas revisões sobre possíveis mecanismos envolvidos na resistência à metais, são as de SUMMERS & SILVER (1978) e ROBINSON & TUOVINEN (1984).

II.3.2. Oxidação do Fe^{2+} e fixação do CO_2 atmosférico

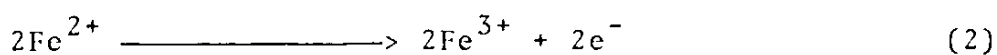
A energia necessária para os processos bioquímicos e fisiológicos do *T. ferrooxidans* vem da oxidação do íon Fe^{2+} (e outros substratos que serão vistos posteriormente), segundo a seguinte equação geral:



Como resultado de cerca de 30 anos de pesquisa, existe uma nimidade com relação a estequiometria dessa reação, sobretudo em re

lação ao oxigênio consumido em função do íon Fe^{2+} oxidado. Medindo-se experimentalmente o consumo de oxigênio durante a oxidação do Fe^{2+} por suspensões celulares lavadas ("resting cells"), pela técnica manométrica de Warburg (BECK & ELSDEN, 1958; SILVERMAN & LUNDGREN, 1959) ou por eletrodo-íon-específico para O_2 (DISPIRITO & TUOVINEN, 1982a,b), esses autores obtiveram cerca de 95% da quantidade teórica de O_2 esperada pela reação (1).

Os elétrons transferidos na reação de oxidação do Fe^{2+} , liberam a energia para fosforilação do ADP, sendo o O_2 o acceptor final dos elétrons, conforme as reações abaixo:



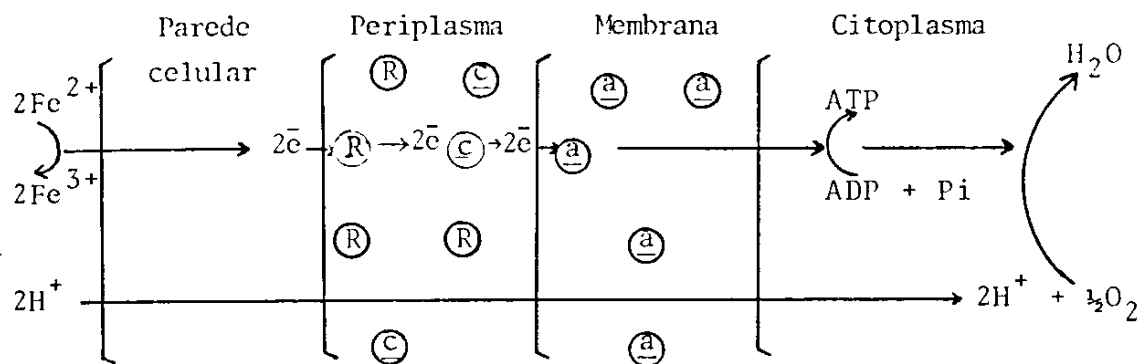
A taxa de oxidação do íon ferroso é bem rápida. Baseando-se em 250 μmol a 500 μmol de Fe^{2+} oxidado, os valores de oxigênio consumido atingem 2.000 a 6.000 μl de $\text{O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína total⁻¹ (LUNDGREN *et alii*, 1986). Apesar dessas taxas serem relativamente elevadas, a quantidade de energia liberada na oxidação do Fe^{2+} é baixa. TUOVINEN & KELLY (1972) calcularam que em ótimas condições, cerca de apenas 7 KCal/mol Fe^{2+} oxidado são produzidos. Como para formação de ATP a partir de ADP + Pi são necessárias cerca de 14 KCal, é preciso então, serem oxidados 2 moles de Fe^{2+} para formação de 1 mol de ATP.

Assim, grandes quantidades de Fe^{2+} tem que ser processadas, para fornecer um suprimento adequado de energia (ATP) para fixação do CO_2 atmosférico e demais metabolismos celulares. LUNDGREN *et*

alii (1986) estimaram que cerca de $2,8 \times 10^6$ átomos de Fe^{2+} são oxidados por segundo por célula, admitindo-se igual atividade de todas as células de uma cultura.

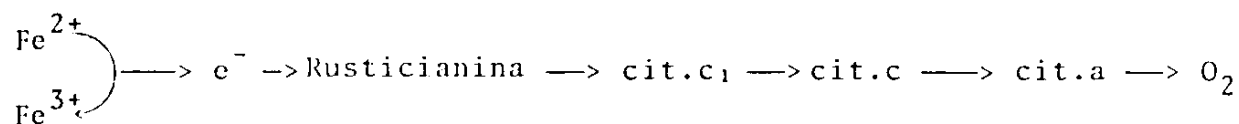
Os principais componentes que transferem os elétrons dos substratos oxidados, na cadeia respiratória dessa bactéria estão praticamente elucidados, conforme um sumário apresentado por INGLEDEW (1986). O sistema ferro-oxidase é um complexo enzimático situado na membrana da célula (PECK, 1968; INGLEDEW & COBLEY, 1980; SUGIO *et alii*, 1981). Esse sistema é composto por quatro proteínas: citocromo a₁, dois citocromos tipo c e rusticianina, uma proteína contendo cobre como grupo prostético. Essa é uma proteína de peso molecular baixo (16.300), situada no periplasma (espaço entre parede celular e membrana) e é o acceptor inicial dos elétrons do substrato oxidável, no caso o íon ferroso (COBLEY & HADDOCK, 1975; COX & BOXER, 1978).

Segundo INGLEDEW *et alii* (1977), o sistema de captação e transferência de elétrons durante a oxidação do íon ferroso, pode ser representado conforme o seguinte esquema:



onde: R = Rusticianina; c = citocromos c; a = citocromo a.

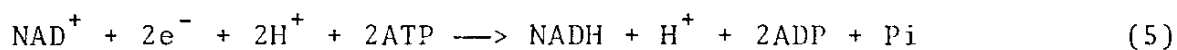
Dessa forma, a seqüência de elétrons seria:



(INGEDEV & COBLEY, 1980).

Em *T. ferrooxidans* não há prótons associados à fonte energética oxidável (Fe^{2+}). Conforme a equação (4), existe a necessidade de H^+ para redução do O_2 e para estabelecer um gradiente elétrico através da membrana; de fato, existe esse gradiente, o qual determina um potencial elétrico suficiente (~ 250 mV) para permitir a formação do ATP. Além disso, H^+ é necessário também para redução de nucleotídeos de pirimidinas (NAD e NADP), os quais são necessários para fixação do CO_2 atmosférico (ALEEM & LEES, 1963; APEL & DUGAN, 1978). Como o pH ótimo de crescimento do *T. ferrooxidans* é em torno de 2,0 e o pH interno celular situa-se próximo à neutralidade ($\sim 6,5$), esse ΔpH confere o gradiente de membrana, e conseqüentemente, o potencial elétrico requerido na formação do ATP (COBLEY & COX, 1983), bem como o suprimento necessário de H^+ , para a redução do O_2 e do NAD e NADP. Segundo APEL & DUGAN (1978), isso pode explicar a natureza acidofílica obrigatória do *T. ferrooxidans*.

Segundo LUNDGREN & SILVER (1980), as reações de redução de NAD e NADP são:



Assim, as reações de fixação do CO_2 atmosférico por *T. ferrooxidans* estão acopladas à produção de energia da oxidação do Fe^{2+} e de outros compostos oxidáveis. O passo da fixação do CO_2 atmosférico é o ciclo de Calvin ("reductive pentose phosphate"), que

inclue duas características reações enzimáticas: a) fosforilação da ribulose-5-fosfato catalisada pela fosforibulose quinase para produção da ribulose 1,5 difosfato e b) reação de uma molécula de CO_2 com uma molécula de ribulose 1,5 difosfato mediada pela ribulose difosfato carboxilase (RuDPase), para formação de 2 moléculas de 3-fosfoglicerato, e finalmente glicose. Dessa forma o CO_2 é então incorporado pelo *T. ferrooxidans* para construção de suas biomoléculas. Inúmeros autores tem estudado a fixação do CO_2 por *T. ferrooxidans* destacando-se BECK & SHAFIA (1964), DIN *et alii* (1967), GALE & BECK (1967), TUOVINEN & KELLY (1972, 1973a, 1974b).

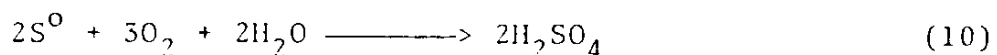
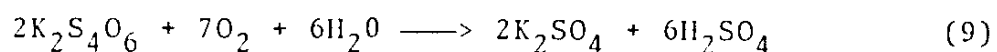
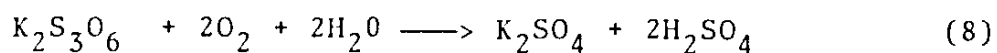
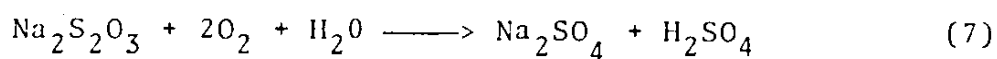
II.3.3. Oxidação de outros substratos

Como já salientado anteriormente, *T. ferrooxidans* obtém energia para seu crescimento, através de reações de oxidação de substratos inorgânicos. Além de utilizar o íon ferroso (já discutido), compostos inorgânicos de enxofre também são oxidados por essa bactéria.

Enxofre elementar (S^0), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e tetrionato ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) são utilizados como fonte energética para o crescimento de *T. ferrooxidans*. A maioria das pesquisas sobre a bioquímica da oxidação do enxofre e seus compostos reduzidos, tem sido feita com outras espécies do gênero *Thiobacillus*. Entretanto, mesmo havendo pouco estudos em *T. ferrooxidans* que demonstram mecanismos semelhantes nessa espécie, é razoável imaginar que tal mecanismo deve, com ligeira variações, ser comum às espécies do gênero.

TUOVINEN (1977), SILVER (1978) e KELLY (1982, 1985) apresentam excelentes revisões sobre o metabolismo oxidativo dos compostos inorgânicos de enxofre em *Thiobacillus*. Dos resultados obtidos por inúmeros pesquisadores, pode-se generalizar que o sulfito (SO_3^{2-}) é uma molécula intermediária chave no metabolismo. Os substratos citados, S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, são oxidados a SO_3^{2-} , o qual é posteriormente oxidado ao produto final, SO_4^{2-} (LUNDGREN & SILVER, 1980).

Conforme destacado por KELLY & TUOVINEN (1975) as seguintes reações expressam a utilização dos compostos inorgânicos de enxofre por *Thiobacilli*:

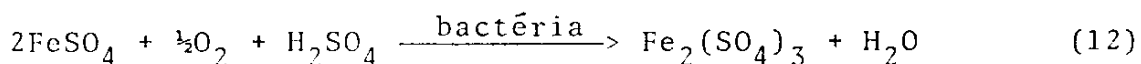
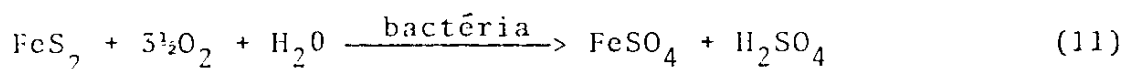


Como pode ser visto, todas as reações são geradoras de ácido sulfúrico. Em termos práticos, a reação (10) é de grande importância em uma pilha de lixiviação, uma vez que durante a oxidação dos sulfetos metálicos (a ser visto posteriormente), o enxofre (S^0) é formado. Dessa forma, haverá disponibilidade de substrato para formação de H_2SO_4 , importante agente na dissolução dos minerais presentes na pilha.

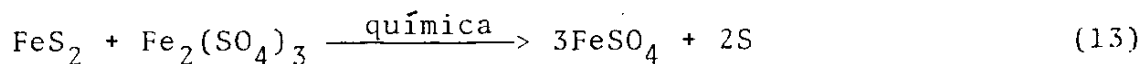
A energia para fixação do CO_2 atmosférico e conseqüente crescimento do *Thiobacilli* é produzida pela oxidação desses compostos, pela interação de uma série de enzimas: oxidases do enxofre, sulfeto, tiosulfato e sulfito, rodanese, ADP sulfurilase, APS redutase, adenilato quinase, etc. (TUOVINEN *et alii*, 1976; TANO & LUND

GRE^N, 1978; McKELLAR *et alii*, 1980; LU & KELLY, 1983; LU *et alii*, 1985). A presença de transportadores de elétrons (citocromos) no sistema oxidativo dos compostos inorgânicos de enxofre dos *Thiobacilli*, também está suficientemente demonstrada (COOK & UMBREIT, 1963; LONDON, 1963; LU & KELLY, 1984a,b).

Além desses compostos inorgânicos do enxofre, um aspecto relevante do metabolismo do *T. ferrooxidans* no que se refere à sua importância biotecnológica, é a sua capacidade de oxidar sulfetos metálicos insolúveis. Basicamente a ação bacteriana nos substratos minerais oxidáveis, como por exemplo a pirita (FeS_2), resulta na produção de dois eficientes agentes da lixiviação ácida de metais: ácido sulfúrico e íons férrico (Fe^{3+}); em outras palavras, uma solução ácida de sulfato férrico (SILVERMAN, 1967; NAPIER *et alii*, 1968; ATKINS, 1978; YAKHONTOVA *et alii*, 1980; KELLER e MURR, 1982; VUORINEN *et alii*, 1983; MAHAPATRA *et alii*, 1985). As reações abaixo mostram esse processo oxidativo do *T. ferrooxidans* sobre a pirita:



O sulfato férrico produzido pela reação (12) tem uma ação fortemente oxidativa sobre a pirita e sulfetos metálicos em geral. Assim:



O sulfato ferroso produzido na reação (13) é novamente oxidado bacterianamente a sulfato férrico conforme a reação (11) e o enxofre é também oxidado pela bactéria à ácido sulfúrico, conforme a equação (10), vista anteriormente.

Desde o isolamento do *T. ferrooxidans*, inúmeros trabalhos tem demonstrado a oxidação da pirita por essa espécie bacteriana (SILVERMAN *et alii*, 1961; HILTUNEN *et alii*, 1981; WAKAO *et alii*, 1982). Deve-se salientar que essa propriedade oxidativa, determinou uma série de estudos propondo um processo biotecnológico específico para remoção do enxofre pirítico do carvão. Apesar de não ser ainda aplicado em escala comercial, existe uma grande potencialidade para sua utilização conforme demonstrado por KARGI (1982), ANDREWS & MACZUGA (1984), MYERSON & KLINE (1984) e ANDREW *et alii* (1988).

Além do exemplo clássico da oxidação da pirita, tem sido evidenciado que o *T. ferrooxidans* obtém energia a partir da oxidação de outros sulfetos metálicos. TORMA & SAKAGUCHI (1978) investigando a oxidação de vários sulfetos metálicos por *T. ferrooxidans*, demonstraram essa capacidade e até estabeleceram uma ordem na taxa de oxidação: NiS > CoS > ZnS > CdS > CuS > Cu₂S.

Além desse trabalho, outros autores tem investigado e comprovado a ação oxidativa do *T. ferrooxidans* em CoS (GROUDEV, 1981a; SUGIO *et alii*, 1984), em sulfetos de cobre como CuFeS₂, Cu₂S e CuS (SAKAGUCHI & SILVER, 1976; SAKAGUCHI *et alii*, 1976; GROUDEV & GENCHEV, 1978; YUKAWA *et alii*, 1978), em ZnS (GORMELY *et alii*, 1975), NiS (GROUDEV, 1982), PbS (TORMA & SUBRAMANIAN, 1974) e AsFeS₂ (GROUDEV, 1981b).

Sob a ação do *T. ferrooxidans*, o sulfeto metálico involúvel transforma-se em sulfato solúvel do metal específico. A oxidação da

covelita (CuS) por exemplo, pode ser expressa pela seguinte reação:



Esse metabolismo oxidativo bacteriano pode ser expresso de forma generalizada pela seguinte reação:



onde M é um metal bivalente.

Finalmente, vale destacar que além desses sulfetos, o *T. ferrooxidans* pode utilizar energia proveniente da oxidação do íon uranoso (U^{4+}) ao íon uranila (U^{6+}). Obviamente sob o ponto de vista aplicado, tal metabolismo não apresenta um grande significado. Isto porque, essa atividade é extremamente baixa, como tem sido revelada pela utilização de métodos muito sensíveis e em condições experimentais rigorosas, pois o íon Fe^{3+} (oxidante do U^{4+}) deve estar completamente eliminado do meio de reação. Dessa forma, SOLJANTO & TUOVINEN (1980), utilizaram microcalorimetria e demonstraram que o calor liberado na oxidação do U^{4+} era devido à presença de suspensões de células lavadas de *T. ferrooxidans*. Na ausência de células ou em presença de células mortas, tal calor não foi detectado. Posteriormente, uma série de experimentos de respirometria, também com suspensões lavadas de *T. ferrooxidans*, evidenciou a oxidação bacteriana do íon U^{4+} (DISPIRITO & TUOVINEN, 1980, 1982a,b).

II.3.4. Estudos genéticos

Apesar de haver um razoável acúmulo de conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica do *T. ferrooxidans*, poucos trabalhos tem sido realizados objetivando-se um melhoramento do processo de lixiviação, pela manipulação genética do microrganismo. Os sistemas de lixiviação, como será discutido posteriormente, operam de forma tão aberta, que prioritariamente desenvolvem-se populações naturais de microrganismos.

Como previamente citado (TUOVINEN & KELLY, 1972), o ambiente natural de lixiviação por sua própria natureza, é um potente agente para selecionar não só espécies, mas também linhagens mais eficientes nessas condições ambientais rigorosas (alta acidez, concentrações elevadas de metais, etc.). Assim, inocular uma pilha com uma linhagem "melhorada" geneticamente, provavelmente seria um procedimento com poucas chances de resultado positivo.

Além desse aspecto, as dificuldades do cultivo dessa espécie em meio de cultura sólido, como já salientado, determinaram durante muitos anos um desinteresse por estudos sobre a genética do *T. ferrooxidans*. Como é perfeitamente sabido, o cultivo de microrganismos em meio sólido é fundamental para realização desses estudos.

Entretanto, conforme destacado por CHAKRABARTY (1978) e CRIPPS (1980), e também conforme será discutido posteriormente, um nível tecnológico mais elevado do processo, deverá ser requerido em um futuro relativamente próximo. Isso se deve ao fato que o aproveitamento de concentrados sulfetados (e não mais minério de baixo teor) ou de materiais contendo metais valiosos (ouro, por exemplo), deverá ser feito em bio-reatores, em sistemas operacionais contínuos. Co

mo tais sistemas exigem controles rigorosos, obviamente linhagens bacterianas melhoradas geneticamente poderão (e deverão) ser usadas.

A princípio, algumas linhas podem ser identificadas como objetivos básicos de um programa de melhoramento genético: taxas mais elevadas de oxidação dos substratos sulfetados, maior resistência a metais tóxicos e maior resistência a níveis mais elevados de acidez, são algumas linhas que poderão determinar maior produtividade da lixiviação bacteriana. Mesmo não tendo atingido ainda esse estágio tecnológico mais elevado, é de fundamental importância que trabalhos nessa área sejam realizados, para que os conhecimentos gerados sirvam de base científica para futuras aplicações práticas.

Em função de toda essa potencialidade tecnológica e também do próprio conhecimento científico do sistema genético dessa interessante espécie bacteriana, sobretudo sua alta resistência a metais tóxicos, nota-se um crescente interesse na genética molecular do *T. ferrooxidans*.

Entretanto, antes de se discutir esses estudos, deve-se começar mencionando os estudos pioneiros de genética de *T. ferrooxidans*, realizados por V.I. Groudeva e seus colaboradores na Bulgária, no final da década passada.

Curvas de sobrevivência a agentes mutagênicos e posteriormente, indução de linhagens mutantes em relação a níveis de atividade oxidativa do íon Fe^{2+} e do S^0 , foram realizadas utilizando-se radiação U.V. (GROUDEVA *et alii*, 1978a,b), etilenimina (GROUDEVA *et alii*, 1978c) nitrosoguanidina (GROUDEVA *et alii*, 1980). Nesses trabalhos foi obtida uma variabilidade induzida que variou de 20 a 180% em relação a atividade oxidativa da linhagem selvagem. Variabilidade genética natural, também foi detectada em diversos isolados do *T.*

ferrooxidans em relação a resistência a íons cobre (GROUDEVA *et alii*, 1981). DiSPIRITO & TUOVINEN (1982b) examinaram 13 linhagens de *T. ferrooxidans* isoladas da mina de urânio Agnew Lake (Canadá) e constataram também, uma grande variabilidade entre os isolados em relação à resistência ao urânio e ao tório, e à parâmetros cinéticos (Km e Vmax).

Outro trabalho interessante sobre variabilidade genética natural na espécie, foi desenvolvido por HARRISON Jr. (1982). Diversidade genômica (7 grupos de homologia de DNA) e fisiológica foram detectadas entre 23 linhagens de *T. ferrooxidans* procedentes de várias partes do mundo.

Em termos práticos, GROUDEV (1980a,b) testou 134 linhagens de *T. ferrooxidans* procedentes de várias minas da Bulgária, com relação à suas atividades de lixiviação de esfalerita (ZnS) e covelita (CuS). Foi encontrada também, uma significativa variabilidade genética entre as linhagens testadas. Ainda em relação a potencialidade de utilização de linhagens mais eficientes (ou selecionadas naturalmente ou induzidas por mutação) em processos de lixiviação, GROUDEV & GROUDEV (1980a,b), apresentam resultados experimentais interessantes: em experimentos de lixiviação de calcopirita ($CuFeS_2$) em frascos agitados, uma linhagem selvagem (V-12) lixiviou 9,4% do cobre em 10 dias enquanto que um mutante derivado da mesma linhagem (V-12-22) lixiviou nas mesmas condições 42,5%.

Todas essas informações não deixam dúvidas, conforme destacado inicialmente, quando à potencialidade do melhoramento genético no sentido de tornar mais eficiente o processo de lixiviação. Deve-se, entretanto, citar novamente que essa aplicação só é compreensível em um sistema operacional controlado, e não em uma operação quase aleatória de lixiviação em pilhas.

Logo após a publicação desses primeiros trabalhos, MAO *et alii* (1980) em um estudo pioneiro, deram o "tiro de partida" no desenvolvimento da genética molecular do *T. ferrooxidans*. Como um prelúdio para caracterização de aspectos genéticos da expressão de várias propriedades interessantes dessa espécie bacteriana, esse estudo descreve um procedimento prático para detectar e isolar DNA plasmidial. Como já havia sido sugerido (CHAKRABARTY, 1978; SUMMERS & SILVER, 1978; KELLY *et alii*, 1979), uma das características mais interessantes nessa espécie e que pode ser codificada por genes plasmidiais, é a sua generalizada resistência a metais.

Posteriormente, MARTIN *et alii* (1981) determinaram o padrão plasmidial em 15 linhagens de *T. ferrooxidans* de diversas procedências. Somente em 4 linhagens, nenhum plasmídio foi detectado e nas demais, diferenças na composição de plasmídios de cada linhagem foram observadas. Destaca-se que uma das linhagens apresentou 5 plasmídios diferentes. Entretanto, a presença desses plasmídios não foi correlacionada com a resistência a metais, ou a outra característica qualquer. TUOVINEN *et alii* (1981) também descreveram a presença de plasmídios, em *T. ferrooxidans* isolado da mina de urânio Agnew Lake no Canadá, sem contudo demonstrar sua correlação com a resistência aos altos teores de urânio desses licores.

Depois da publicação desses trabalhos, mais voltados para o estabelecimento de metodologia e para a detecção de plasmídios na espécie, HOLMES *et alii* (1983) e RAWLINGS *et alii* (1983), apresentaram mapas de restrição de plasmídios isolados de diferentes linhagens de *T. ferrooxidans*, bem como marcadores genéticos nessas linhagens (resistência a metais e a antibióticos). Com relação à resistência a antibióticos, deve-se destacar que alguns antibióticos per-

dem sua atividade no meio de cultivo 9K (pH ~2,5), como foi o caso de cloranfenicol (RAWLINGS *et alii*, 1983). Entretanto, outros antibióticos testados (rifamicina, ampicilina, etc.), mostraram-se estáveis nesse meio ácido (testes com bactérias heterotróficas acidofílicas em meio ácido e não ácido).

Dessa forma, marcadores genéticos em plasmídios de *T. ferrooxidans* já são conhecidos, o que é de fundamental importância para a execução de estudos de recombinação genética nessa espécie.

Dentro dessa linha de pesquisa RAWLINGS *et alii* (1984a,b) conseguiram clonar um plasmídio de *T. ferrooxidans* em plasmídio de *E. coli* (pBR 325), sendo que o recombinante obtido mostrou replicação em *E. coli*, usando a origem de replicação localizado no plasmídio do *T. ferrooxidans*. Dessa forma foi possível demonstrar a expressão de um gene de bactéria autotrófica (*T. ferrooxidans*) em uma heterotrófica (*E. coli*). Paralelamente, HOLMES *et alii* (1984) e DOLAN & TUOVINEN (1985) conseguiram clonar plasmídios de outras linhagens de *T. ferrooxidans*, em *E. coli*, utilizando como vetores o pBR 322 e o pUC8.

Apesar desses trabalhos evidenciarem uma grande possibilidade desses plasmídios conterem os genes para resistência a metais e substâncias tóxicas, eles são ainda considerados crípticos, pois não se conseguiu demonstrar resistência a esses inibidores nas linhagens de *E. coli* transformadas (WOODS & RAWLINGS, 1985). Discussões recentes sobre a genética molecular de *T. ferrooxidans* são encontradas nos capítulos VI e VII do Biotechnology and Bioengineering Symposium N° 16 (1986). Mais recentemente ainda, outros tipos de estudos de genética molecular (determinação de seqüências repetidas de DNA e de seqüências de inserção), tem sido publicados (YATES & HOLMES, 1987; SCHRADER & HOLMES, 1988; YATES *et alii*, 1988).

Como pôde ser notado, os estudos em genética básica e molecular com *T. ferrooxidans* apesar de relativamente recentes (8 - 10 anos), estão caminhando rapidamente para sua consolidação. Isto, sem dúvida, além de permitir a aquisição de conhecimentos básicos dos microrganismos quimiolitotróficos acidofílicos, poderá determinar um novo perfil tecnológico na biometalurgia, pois linhagens bacterianas mais eficientes poderão ser isoladas ou mesmo "construídas".

II.4. A BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS

II.4.1. Mecanismo da lixiviação bacteriana

Como já destacado anteriormente, metais podem ser solubilizados de seus minerais, pela atividade metabólica da bactéria *T. ferrooxidans*.

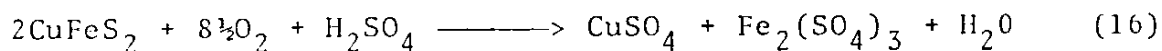
Numa visão geral, o processo de lixiviação bacteriana de metais consiste de uma série de reações bioquímicas e químicas, que solubilizarão o metal de forma direta, quando a própria bactéria ataca o sulfeto, ou de forma indireta, quando os produtos do metabolismo bacteriano atuam sobre o sulfeto metálico.

Existia até a pouco tempo, alguma controvérsia sobre esse mecanismo direto de oxidação dos sulfetos metálicos, pela bactéria. No caso da FeS_2 por exemplo, acreditava-se que ocorria uma oxidação puramente química no início, formando o $FeSO_4$, conforme a reação (11); o sulfato ferroso solúvel formado era então oxidado a sulfato férrico pela bactéria. Esse produto, conforme já salientado, tem um eficiente poder lixivante sobre sulfetos em geral, incluindo a própria pirita (ver reações 12 e 13). Dessa forma fechava-se o ciclo. Em função desse mecanismo que de fato realmente ocorre, acreditava-se que a lixiviação bacteriana era um processo fundamentalmente indireto.

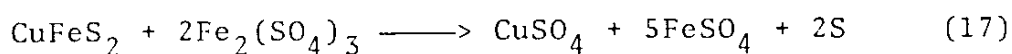
Entretanto, inúmeras pesquisas confirmam que na verdade os dois mecanismos oxidativos (direto e indireto) ocorrem simultaneamente em um sistema de lixiviação. Além dos trabalhos já citados no item II.3.3, devem ser mencionados os estudos de GAIDARJIEV *et alii* (1975), GROUDEV (1979) e KELLY *et alii* (1979). Embora o mecanismo di

reto de ataque bacteriano ao sulfeto é inferido de observações microscópicas da adsorção da bactéria ao sulfeto (LUNDGREN & TANO, 1978; BERRY & MURR, 1978; KINGMA *et alii*, 1980; MURR & MEHTA, 1982; RODRIGUEZ-LEIVA & TRIBUTSCH, 1988), podendo ser visualizada microscopicamente a corrosão do sulfeto nesses pontos de adsorção bacteriana, a melhor evidência do ataque direto vem de estudos com sulfetos sintéticos, livres de ferro (ferroso ou férrico) e com suspensões celulares lavadas (TORMA, 1971). Nesse trabalho fica evidenciado o consumo de oxigênio por *T. ferrooxidans* (respiração) e a solubilização do sulfeto metálico.

Além do clássico exemplo da oxidação bacteriana da pirita, já apresentado nas reações (11), (12) e (13), a oxidação direta da calcopirita (CuFeS_2), um dos principais minerais de cobre, pode ser resumida conforme a reação abaixo:



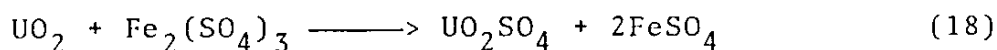
Da mesma forma que no caso da pirita, o sulfato férrico produzido na reação (16), tem uma eficiente ação oxidativa sobre a calcopirita, solubilizando mais cobre (na forma de CuSO_4), conforme a reação abaixo:



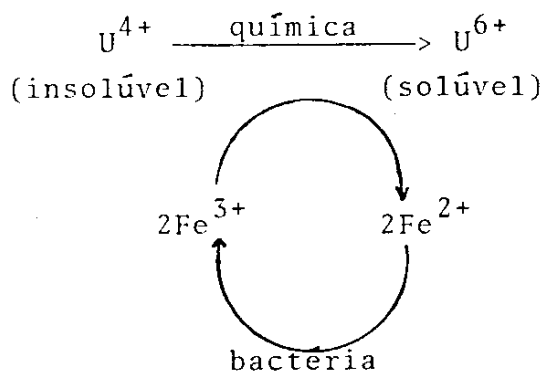
Além do cobre, nota-se a formação de FeSO_4 e S^0 , os quais são oxidados bacterianamente à sulfato férrico e ácido sulfúrico, respectivamente (ver reações 12 e 10).

As reações (16) e (17) ilustram respectivamente, os mecanismos direto e indireto da lixiviação bacteriana de metais. No ca-

so específico do urânio, pode-se considerar como significativo em termos práticos, apenas o mecanismo indireto de lixiviação. Normalmente os minérios de urânio não existem como sulfetos; eles estão geralmente na forma de um óxido insolúvel, sendo que o elemento apresenta-se em seu estado reduzido U^{4+} . Entretanto, se a pirita estiver associada ao minério, fato relativamente comum, acarreta a ação da bactéria sobre esse sulfeto, gerando o íon Fe^{3+} e H_2SO_4 , como já foi visto. Assim, esses produtos determinarão a solubilização indireta do mineral de urânio, conforme a reação abaixo:



Novamente o sulfato ferroso (Fe^{2+}) formado será reoxidado bacterianamente a sulfato férrico (Fe^{3+}), estabelecendo dessa forma um ciclo, conforme esquema abaixo:



Cobre e urânio são os metais que tem sido recuperados industrialmente pela técnica da lixiviação bacteriana, conforme já salientado. Dos outros metais citados como potencialmente recuperáveis pela biometalurgia (Zn, Cd, Ni, etc..), o ouro é o que vem merecendo maior atenção dos pesquisadores; unidades piloto já em operação

em países como África do Sul, Canadá, E.U.A. e URSS, evidenciam claramente esse crescente interesse (ATTIA *et alii*, 1984; CASSA & ANDRADE, 1985; GILBERT *et alii*, 1988).

Como exemplo de mecanismo de lixiviação, o caso do ouro difere na sua concepção do mecanismo direto da lixiviação do cobre e do indireto do urânio. Na verdade a biolixiviação do ouro não é propriamente uma "biolixiviação", mas sim, um pré-tratamento de minerais que contém ouro. Em certos minérios o ouro pode estar retido em uma rede cristalina de sulfetos (pirita ou arsenopirita). Nessas condições, o método convencional de recuperação do ouro por complexação com cianeto torna-se pouco eficiente. Uma forma de eliminar o sulfeto é proceder a queima ("roasting") deste a altas temperaturas. Assim, o ouro metálico torna-se exposto e passível de complexação pelo cianeto.

A alternativa biometalúrgica baseia na oxidação do sulfeto pelo *T. ferrooxidans*, transformando-o em produtos solúveis, conforme amplamente discutido. Dessa forma, o ouro torna-se também exposto, possibilitando o acesso do mesmo agente complexante (cianeto), sem a necessidade de gastos excessivos de energia para a queima do sulfeto e sem a emissão de SO_2 (um poluente) para a atmosfera (LIVESEY-GOLDBLATT *et alii*, 1983).

II.4.2. Desenvolvimento experimental do processo

Até a definitiva demonstração do envolvimento de microrganismos e em especial do *T. ferrooxidans*, na solubilização de metais dos seus minérios, o processo era conduzido de forma totalmente em-

pírica. Com a descoberta da participação bacteriana, começou o desenvolvimento de pesquisas objetivando sistematizar e, conseqüentemente, otimizar o processo.

Mesmo considerando que as operações em escala industrial para lixiviar cobre e urânio, são conduzidas ainda de forma rudimentar em pilhas, existe toda uma metodologia não só para avaliar em laboratório a potencialidade de um minério, como também para melhorar o rendimento de uma pilha de lixiviação. Assim, para construir e operar uma unidade desse tipo, é necessário um mínimo de conhecimento das condições de lixiviação do minério. Esse conhecimento é de fundamental importância, não só para o aproveitamento de rejeitos minerais de baixo teor já retirados de uma mina em atividade, como também para planejar a operação paralela da lixiviação bacteriana dentro de um novo projeto mineral.

Baseando-se em inúmeros trabalhos experimentais, BRUYNES-TEYN & DUNCAN (1977) e BRUYNES-TEYN & HACKL (1985), sintetizaram os passos básicos na condução de um programa de estudos para aplicação da lixiviação bacteriana a um determinado minério. Em linhas gerais esses passos envolvem uma fase preliminar de avaliação, na qual são feitos testes de consumo e produção de ácido pela amostra, testes de lixiviação agitada em frascos e testes de lixiviação por percolação em colunas.

Utilizando-se uma amostra representativa do minério (1 - 2 Kg), essa série de testes permitirá uma avaliação do potencial da lixiviação bacteriana. Em frascos, geralmente se utiliza pequenas quantidades de minério finamente moído (10 - 30 g) em contato com soluções lixiviantes contendo as bactérias. Obviamente inúmeras variáveis são estudadas (pH, temperatura, necessidade de nutrientes, etc.),

objetivando-se estabelecer a condição ótima. Se os resultados desse tipo de ensaio em condições ótimas, não forem significativos em relação a controles esterilizados, pode-se chegar rapidamente a conclusão que o minério não apresenta potencialidade para o tratamento biometalúrgico. Ao contrário, passa-se aos testes seguintes de lixiviação por percolação em colunas.

Nesses testes, 500 a 1000 g de minério apresentando uma granulometria mais elevada (1/2"- 1/4") são colocadas em colunas (PVC ou vidro) e a solução lixiviante é percolada e constantemente reciclada pelo minério (figura 2). A avaliação dos resultados desses ensaios, já em condições menos favoráveis ao desenvolvimento bacteriano, determinará o prosseguimento ou não do programa experimental.

Após essa primeira fase de testes, a segunda etapa envolve um teste em escala ampliada, também em coluna, no qual massas maiores de minérios (0,5 - 2 t) são processadas também por percolação. Nesse caso, a granulometria do minério já representa aquela em que eventualmente o processo será conduzido no próprio local da mina, isto é, material acima de 1", ou mais. Esse teste tenta representar adequadamente as condições de uma seção da pilha de lixiviação (MURR & BRIERLEY, 1978; SANMUGASUNDERAM, 1985).

Como já destacado (ver figura 1) o processo de lixiviação é praticado de forma quase rudimentar. Entretanto deve-se distinguir dois tipos básicos: "heap leaching" (lixiviação em pilhas) e "dump leaching" (lixiviação em montes), termos comumente empregados na biometalurgia. O primeiro refere-se basicamente a um processo mais controlado, desde a preparação do pátio de lixiviação mais rigorosa, passando pela britagem do minério e montagem de pilhas mais homogêneas, até a reutilização do pátio impermeabilizado para operação de

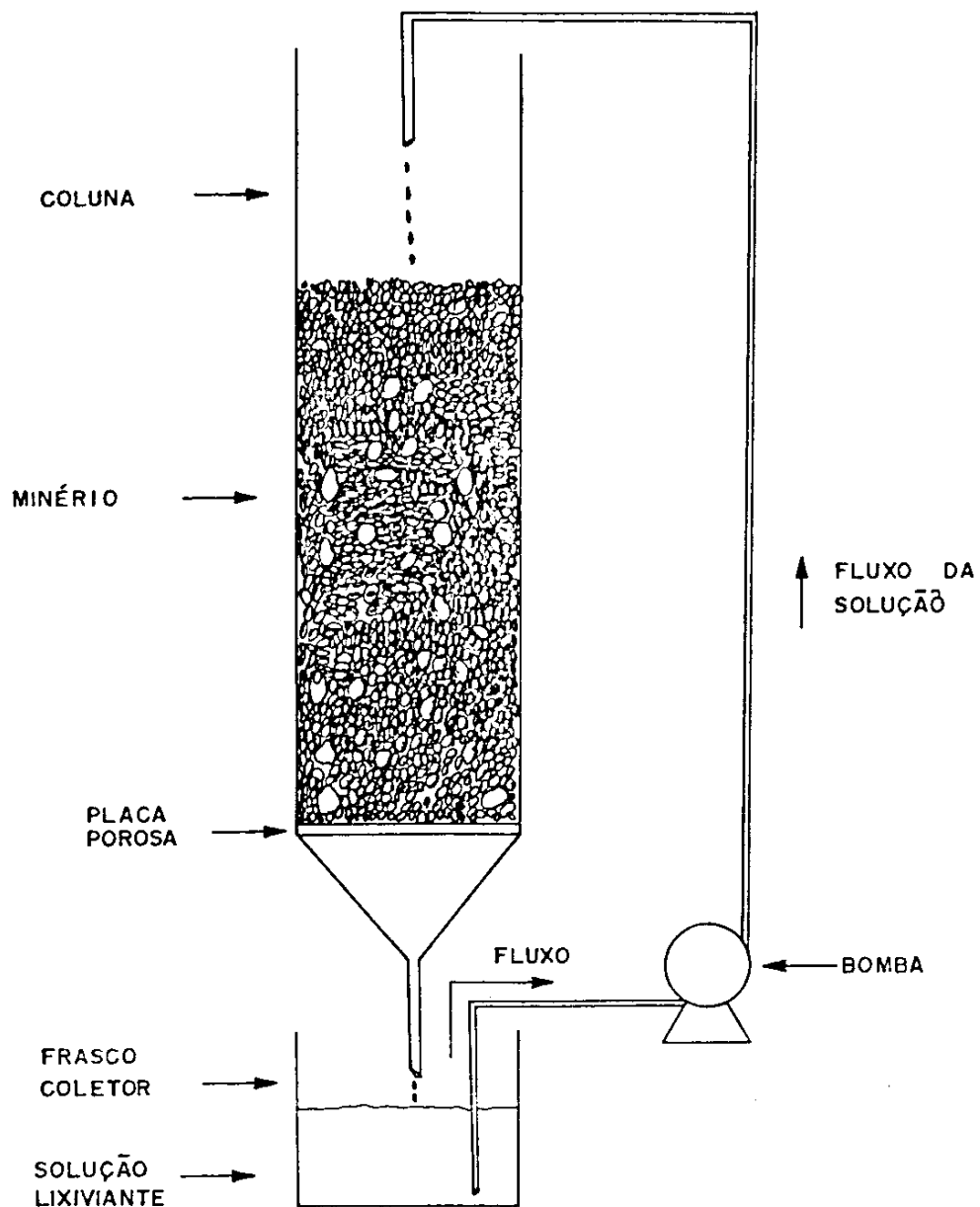


FIGURA 2 - Montagem básica para ensaios de lixiviação bacteriana em colunas.

novas pilhas. Trata-se de um minério que, apesar de não ser utilizado no processo convencional (baixo teor), apresenta um teor do metal que justifica economicamente toda essa atividade que envolve custos adicionais (CLANCY & RITCHIE, 1975; POTTER, 1981).

No segundo caso ("dump leaching"), trata-se de um minério de mais baixo teor ainda. Assim, nem esses custos adicionais será compensado pelo valor do metal recuperado. Nesse caso, o material é depositado em um "bota-fora", como atividade inevitável em uma mina a céu aberto, para então ser lixiviado bacterianamente. Grandes montes são construídos (milhões de toneladas) e não mais removidos do local (WOODCOCK, 1967; BRUYNESTEYN & COPPER, 1974).

Deve ser mencionado ainda a lixiviação *in situ*, na qual após um desmonte interno da mina, soluções contendo bactérias são injetadas no interior e depois bombeadas à superfície para recuperação do metal lixiviado (BURTON *et alii*, 1983).

Em termos de processo operacional, deve ser destacado que além desses três tipos hoje praticados, a lixiviação em tanques ou bio-reatores está cada vez mais próxima de sua aplicação industrial. Além do ouro, a utilização de sulfetos metálicos previamente concentrados poderá em um futuro próximo, ser a matéria prima do processo nesses sistemas muito mais controlados (LAURENCE & BRUYNESTEYN, 1983).

Independente do tipo de processo e da escala de trabalho, diversos fatores como já salientado, influem no processo. Podem ser destacados o tipo de sulfeto metálico (SAKAGUCHI *et alii*, 1976), o pH (ROY & MISHRA, 1981), o potencial de óxido-redução-Eh (GUAY & SILVER, 1981), a temperatura (LANDESMANN *et alii*, 1966) a granulometria do minério (EHRlich & FOX, 1967), a disponibilidade de O₂ e

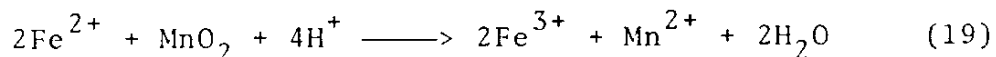
CO₂ (TORMA *et alii*, 1973; PUGH *et alii*, 1984), além de outras de natureza tecnológica, tais como dimensões da pilha (sobretudo altura), permeabilidade, composição total do minério (argilas, areias, etc.), taxa de percolação, grau de compactação, regime de chuvas, etc.. As revisões de BRIERLEY (1978), MURR (1980) e de LUNDGREN & SILVER (1980), abordam com detalhes esses fatores, bem como os métodos de aplicação industrial da técnica bacteriana de lixiviação de metais.

II.4.3. Lixiviação bacteriana de urânio

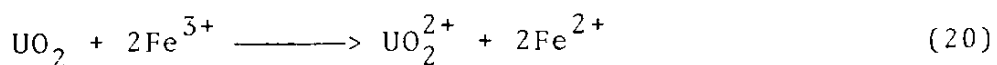
Minerais de urânio não existem na forma de sulfeto. Normalmente eles ocorrem como óxidos insolúveis, sendo a uraninita (UO_2) o mineral de urânio melhor conhecido. Outros minerais primários de urânio podem ser citados: pitchblenda (UO_2), bacquerelita ($2\text{UO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), cofinita ($\text{U}(\text{SiO}_4)_{1-x} [\text{OH}]_x$), uranofano ($\text{CaO} \cdot 2\text{UO}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), etc.. (ZAJIC, 1969).

Nesses minerais, o urânio se apresenta na forma reduzida, normalmente U^{4+} , mas podem ser facilmente oxidados sob várias condições, ao seu estado hexavalente solúvel (U^{6+}). No estado oxidado, o urânio é facilmente lixiviado por ácidos contendo algum agente oxidante. O íon férrico (Fe^{3+}) é um dos oxidantes mais eficientes para solubilizar o urânio, e, em função disso, tem sido largamente utilizado em processos industriais de lixiviação de minérios de urânio.

Nesses procesos, utiliza-se na verdade, agentes oxidantes do íon ferroso (Fe^{2+}) que sempre está presente no minério na forma de óxido de ferro. Vários oxidantes podem ser utilizados: clorato de sódio, ácido perclórico, permanganato de potássio, dióxido de manganês, etc.. Um dos mais comuns e mais baratos é o óxido de manganês (pirolusita) que oxida o ferro conforme a equação abaixo:



O íon férrico então formado, oxida o urânio tetravalente:



A adição de ácido sulfúrico no processo, resulta na formação do sulfato de uranila solúvel $UO_2 SO_4$.

Para que ocorra a lixiviação bacteriana de minérios de urânio, a condição fundamental é a presença de pirita associada ao minério. Mesmo considerando que o *T. ferrooxidans* oxida $U^{4+} \rightarrow U^{6+}$ conforme já discutido (DISPIRITO & TUOVINEN, 1980, 1982a,b), a solubilização do urânio por essa rota bioquímica, sob o ponto de vista prático, não tem nenhum significado.

Assim, é necessária a presença de pirita para que a partir desta, ocorra a produção bacteriana do ácido sulfúrico e do íon férrico, conforme já mostrado pelas reações (11) e (12), e, conseqüentemente ocorra a lixiviação indireta do urânio dos seus minerais (reação 20).

Um dos primeiros indícios dessa solubilização, vem de observações feitas no início dos anos 50 na planta de tratamento de minério de urânio de Urgeirica, Portugal. Constatou-se que ocorria uma significativa lixiviação "natural" do elemento, nos montes de minérios estocados para o tratamento convencional. Os responsáveis pela planta, constataram a presença ativa de *T. ferrooxidans* devido ao alto teor de pirita do minério (LOWSON, 1975). Durante os anos 60, a extração de urânio por *T. ferrooxidans* foi aplicada no Canadá (FISHER, 1966; MacGREGOR, 1966; HARRISON *et alii*, 1969), nos E.U.A. (MASHBIR, 1964) e na URSS (BRIERLEY, 1978) através da lixiviação *in situ* e da lixiviação em pilhas.

Devido ao aumento da demanda mundial de urânio na década de 70, em função da expansão das instalações nucleares geradoras de energia, houve um crescente interesse no aproveitamento dos minérios de baixo teor de urânio (< 0,05%). Nessa época a International

Atomic Energy Agency (IAEA), apoiou financeiramente uma série de projetos relacionados à biometalurgia do urânio. Foram realizados vários estudos, desde a identificação da microflora presente nos minérios e licores de lixiviação, e isolamento e caracterização fisiológico de *T. ferrooxidans* desses materiais, até o desenvolvimento de testes aplicados de lixiviação à minérios uraníferos de baixos teores (TUOVINEN, 1974; MARJANOVIC, 1975; CZEGLEDI, 1978).

A exemplo da biometalurgia do cobre, diversos fatores influenciam as taxas de extração do urânio em um processo de biolixiviação. Obviamente o tipo de minério e sua composição mineralógica estão entre os principais fatores. A granulometria da amostra mineral e adição de nutrientes para ajudar no desenvolvimento bacteriano, são outros fatores que também determinam respostas diferentes no processo. DWIVEDI *et alii* (1972), BHURAT *et alii* (1973) e KULSHRESTHA *et alii* (1973), trabalhando com 3 tipos de minérios de urânio da Índia, encontraram diferentes níveis de solubilização de urânio. O efeito da adição de nutrientes do meio 9K e de granulometria diferentes da amostra em estudo, também pôde ser detectado. A adição de nutrientes reduziu o período de máxima lixiviação, de cerca de 60 dias para 30 dias nos três minérios. A solubilização de urânio nos testes bacterianos em relação a controles esterilizados, aumentou de 60 para 72% (minério de Bhatin) de 62,6 para 94,2% (minério de Ke_uradungri) e de 58,3 para 77,4% (minério de Narwapahar), mostrando uma significativa variação em função do tipo de minério.

GUAY e SILVER (1977) realizando experimento contínuos de biolixiviação em reatores, obtiveram altas taxas de extração de urânio pela simples variação da agitação (aeração) do sistema. Além de minérios de baixo teor em urânio, alguns trabalhos foram desen

volvidos objetivando aproveitar resíduos minerais provenientes de tratamentos convencionais de lixiviação. BARBIC *et alii* (1976) conseguiram extrair pela biolixiviação, cerca de 60% de urânio de um resíduo de uma planta de tratamento convencional da Iugoslávia, o qual já tinha sido lixiviado em 20% do urânio do teor original.

Conforme discutido, *T. ferrooxidans* tem a capacidade de oxidar pirita presente em minérios uraníferos e, indiretamente, causar a solubilização do urânio pelos produtos formados, Fe^{3+} e H_2SO_4 (TUOVINEN, 1972; GAY e SILVER, 1980). Entretanto, mesmo em minérios que não contenham esse sulfeto, a biometalurgia pode ser uma alternativa, desde que exista uma disponibilidade de pirita para ser incorporada ao minério ou, então, servir de substrato para produção biológica do agente lixiviante, solução ácida de sulfato férrico. TUOVINEN *et alii* (1983) demonstraram essa potencialidade, estudando a ação de solução ácida de sulfato férrico (pH \sim 1,8 e $Fe^{3+} = 3$ g/l) obtida pela atividade oxidativa do *T. ferrooxidans* em pirita. Nesse trabalho, 4 amostras de minério de urânio da Finlândia foram testadas e também constatou-se variação nos rendimentos de extração de urânio (de 59 a 100%).

Em recente revisão, TUOVINEN (1985) discute vários aspectos biotecnológicos sobre a solubilização de minérios de urânio e McCREADY (1986) apresenta um exemplo de aplicação da biometalurgia do urânio em escala de produção na "Denison Mines" (Canadá) através da técnica in-situ; nesse projeto existe uma interessante interação entre empresa - instituto tecnológico e universidade. Boas discussões sobre aspectos técnico-econômicos e de políticas governamentais, em relação à potencialidade da biometalurgia em geral e em especial de minérios de urânio, podem ser ainda encontradas nos trabalhos de BRUYNESTEYN (1985), CAMPBELL (1985) e de LAKSHMANAN (1985).

II.5. A BIOMETALURGIA NO BRASIL

O interesse em nosso país pela recuperação de metais demínérios de baixos teores por bactérias e, em geral, pela interação entre microrganismos e minerais, começou no início dos anos 70. Algumas investigações preliminares sobre a biolixiviação de minérios de baixo teor de cobre, de depósitos localizados no Rio Grande do Sul e na Bahia, foram apresentadas nessa época em um congresso de processos hidrometalúrgicos realizado no Rio de Janeiro (NAVARRA, 1973; PIATNICKIS, 1973). Nesses trabalhos, os autores já destacavam a potencialidade da aplicação de processos biometalúrgicos, como uma alternativa para recuperação de cobre de minérios marginais, visto que o Brasil era, e ainda é, um importador desse metal.

Nessa mesma época, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT-SP) iniciava um programa de estudos na área. O comportamento do minério de baixo teor de cobre da mina de Camaquã (RS), foi estudado pela técnica de colunas de percolação (VAISBICH *et alii*, 1979) e em fermentadores (VAISBICH, 1984). Mesmo mostrando resultados promissores, não foi feita uma mudança de escala e esses estudos infelizmente foram interrompidos em 1985. Entretanto o IPT vem atualmente, reativando essa linha de pesquisa em seu Agrupamento de Biotecnologia. Outros estudos envolvendo a interação mineral-microrganismos, como por exemplo a solubilização de molibdênio por *T. ferrooxidans* (RIBEIRO *et alii*, 1976) e alterações em rochas com a solubilização de ferro por *A. niger* (RIBEIRO *et alii*, 1977), foram também realizados nesse período. É interessante destacar ainda, que alguns pedidos de privilégio de invenção sobre processo envolvendo microrganismos e minerais, foram solicitados ao Instituto Nacional de

Propriedade Industrial - MIC (GUEDES, 1978; CRAMPTON, 1979; PENG & CARVALHO, 1980).

Desde 1980, o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM - RJ) e a Escola de Química da UFRJ, tem estudado aspectos da lixiviação bacteriana de minério sulfetado de cobre da Caraiba Metais (BA), e obtido resultados promissores, sob o ponto de vista de aplicação industrial (MARTINS & EL-NAGAR, 1982; ANDRADE, 1984). Mais recentemente, o Centro de Pesquisas e Desenvolvimento (CEPED - BA), iniciou um programa de estudos objetivando o aproveitamento de minérios de baixo teor de cobre da mina da Caraiba (BA) e também de pequenos depósitos de cobre que ocorrem na mesma região da Bahia (MARQUES, 1988). Ainda em relação ao cobre, o Instituto de Química da UNESP (Araraquara-SP), também vem desenvolvendo estudos de biolixiviação do minério da Caraiba Metais, em colaboração com o CEPED (NOVO & GARCIA Jr., 1988; além de estudos básicos com o *T. ferrooxidans* (TAKAGI & GARCIA Jr., 1988).

Em relação a biometalurgia do urânio em nosso país, deve-se destacar um programa pioneiro a nível de América Latina, desenvolvido desde 1979 pela antiga "Empresas Nucleares Brasileiras", atualmente Urânio do Brasil S/A. Devido ao fato do urânio ser considerado material estratégico e o programa ser desenvolvido em uma empresa, pouca divulgação foi feita sobre os resultados do referido programa. Entretanto alguns tópicos foram comunicados em congressos (GARCIA Jr. & BRITO, 1984; GARCIA Jr., 1985a,b; além de ter sido requerido um pedido de privilégio de invenção (GARCIA Jr., 1984). Em função de alterações estruturais e sérios problemas financeiros que não só essa empresa estatal, mas de um modo geral toda a máquina administrativa federal vem sofrendo, esse trabalho foi circunstancial

mente paralisado a exemplo de outras atividades do programa nuclear brasileiro.

Um outro trabalho interessante que vem sendo desenvolvido pela Mineração Morro Velho S/A (Nova Lima - MG) desde 1985, relaciona-se ao aproveitamento de rejeitos da mineração de ouro dessa companhia. Conforme informações de um pesquisador da empresa, o ouro desses rejeitos está ocluído em cristais de arseno-pirita e o pré-tratamento bacteriano para liberação do ouro vem apresentando resultados promissores em escala piloto (R.S. Liberato, comunicação pessoal).

Assim, em linhas gerais, começa-se a notar um crescente interesse pela área em nosso país. Como pode ser visto pela tabela 2, alguns centros, além dos já mencionados, estão iniciando ou mesmo dando prosseguimento, a programas na área biometalúrgica.

TABELA 2 - Exemplos de entidades envolvidas ou implantando estudos em biometalurgia no Brasil.

ENTIDADES	ATIVIDADES	ESCALA
CETEM (Centro de Tecnologia Mineral-RJ) e EQ-UFRJ	- Lixiviação de cobre e ouro - Dessulfurização de carvão	Laboratório
IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas - SP)	- Lixiviação de cobre e ouro - Fisiologia de <i>T. ferrooxidans</i>	Laboratório
CEPED (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento - BA)	- Lixiviação de cobre	Laboratório
IPH (Instituto de Pesquisas Hidráulicas - UFRS - RS)	- Dessulfurização de carvão	Laboratório
IQ (Instituto de Química - UNESP - SP)	- Lixiviação de cobre - Fisiologia e Genética de <i>T. ferrooxidans</i>	Laboratório
Laboratório de Processos (CNEN - Poços de Caldas-MG, Ex-NUCLEBRAS)	- Lixiviação de urânio (em reativação)	Piloto
FAC (Fac. Ciências Agrônomicas - UNESP)	- Solubilização de fosfato por fungos	Laboratório e testes de campo
CETEC (Centro Tecnológico-MG) e UFMG	- Biodetoxificação de Metais pesados	Laboratório
UFOP (Ouro Preto - MG)	- Isolamento de <i>T. ferrooxidans</i>	Laboratório
QUIMBRASIL - SP	- Redução de sulfato por microrganismos - Utilização de enxofre residual para produção de H_2SO_4	Laboratório
Mineração Morro Velho (Nova Lima - MG)	- Lixiviação de ouro	Laboratório micropiloto
CENPES (PETROBRÁS-RJ) e UFFluminense	- Lixiviação de xisto - Redução de sulfato por microrganismos.	Laboratório

III. OBJETIVOS

O presente trabalho reúne os dados de desenvolvimento experimental do programa de Biometalurgia do urânio, implantado no Laboratório de Processos de Poços de Caldas - MG, da extinta Empresas Nucleares Brasileiras S/A, hoje vinculado à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), o qual teve por objetivo central, a utilização do processo de lixiviação bacteriana para aproveitamento de minérios contendo baixo teor de urânio.

No sentido de fornecer uma base de conhecimentos para o referido desenvolvimento aplicado e também para suprir uma lacuna existente nessa área em nosso país, foram também traçados objetivos envolvendo aspectos puramente microbiológicos. Assim, o conhecimento de aspectos básicos do *T. ferrooxidans* poderá servir de uma base para eventuais aplicações de biometalurgia em condições muito mais controladas, conforme já discutido em capítulos anteriores.

Assim, pode-se identificar os seguintes objetivos específicos deste trabalho:

1. Isolar a espécie *T. ferrooxidans* de efluentes de minas de urânio e de carvão, de águas de drenagem de rejeitos minerais dessas minas e dos próprios minérios. Utilizando-se as mesmas amostras, objetivou-se também isolar *T. thiooxidans* apenas para se conseguir cepas dessa espécie, para eventuais estudos posteriores de sua participação no processo de lixiviação
2. Purificar os isolados, no sentido de se investigar preliminarmente a variabilidade genética entre aqueles de *T. ferrooxidans*.
3. Estudar parâmetros fisiológicos básicos de crescimento do *T. ferrooxidans*: definição de metodologia para avaliação de crescimento, tipos de substratos e de nutrientes que são utilizados, influência de metais no crescimento, etc.

4. Estudar alguns parâmetros cinéticos básicos (K_m e V_{max}) com suspensões celulares em repouso, através da técnica de respirometria: oxidação do Fe^{2+} sob a influência de alguns metais tóxicos e em diferentes valores de pH.
5. Determinar a potencialidade de dois tipos de minérios uraníferos frente à técnica de lixiviação bacteriana através de:
 - a) ensaios de lixiviação agitada em frascos
 - b) ensaios de lixiviação estática em colunas de percolação.
- 6) "Scale-up" dos ensaios para desenvolvimento de lixiviação estática em colunas de percolação em escala micropiloto.
7. "Scale-up" dos ensaios para planejamento, montagem e operação de duas unidades piloto de lixiviação bacteriana em pilhas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*.

IV.1.1. Coleta de amostras

Como já destacado anteriormente, bactérias do gênero *Thiobacillus*, sobretudo as espécies *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, estão sempre presentes em ambientes contendo algum mineral sulfetado, sobretudo a pirita. Dessa forma, um primeiro passo que determina uma alta probabilidade de se encontrar essas espécies, é a coleta de efluentes naturais ácidos de minas, de águas de drenagem de pátios de estocagem de minérios ou de rejeitos, e ainda, de soluções produzidas por um processo hidrometalúrgico, como por exemplo a lixiviação estática ácida de minérios.

Já direcionada pela caracterização mineralógica, a qual indica a presença de algum sulfeto metálico no minério, a coleta da amostra líquida ou mesmo sólida, foi precedida por uma rápida verificação qualitativa de seu pH, com o auxílio de um simples papel indicador. Aquelas que apresentaram resposta ácida ($\text{pH} < 3,5$) foram selecionadas para a coleta.

Uma outra característica indicativa da possível presença de *T. ferrooxidans*, é a aparência visual da amostra a ser selecionada. Sobretudo em minas onde o minério ou rejeitos contendo pirita, são estocados a céu aberto, como é o caso de minas de carvão, os efluentes naturais produzidos por chuvas que percolam pelo material estocado, geralmente apresentam uma intensa cor marrom-avermelhada, devido às concentrações elevadas de Fe^{3+} em meio ácido.

Considerando então, a presença de pirita no local, associada a uma resposta qualitativa ácida do efluente (pelo papel indicador), e além disso, uma indicação visual da presença do íon Fe^{3+} coletou-se várias amostras líquidas e sólidas de diferentes pontos no local da mina.

Foram escolhidos as seguintes minas para coleta de amostras:

- a) Mina de urânio a céu aberto de Poços de Caldas - MG (Urânio do Brasil S/A).
- b) Mina de urânio subterrânea de Figueira - PR (Urânio do Brasil S/A).
- c) Mina de carvão subterrânea da Companhia Carbonífera Cambui, Figueira - PR.
- d) Mina de carvão a céu aberto da Companhia Carbonífera Próspera, Siderópolis - SC.

As amostras foram coletadas em frascos esterilizados e enviadas ao laboratório para serem inoculadas nos meios de culturas apropriados.

IV.1.2. Meios de cultura

IV.1.2.1. Meio para *T. ferrooxidans*

MEIO 9K

Um dos meios mais utilizados ainda hoje e que foi utilizado no presente trabalho foi o meio "9K- Fe^{2+} ". (SILVERMAN & LUNDGREN, 1959a). Sua composição e modo de preparo são os que se seguem:

SOLUÇÃO A

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	3,0 g
K_2HPO_4 -----	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,5 g
KCl -----	0,1 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -----	0,014 g
H_2O destilada -----	700 ml
Acertar o pH para 2,8 com H_2SO_4	

SOLUÇÃO B

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	44,8 g
H_2O destilada -----	300 ml
Acertar o pH para 2,8 com H_2SO_4	

Os sais da solução A são dissolvidos separadamente e após ajuste de volume e do pH, a solução é autoclavada a 120°C por 20 minutos. A solução B é esterilizada separadamente nas mesmas condições. No presente trabalho, a solução B foi esterilizada por filtração em membrana Millipore, para evitar alguma oxidação do íon Fe^{2+} que ocorre durante a autoclavagem.

As soluções A e B são estocadas separadamente a 5°C e misturadas na proporção 7:3, respectivamente, no momento do uso.

MEIO 9K-AGAROSE

O meio 9K foi preparado como descrito no item anterior, porém com o dobro da concentração dos sais.

A agarose (marca BRL, grau eletroforético), foi preparada separadamente das soluções do meio 9K, dissolvendo-a a quente em água destilada, na concentração de 0,9% (m/V). Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, deixou-se resfriar a solução até ~50°C, misturou-se em partes iguais com a solução do meio 9K e distribuiu-se rapidamente em placas de Preti previamente esterilizadas.

Esse procedimento é necessário, pois se a solução de agarose ainda quente, for misturada com o meio 9K, cujo pH é 2,8, não ocorrerá a formação do gel devido à hidrólise provocada pelo ácido.

A concentração final da agarose no meio de cultura é de 0,45% (m/V).

MEIO 9K-SÍLICA

O ácido silícico relativamente concentrado forma um gel bastante estável. Neste trabalho, foi utilizado o método descrito por GOODMAN *et alii* (1980), com pequenas modificações, o qual é descrito abaixo:

preparou-se uma solução de silicato de sódio ($\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dissolvendo-se à quente, 174,26 g do sal em 500 ml de H_2O destilada.

Para a obtenção do ácido silícico utilizou-se uma resina catiônica forte marca Amberlite, tipo IR-120 da Rhom and Haas. A resina foi colocada em uma coluna de vidro de 80 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro e a seguir condicionada para a forma H^+ (a forma original é Na^+) pela passagem de HCl 2N. Após o condicionamento indicado pelo pH do efluente, o qual deve ser igual ao do influente, lavou-se o Cl^- presente na resina, pela passagem de H_2O destilada.

até a prova negativa do Cl^- no efluente com AgNO_3 , (reação positiva: precipitado branco).

Passou-se a solução de silicato de sódio, recolhendo-se as frações do ácido silícico de $\text{pH} < 3,0$. Deve-se acompanhar com atenção o fim da corrida, indicado por uma rápida elevação do pH do efluente, pois se isto ocorrer, o silicato precipitará no interior da resina, danificando-a. Assim, é fundamental parar imediatamente a alimentação do silicato de sódio, iniciando a lavagem da resina com H_2O destilada.

O ácido silícico obtido, foi então misturado em partes iguais com o meio de cultura 9K (2x concentrado), agitado vigorosamente e distribuído em placas de Petri. Cerca de 24 horas após a mistura obteve-se a formação do gel. Para acelerar o processo de gelificação, pode-se colocar as placas em estufas com aeração forçada a $60-70^\circ\text{C}$, obtendo-se a solidificação após aproximadamente 6 horas. A seguir as placas foram esterilizadas em U.V. por 1 hora.

A regeneração da resina para sua forma H^+ foi efetuada pelo mesmo processo inicial, isto é, após a etapa de lavagem com H_2O destilada, passou-se HCl 2N.

MEIO "TK"

Um outro meio de cultura que é bastante utilizado em pesquisas com *T. ferrooxidans* e que foi usado em alguns experimentos do presente trabalho, é o de TUOVINEN & KELLY (1973) que será chamado de meio "TK". Além da composição, sua diferença fundamental do meio "9K" é o pH abaixo de 2,0. Nessas condições, praticamente não há

formação de precipitados de ferro durante o crescimento bacteriano, fato normal no meio 9K. Sua composição e seu modo de preparo são discutidos abaixo:

SOLUÇÃO A

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	0,5 g
K_2HPO_4 -----	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,5 g
H_2O destilada -----	1000 ml

SOLUÇÃO B

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	167 g
H_2O destilada -----	1000 ml

Dissolve - se separadamente os sais da solução A, ajusta-se o pH para 1,8 com H_2SO_4 concentrado e autoclava-se a 120°C por 20 minutos. A solução B, é esterilizada por filtração em membrana Millipore, após o ajuste da acidez para pH 1,8 com H_2SO_4 concentrado. As soluções são estocadas separadamente em geladeira ($\sim 4^\circ\text{C}$) e no momento do uso, utiliza-se uma proporção de 4:1, respectivamente da solução A e B.

IV.1.2.2. Meio para *T. thiooxidans*

Com relação a essa espécie bacteriana, existem também vários tipos de meios de cultura apropriados para o isolamento e cultivo dessa bactéria.

Neste trabalho utilizou-se o meio 9K (já descrito anteriormente), substituindo-se a fonte de energia fornecida pelo íon ferroso (Fe^{2+}), por enxofre sublimado. Dessa forma o meio para *T. thiooxidans* ("9K-S⁰") tem a seguinte composição e modo de preparo: utiliza-se uma solução de sais idêntica àquela do meio 9K, porém para um volume de 1000 ml, ajustando-se a acidez com H_2SO_4 , para um pH $\sim 3,0$. Como fonte de energia utiliza-se enxofre sublimado à 1% (m/v).

O enxofre é colocado em frascos separados e esterilizado em autoclave à 110°C por 1 hora. Após a esterilização, e no momento do uso, coloca-se cuidadosamente o volume correspondente da solução A (já estéril) nos frascos contendo o enxofre. Utilizou-se rotineiramente neste trabalho, 1 g de enxofre para 100 ml de meio.

Ao contrário da espécie *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* não apresenta inibição de crescimento quando cultivado em meio sólido contendo agar como agente solidificante. Dessa forma, para a purificação dessa espécie, utilizou-se o meio ATCC 238, que apresenta tiosulfato como fonte de energia (nº de referência, 238 do "Catalogue of Strains 1, 14th edition, The American Type Culture Collection, 1980, Rockville, MA, USA"):

NH_4Cl_2 -----	0,1 g
MgCl_2 -----	0,1 g
CaCl_2 -----	0,1 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -----	0,5 g
H_2O destilada -----	1000 ml
Agar -----	15 g

Dissolve-se os sais em 500 ml da água destilada, ajusta-se o pH em 4,2 com HCl e esteriliza-se em autoclave a 120°C por 20 minutos. Dissolve-se separadamente o agar no restante da água destilada, e esteriliza-se nas mesmas condições. Após a esterilização, espera-se a solução de agar resfriar até $\pm 50^{\circ}\text{C}$, misturando-se em seguida com a solução ácida de sais. Esse resfriamento prévio do agar é fundamental para evitar a sua hidrólise. Após a mistura das duas soluções, distribue-se o meio imediatamente em placas ou tubos esterilizados previamente.

IV.1.3. Procedimento prático

Apesar das condições altamente seletivas do ambiente em que essas bactérias se desenvolvem, outros microrganismos podem ser encontrados nas amostras coletadas para o trabalho. Assim, antes do plaqueamento em meio sólido para obtenção de colônias isoladas, utilizou-se a técnica de enriquecimento por diluição, para enriquecimento das espécies desejadas e, conseqüentemente, extinção por redução das outras eventuais espécies de microrganismos presentes nas amostras utilizadas.

Em linhas gerais, o procedimento adotado foi o seguinte: frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio "9K - Fe²⁺" ou de "9K - S⁰", foram inoculados em condições assépticas convencionais, com 5,0 ml ou 1,0 g (para material sólido) das amostras selecionadas. A seguir os frascos foram colocados em mesa agitadora (~200 rpm), à temperatura de 30°C.

Após um período de 5 a 10 dias no caso de *T. ferrooxidans* e de 15 a 20 dias no caso de *T. thiooxidans*, alíquotas de 5 ml das culturas foram transferidas para novos frascos contendo os respectivos meios. Esse período de incubação foi definido em função do comportamento da amostra inoculada. No caso do meio "9K - Fe²⁺", foi feita uma avaliação visual para verificar indício de crescimento do *T. ferrooxidans*: a mudança da cor verde-claro (Fe²⁺) do meio antes do inóculo, para vermelho-tijolo (Fe³⁺). Para verificar atividade de oxidação no "9K-S⁰" (pelo *T. thiooxidans* ou mesmo pelo *T. ferrooxidans*), além da visualização de turbidez (o meio é cristalino no início), foi feita também medida de pH; quando esse se tornava menor que 1,0 (3,0 no início), admitia-se, a atividade bacteriana. Em to-

dos os ensaios, foram preparados frascos controles com os meios esterilizados e não inoculados, para permitir um fácil reconhecimento da atividade das duas espécies em isolamento.

Esse procedimento foi repetido 5 vezes sucessivamente, antes de se purificar as espécies desejadas, pelo plaqueamento em meio sólido e isolamento de colônias individualizadas. Normalmente ao final dessas passagens, conseguiu-se um enriquecimento quase total dessas espécies.

Para o plaqueamento em meio sólido, procedeu-se a diluição em série até 10^{-5} , em tubos de ensaio contendo solução sulfúrica à pH 2,8 esterilizada. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram semeadas em placas contendo os meios sólidos, já descritos anteriormente, e incubadas em estufa a 30°C por um período de 10 a 15 dias, necessário para a visualização das colônias.

Após essa etapa, algumas colônias obtidas (± 10) em cada meio sólido, foram transferidas para os respectivos meios líquidos. Após crescimento nestes, revelado pela oxidação do Fe^{2+} e do S° conforme os critérios já apresentados, procedeu-se a um novo plaqueamento. Uma vez obtidas novas colônias, repetiu-se o inóculo em meio líquido. Esse procedimento foi realizado 5 vezes, a fim de se garantir a purificação das culturas bacterianas. A repetição do mesmo tipo único de colônias, garantiu essa purificação.

IV.2. ALGUNS ESTUDOS FISIOLÓGICOS BÁSICOS

IV.2.1. Oxidação de diferentes substratos pelos isolados obtidos.

Após essa etapa de purificação em meio sólido, testou-se a capacidade oxidativa de cada isolado bacteriano em 3 tipos de substratos oxidáveis: Fe^{2+} , S^0 e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, respectivamente meios "9K- Fe^{2+} ", "9K- S^0 " e ATCC-238.

Preparou-se os meios de cultura como descrito anteriormente e inoculou-se (5% v/v) cada frasco teste (2 repetições contendo 100 ml de meio/frasco) com os isolados obtidos no meio "9K- Fe^{2+} " (*T. ferrooxidans*) ou com aqueles obtidos em meio "9K- S^0 " (*T. thiooxidans*) para se confirmar as espécies isoladas, por esse critério fisiológico.

Os frascos foram incubados sob agitação a 30°C e a avaliação foi feita após 5 dias de incubação (meio 9K- Fe^{2+}), 10 dias (meio 9K- S^0) e 15 dias (meio ATCC-238). Para o meio "9K- Fe^{2+} " determinou-se a porcentagem de oxidação do Fe^{2+} , titulando-se o Fe^{2+} residual com dicromato de potássio. Para o meio "9K- S^0 ", determinou-se o pH e para o meio ATCC-238 determinou-se a porcentagem de oxidação do $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ pela dosagem do $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ remanescente. Os detalhes dessas técnicas serão discutidos na seção "determinações analíticas".

IV.2.2. Efeito da temperatura e agitação no crescimento de *T. ferrooxidans*.

Após a purificação dos isolados obtidos, utilizou-se 2 destes para verificar o efeito da temperatura e da agitação no

crescimento das culturas. Três frascos Erlenmeyer-250 ml/tratamento /cultura, contendo 100 ml de meio 9K, foram inoculados com 5% (v/v) com as respectivas culturas e incubadas nas seguintes condições:

A. Efeito da temperatura

10°C, 20°C e 30°C, sob agitação constante (~200 rpm)

B. Efeito da agitação

- agitado constantemente (~200 rpm)

- não agitado

- ambos à 30°C.

O crescimento foi verificado pela oxidação do Fe^{2+} , dosando-se o Fe^{2+} residual em alíquotas de 1 ml retiradas assepticamente dos frascos em incubação. Os testes foram encerrados quando não mais se detectou Fe^{2+} em solução.

IV.2.3. Crescimento do *T. ferrooxidans*

Rotineiramente determina-se a porcentagem de oxidação do Fe^{2+} para avaliar o crescimento dessa espécie em meio de cultura. Objetivando-se quantificar essa oxidação em termos de número de células associada à própria taxa de oxidação e à turbidez da suspensão, realizou-se experimentos de avaliação de crescimento em meio líquido de 9K - Fe^{2+} e em meio sólido 9K-Agarose, determinando-se nos mesmos, a absorvância da suspensão e o número de colônias, respectivamente. Foram empregados quatro isolados de *T. ferrooxidans* nestas avaliações.

Os ensaios foram realizados da seguinte forma: frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio 9K- Fe^{2+} , foram inoculados (5% v/v) com o respectivo isolado, após a cultura ter atingido a fa

se estacionária de crescimento (2 repetições/isolado). Periodicamente retirou-se assepticamente 1 ml do cultivo para determinação do Fe^{2+} presente, 1 ml para diluição sucessiva em série (tubos com 9 ml de H_2O pH 2,8) para plaqueamento em meio sólido (3 placas/diluição) e 2 ml para determinação da absorbância. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação constante e as placas foram incubadas em estufa também a 30°C ; as contagens foram feitas após 14 dias de crescimento.

Determinação da absorbância. Diferentemente do que ocorre com outras espécies bacterianas, o crescimento do *T. ferrooxidans* em meio líquido é acompanhado pela mudança da cor do meio de verde-claro a vermelho-tijolo, conforme já discutido. Dessa forma, a simples determinação da absorbância da suspensão seria impraticável, pois além da turbidez causada pela multiplicação celular, haveria também o registro da intensidade da cor. Assim, foi necessário um procedimento para eliminação dessa cor, baseando-se no método de MANDL (1984) com pequenas modificações. A solução descorante foi preparada com 9 ml de H_3PO_4 concentrado, 1 ml de H_2SO_4 concentrado e 90 ml de H_2O destilada; 1 ml dessa solução foi adicionado a 2 ml coletados da cultura em crescimento, provocando o rápido desaparecimento da cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 450 nm.

IV.2.4. Efeito do urânio no crescimento de *T. ferrooxidans*.

Como os isolados de *T. ferrooxidans* foram obtidos de amostras naturais provenientes de minas de urânio e de carvão, as quais apresentam diferentes teores desse elemento (no caso das amostras de minas de carvão, esse teor é zero), procurou-se avaliar a respos

ta dos isolados frente à diferentes concentrações desse metal tóxico. Nesse ensaio, foi avaliada o efeito do metal, no crescimento das culturas, indicado pela oxidação do íon Fe^{2+} , conforme já descrito. Utilizou-se 3 frascos/cultura/concentração de urânio, inoculados com 5% (v/v) com a respectiva cultura e mantidos sob agitação constante à 30°C .

O metal foi adicionado sob a forma de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ nas seguintes concentrações finais em mM de urânio no meio de cultura: 0, 2, 4, 6 e 8. Para evitar uma possível precipitação do urânio, reduziu-se a concentração de KH_2PO_4 do meio 9K para 0,1 g/l ao invés de 0,5 g/l como no meio original. Em testes prévios, constatou-se que nessa concentração reduzida de KH_2PO_4 , o crescimento do *T. ferrooxidans* não é afetado. As soluções contendo urânio foram preparadas no mesmo pH do meio de cultura, esterilizadas em autoclave a 120° por 20 minutos e adicionadas ao meio no início do ensaio.

IV.3. ALGUNS ESTUDOS RESPIROMÉTRICOS EM *T. ferrooxidans*

Como a oxidação do Fe^{2+} pelo *T. ferrooxidans* está acoplada ao consumo de O_2 na estequiometria $4\text{Fe}^{2+} : 10\text{O}_2$, conforme visto na equação (1), utilizou-se a técnica manométrica de Warburg¹ para determinar as cinéticas de oxidação do Fe^{2+} , pelo consumo do O_2 por suspensões celulares lavadas ("resting cells"), isto é, desacopladas de crescimento, de 4 diferentes isolados de *T. ferrooxidans*.

Objetivou-se estudar em um sistema mais controlado que estudos de crescimento, uma possível variabilidade genética entre os isolados de amostras diferenciadas, em relação a parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e ao efeito do pH e de metais pesados no metabolismo oxidativo do *T. ferrooxidans*.

IV.3.1. Preparo das suspensões celulares lavadas

Os isolados foram cultivados em recipientes plásticos contendo 10 litros de meio "T & K", sob aeração forçada pela injeção de ar comprimido esterilizado, pela sua passagem em um frasco contendo lâ de vidro previamente esterilizada.

Após o crescimento da cultura, foi feita inicialmente uma filtração em papel de filtro comum, para eliminar precipitados de ferro formados durante o crescimento da bactéria. A seguir filtrou-se a suspensão em membrana Millipore (0,45 μm), para separar as células.

1. "Manometric Techniques" - Umbreit, Burris & Stauffer; Burgess Publishing Company, 4th Edition.

las do meio de cultura oxidado. Ressuspendeu-se as células em H₂O pH 1,8, obtendo-se um concentrado de células de aproximadamente 500 ml.

A lavagem final da suspensão foi feita por centrifugação à baixa velocidade (cerca de 500 rpm), para eliminar precipitados remanescentes, e em velocidade mais elevada (8000 rpm) para deposição das células. Foram feitas 3 lavagens sucessivas, sempre a 4°C e por 30 minutos, em centrífuga refrigerada marca MLW-ZENTRITUGENBAU ENGELSDORF, modelo K-70 (Berlin-RDA). As células, após essas lavagens, foram ressuspendidas em um volume final de 50 ml em H₂O pH 1,8. Quando não utilizadas imediatamente, as suspensões celulares foram estocadas em refrigerador a 4°C no máximo por 15 dias, sem perda significativa de suas atividades. A figura 3, mostra um diagrama que resume o procedimento adotado para obtenção das suspensões celulares lavadas de *T. ferrooxidans*.

A unidade utilizada para expressar a concentração celular dos isolados foi nitrogênio total, determinado pelo método micro-Kjeldahl.

IV.3.2. Efeito da concentração do substrato (Fe²⁺)

- concentração de Fe²⁺ em mM: 2; 4; 6; 8; 10; 20; 40; 80; 120; 180; 240.
- volume da suspensão celular: 0,5 ml (volume final no frasco = 3,2 ml)
- pH 1,8, pela adição de H₂SO₄ 1M
- o substrato Fe²⁺ foi utilizado em todos os ensaios na forma de FeSO₄ . 7H₂O.

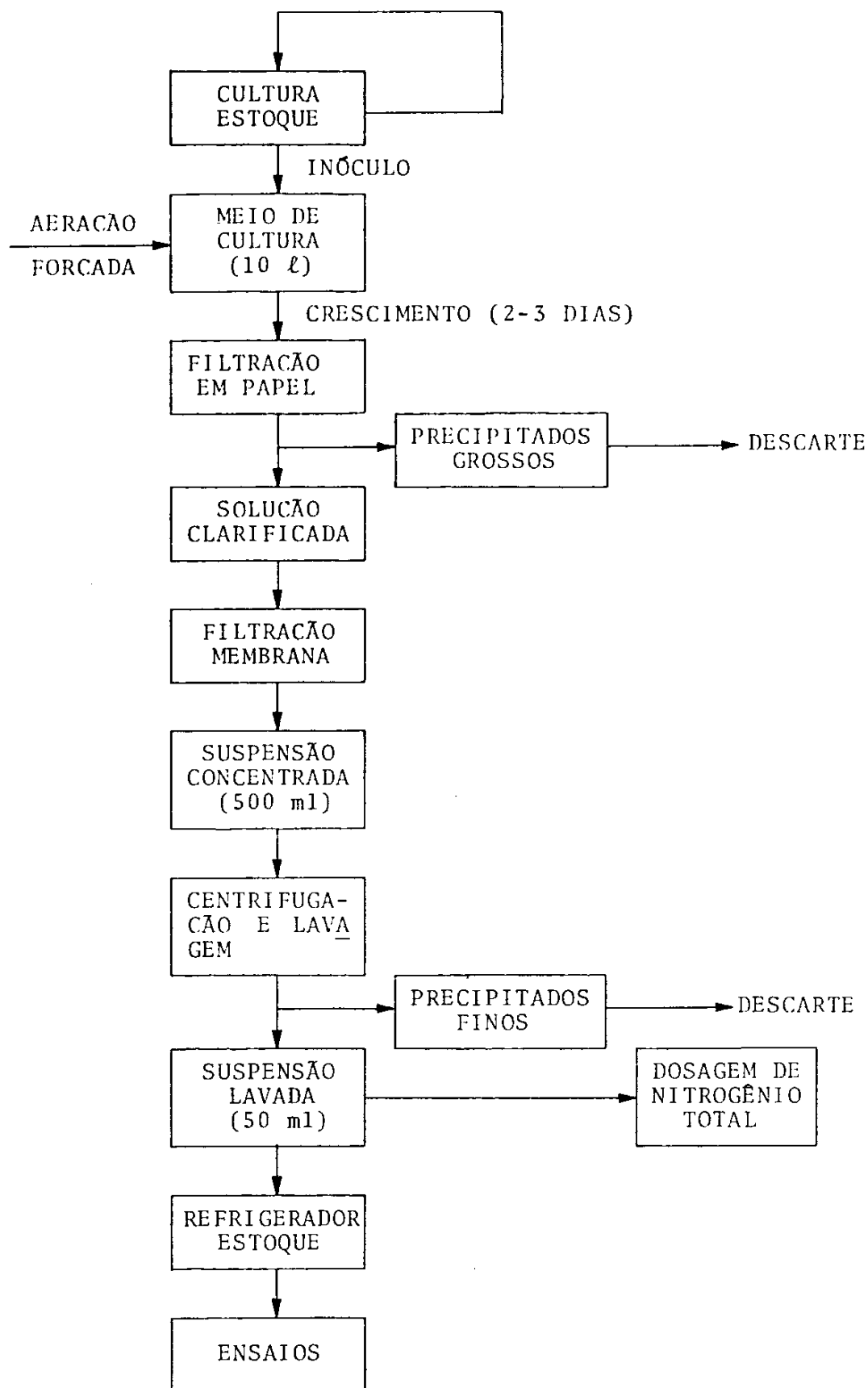


FIGURA 3 - Seqüência da preparativa das suspensões de células lavadas de *Thiobacillus ferrooxidans*.

IV.3.3. Efeito do pH

- pH: 0,9; 1,2; 1,8; 2,3 (pela adição de H_2SO_4 1M)
- concentração do Fe^{2+} : 120 mM
- volume da suspensão: 0,5 ml (volume final no frasco = 3,2 ml).

IV.3.4. Efeito de metais pesados

Metal	concentração (mM)	compostos adicionados (PA)
urânio	0, 2, 4, 6, 8	$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
molibdênio	0, 1, 2, 3, 4	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
mercúrio	0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0	HgCl_2

- concentração de Fe^{2+} 120 mM
- pH = 1,8, pela adição de H_2SO_4 1M
- volume suspensão: 0,5 ml (volume final no frasco = 3,2 ml).

Desenvolvimento experimental - A suspensão celular foi colocada sempre no compartimento principal do frasco de Warburg e a solução contendo o substrato (Fe^{2+}) no braço lateral. Nos ensaios com metais pesados, a solução contendo o metal foi colocada junto com a suspensão. No poço central do frasco, foi colocado papel de filtro embebido com 0,1 ml de uma solução de KOH 20% para retenção do CO_2 . O volume final do sistema de reação foi sempre de 3,1 ml, perfazendo um volume total ocupado de 3,2 ml, incluindo 0,1 ml do KOH.

Após a montagem dos conjuntos frascos-manômetros, estes foram colocados no banho a 30°C e deixados 10 minutos sob agitação à aproximadamente 100 batidas/minuto para equilibrar o sistema. Após

esse período iniciou-se as leituras do consumo de oxigênio, os quais foram feitas de 10 em 10 minutos até os 30 minutos iniciais e depois de 15 em 15 até 150 minutos, quando encerrou-se os ensaios.

Em paralelo foram feitos dois tipos de controle: a) endógeno, somente contendo a suspensão bacteriana sem substrato, para se verificar uma possível respiração na ausência do substrato e b) controle da oxidação química do Fe^{2+} , pela adição do substrato sem a suspensão bacteriana. Em ambos os casos não se detectou nenhum consumo de oxigênio.

As taxas respiratórias foram calculadas da faixa linear das curvas de consumo de oxigênio x tempo. Calculou-se o quociente respiratório de cada isolado de *T. ferrooxidans* para a concentração de 120 mM de Fe^{2+} , o qual é expresso como a quantidade de oxigênio consumido em 1 hora por mg de nitrogênio total da suspensão bacteriana ($Q_{O_2(N)}$).

IV.4 LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIO DE URÂNIO POR *T. ferrooxidans*

IV.4.1. Amostras minerais utilizadas

Em todos os experimentos de lixivação realizados, inclusive nas operações em escala piloto, foram utilizados dois tipos de minérios uraníferos de propriedade das Empresas Nucleares Brasileiras S/A (atualmente Indústrias Nucleares do Brasil S/A): Minério de Figueira - PR. e Minério de Poços de Caldas - MG.

IV.4.1.1. Minério de Figueira - PR.

Esse minério é proveniente da jazida de Figueira, localidade situada na região nordeste do Estado do Paraná e distante cerca de 150 Km de Londrina e a 300 Km de Curitiba. Deve-se ressaltar que tal jazida ainda não é explorada industrialmente.

Sua litologia básica compreende arenito, siltito e carvão. Como constituintes minerais predominantes podem ser destacados o quartzo (SiO_2), feldspato (KAlSi_3O_8), caolinita [$\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$] gipsita e pirita (FeS_2). Esta última está presente de forma finamente disseminada nas três litologias, porém com grande predominância na fração carvão.

O urânio apresenta-se principalmente sob a forma mineral de uraninita (UO_2) e uranocircita [$\text{Ba}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$]. Outros elementos presentes de forma significativa no minério são o molibdênio e o arsênio, zinco e chumbo, estes sob a forma de sulfeto.

Ocorrem ainda vestígios de selênio, vanádio, germânio e níquel, além, é claro, dos elementos de maior presença, como pode ser visto na tabela 3.

TABELA 3 - Composição química para os elementos de maior interesse, do minério uranífero de Figueira - PR, utilizado nos estudos de lixiviação bacteriana.

COMPONENTES	TEORES (%)
U_3O_8	0,08
MoO_3	0,05
Fe_2O_3	6,91
Sulfeto (S^{2-})	3,84
S_{total}	5,11

Para a execução dos estudos básicos de lixiviação bacteriana desse minério, uma amostra de aproximadamente 8 t foi retirada da galeria de desenvolvimento exploratório da mina subterrânea e enviada ao laboratório. Esse material, contendo blocos de até 30 cm (granulometria conhecida como "run of mine"), foi convenientemente preparado, conforme esquema da figura 4, para realização dos ensaios em escala de bancada (lixiviação agitada em frascos e estática em colunas de percolação) e em escala semipiloto, também em colunas de percolação. Para a realização do ensaio piloto, através da lixiviação estática em pilhas, foram utilizadas 890 t de minérios de composição mineralógica e química semelhante à amostra utilizada nos testes de laboratório; o ensaio piloto foi realizado no próprio local da mina, conforme será visto posteriormente.

IV.4.1.2. Minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - - MG.

O minério utilizado no estudo faz parte dos corpos mineralizados da jazida de urânio de Poços de Caldas, situada no município de Caldas, região sul do Estado de Minas Gerais. Essa jazida é explorada comercialmente no Complexo Mínero-Industrial de Poços de Caldas pela extinta Empresas Nucleares Brasileira S/A (NUCLEBRÁS), atualmente denominada Indústrias Nucleares do Brasil S/A.

Ao contrário do minério de Figueira, utilizou-se nos ensaios de lixiviação, material classificado como marginal, isto é, minério contendo baixo teor de urânio. Devido ao teor reduzido de urânio, esse minério não é aproveitado pelo método convencional de lixiviação ácida agitada, utilizado na usina.

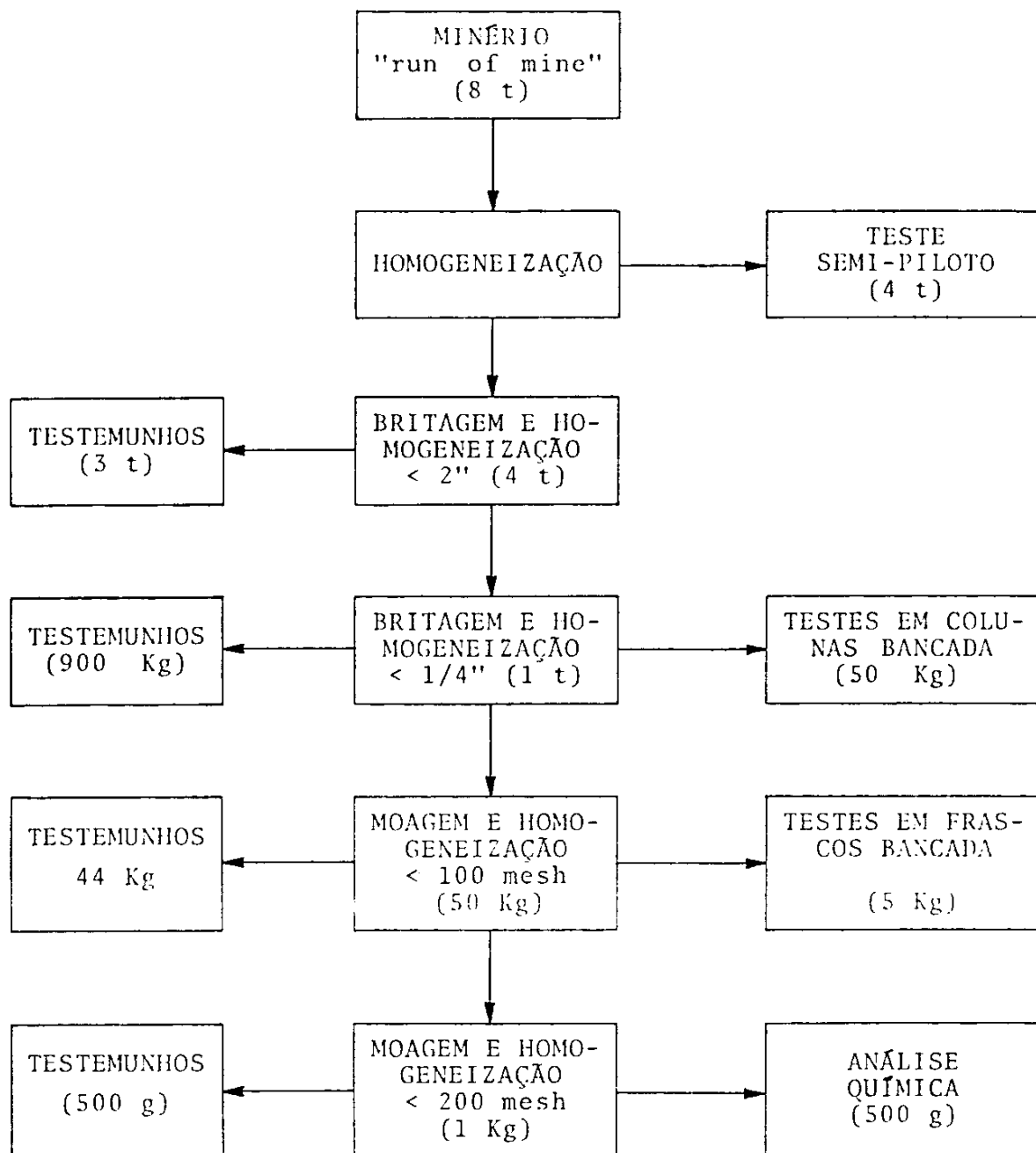


FIGURA 4 - Esquema do método de preparação da amostra do minério de Figueira - PR, para realização dos ensaios de lixiviação bacteriana em escala de bancada e semipiloto.

Mineralogicamente esse material é constituído de feldspato alcalino sericita (em parte produto de alteração na nefelina) e de pirita finamente disseminada pelo minério. O material faz parte de um pacote de tinguaitos/fonolitos de cor cinza claro, devido à presença de argila branca (caolinita). Outros minerais presentes são a muscovita, goethita e galena (PbS). O urânio se apresenta principalmente na forma de uraninita (UO_2) e alguns traços de uranofana ($CaO \cdot 2UO_2 \cdot 2SiO_2 \cdot 6H_2O$). Além do urânio, também estão presentes outros elementos de interesse como o zircônio e o molibdênio. A constituição química para os elementos de maior interesse é mostrada na tabela 4.

Devido à proximidade (cerca de 15 Km) da mina com o laboratório onde os testes iniciais foram realizados (Laboratório de Processos, atualmente sob responsabilidade da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN), optou-se pela realização do ensaio piloto (lixiviação em pilha) em área exclusiva do próprio laboratório.

Assim, foi enviada ao laboratório uma amostra de 370 t do referido minério, a qual foi convenientemente preparada para realização de todos os testes, conforme o esquema da figura 5.

IV.4.2. Ensaio em frascos agitados

Conforme já destacado anteriormente, esse tipo de ensaio tem por finalidade verificar de forma simples e relativamente rápida, a potencialidade de uma amostra mineral frente à técnica de lixiviação bacteriana.

Baseando-se na literatura disponível e em inúmeros testes exploratórios com os referidos minérios, conseguiu-se estabelecer

TABELA 4 - Composição química para os elementos de maior interesse, da amostra de minério de baixo teor de urânio da jazida de Poços de Caldas -MG, utilizada nos estudos de lixiviação bacteriana.

COMPONENTES	TEORES (%)
U_3O_8	0,032
MoO_3	0,021
Fe_2O_3	3,47
Sulfeto (S^{2-})	1,96
S_{total}	2,48

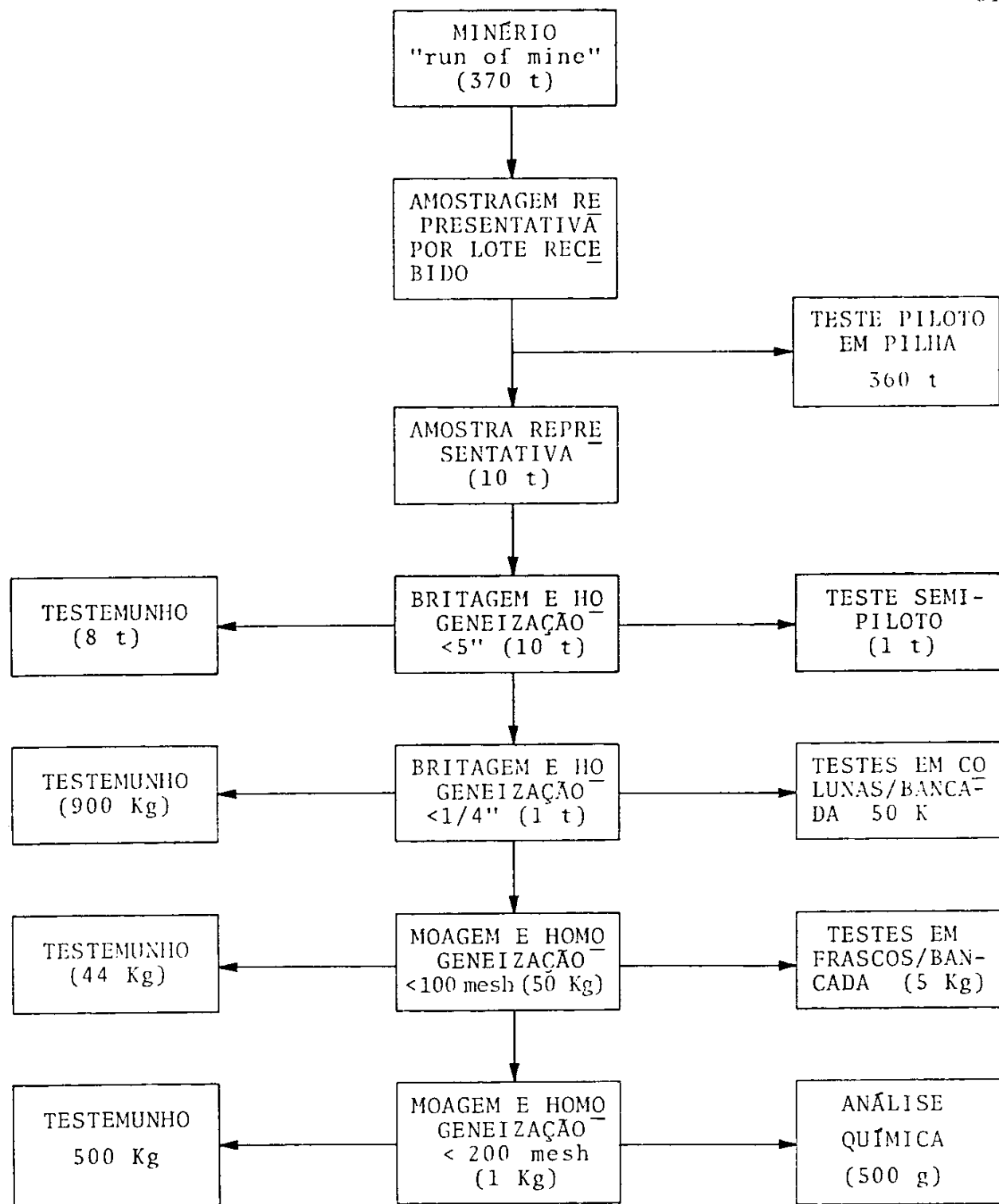


FIGURA 5 - Esquema do método de preparação da amostra do minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG, para realização dos ensaios de lixiviação bacteriana em escala da bancada, semipiloto e piloto.

uma metodologia básica para a realização desse estudo de avaliação, com os dois tipos de minérios citados. As condições básicas estabelecidas para todos os ensaios foram:

- a) tipo de frascos: Erlenmeyer de 250 ml
- b) massa de minério: 30 g/frasco
- c) granulometria do minério: 100% inferior à 100 mesh
- d) volume de solução lixiviante: 120 ml/frasco
- e) inóculo: 5% v/v com *T. ferrooxidans* previamente isolado do respectivo minério
- f) incubação: sob agitação constante (200 rpm) em mesa agitadora marca EQUILABOR (Piracicaba - SP), em sala com temperatura controlada (28 - 30°C).

Dois tipos de solução lixiviante foram usadas nos testes, objetivando-se avaliar o comportamento bacteriano na ausência e na presença de meio de cultura:

- a) meio de cultura 9K (sem adição de Fe^{2+}) ao pH 2,8
- b) água acidificada ao pH 2,8 com H_2SO_4 1N

Objetivando-se avaliar a resposta do minério na presença de bactérias (inoculadas e naturais do minério) e na ausência destas, foram estabelecidos os seguintes tratamentos básicos:

- a) frascos inoculados com a respectiva cultura ativa (inoculado)
- b) frascos inoculados, porém com adição de formaldeído concentrado (5% v/v) para esterilização do conjunto (controle químico)
- c) frascos não inoculados e não esterilizados (atividade bacteriana natural).

Procedimento experimental. Antes de se efetuar os tratamentos indicados, os conjuntos foram mantidos nas condições básicas para se efetuar as correções do pH da polpa (minério + solução lixiviante) para 2,8 com H_2SO_4 1N (pH ótimo para o desenvolvimento bacteriano). Quando o pH se estabilizou em torno desse valor (sem alteração significativa em 2 a 3 dias), encerrou-se essa fase de estabilização do pH. Foi feita uma amostragem da solução para se avaliar a solubilização do urânio somente pela adição de ácido, e a seguir efetuou-se os tratamentos. O volume de ácido utilizado nas correções foi devidamente registrado, para se calcular o consumo deste em relação à massa de minério (parâmetro importante em um processo de lixiviação ácida).

Amostragens. No início do ensaio, os frascos foram pesados para se efetuar as correções de volume perdido por evaporação e retirada de amostras; as correções foram feitas com água esterilizada antes de cada amostragem. Estas foram feitas periodicamente após sedimentação das polpas (1-2 horas), pela retirada de alíquotas para dosagem de Fe^{2+} , Fe^{3+} , U e Mo. As perdas de massa dos elementos citados pela retirada de alíquotas, foram compensadas nos cálculos subseqüentes à cada amostragem. Os ensaios foram encerrados quando os teores de U e Mo se estabilizaram em solução. A seguir, filtrou-se a polpa de cada frasco, lavou-se o resíduo com água acidificada (mesmo pH de encerramento), e após secagem do resíduo, analisou-se este para os mesmos elementos de interesse, afim de se obter os dados finais de extração. Periodicamente efetuou-se testes de viabilidade bacteriana nos frascos esterilizados, para controle da eficiência do método: 1 ml de solução foi inoculado em frasco contendo meio 9K completo (10 ml) e incubado nas condições ótimas. O não crescimento do *T. ferrooxidans* em 15 dias de incubação, indicava a eficiência da esterilização.

IV.4.3. Ensaio em colunas de percolação (laboratório)

Após a indicação positiva da atividade bacteriana nos minérios citados, pelos testes em frascos agitados, iniciou-se a etapa seguinte do desenvolvimento experimental do programa, através dos testes de lixiviação estática por percolação em colunas. Também nesse caso, realizou-se vários testes exploratórios objetivando-se estabelecer as condições básicas operacionais, para os tipos de minérios em estudo. Essas condições foram as seguintes:

- a) colunas: cilíndricas de vidro de 40 cm de altura por 7,5 cm de diâmetro interno.
- b) massa de minério: 500 g/coluna
- c) granulometria do minério: 100% inferior à 1/4"
- d) volume de solução lixiviante: 250 ml/coluna
- e) inóculo: 5% v/v com *T. ferrooxidans* previamente isolado do respectivo minério
- f) incubação: em sala com temperatura controlada (28 - 30°C)
- g) aeração: injeção de ar comprimido no frasco coletor da lixívia
- h) recirculação da lixívia: constantemente através de bomba peristáltica marca MILAN, modelo P-301 a uma vazão de alimentação de 5 ml/min (taxa de percolação de cerca de 40 l/h.m²).

Em função dos resultados obtidos nos testes em frascos, utilizou-se como solução lixiviante nos ensaios em colunas, somente H₂O acidificada a pH 2,8 com H₂SO₄ 1N.

Da mesma forma que nos testes em frascos, procurou-se comparar a ação da bactéria inoculada e de bactérias já presentes no minério, com uma lixiviação sem a presença bacteriana. Dessa forma, os tratamentos efetuados foram:

- a) inóculo com a respectiva cultura ativa (inoculado)
- b) também inoculado, porém com adição de formaldeído concentrado (5% v/v) para esterilização do conjunto (controle)
- c) não inoculado e não esterilizado (atividade bacteriana natural)
- d) Lixiviação química com solução sulfúrica à 15 g/l, mantida nessa concentração durante todo o ensaio.

Procedimento experimental - O esquema do modelo operacional utilizado pode ser visto na figura 2 (Seção II.4.2). Iniciou-se a operação percolando-se o volume inicial da solução lixiviante pelo minério, recolhendo-a em outro frasco coletor. Mediu-se o volume percolado, ajustou-se o pH para 2,8 com H_2SO_4 1N e iniciou-se o processo de recirculação da lixívia. As correções de acidez para o pH indicado, foram sendo feitas periodicamente até a estabilização do pH em torno de 2,8, por 2 a 3 dias sem alteração significativa. Nesse momento, foram feitas amostragens para avaliar a extração de urânio e molibdênio nessa fase e, a seguir, efetuou-se os tratamentos indicados. As perdas de volume por evaporação e por retiradas de alíquotas para análises foram corrigidas com H_2O esterilizada. O volume de ácido utilizado nas correções, foi devidamente registrado, para se calcular o consumo de ácido da etapa.

Amostragens. Antes de cada amostragem, a recirculação da lixívia foi paralisada para a total percolação da solução. Após ajuste do volume, retirou-se alíquotas para dosagem do Fe^{2+} , Fe^{3+} , U e Mo. Devido ao longo período dos ensaios, as amostragens foram feitas entre períodos de 5 a 10 dias de operação. Os testes foram encerrados quando os teores de urânio e molibdênio se estabilizaram em solução. O minério foi lavado também por percolação, com H_2O acidificada ao mesmo pH de término, para retirada dos elementos já solubili-

zados, porém retidos pela umidade do minério. Após secagem do resíduo lixiviado, este foi devidamente preparado (moído até < 200 mesh), para análise final do elemento de interesse, afim de se obter os dados finais de extração.

IV.4.4. Ensaio em colunas de percolação (semipiloto)

Dando seqüência à ampliação da escala experimental do processo ("scale-up"), realizou-se testes em escala semipiloto, como um passo final para obtenção de dados, para orientar a execução dos testes piloto em pilhas.

Em função do conhecimento acumulado nos experimentos anteriores, bem como de observações de campo dos respectivos minérios estocados a céu aberto, introduziu-se algumas mudanças das condições básicas de trabalho entre os dois tipos de minério, apesar do sistema operacional ser o mesmo para ambos. Dessa forma, serão apresentadas separadamente as condições dos ensaios realizados.

A. Minério de Figueira - PR.

- a) coluna: cilíndricas de concreto de 3 m altura por 1 m de diâmetro interno. A coluna foi revestida internamente com emulsão asfáltica (VITKOTE-3 - Asfaltos Vitória LTDA - SP), para evitar o ataque da solução lixiviante ao concreto da coluna.
- b) massa de minério: 2.700 Kg
- c) granulometria do minério: natural da mina ("run of mine"), com blocos de até 30 cm.
- d) volume inicial de solução lixiviante: 430 l
- e) inóculo: 5% v/v com *T. ferrooxidans*, previamente isolado do próprio minério.

- f) recirculação da lixívia: constantemente através de bomba dosadora marca OMEL, modelo DMP 0/5, a uma vazão de alimentação de 30 l/h (taxa de percolação de cerca de 40 l/h.m²).
- g) recipiente coletor: caixa de cimento amianto (ETERNIT) com capacidade para 500 l, revestida com lona plástica (Lonaplas-Electroplastic - SP), para evitar ataque da solução lixiviante.
- h) incubação: temperatura ambiente.

Procedimento experimental. O ensaio foi dividido em três fases:

Fase I - correções ácidas: iniciou-se o ensaio percolando-se a solução pelo minério e corrigindo-se periodicamente a acidez com H₂SO₄ concentrado, para estabilização do pH em torno de 3,0 (5-7 dias sem alteração significativa).

Fase II - Inóculo bacteriano: após a estabilização do pH no valor indicado, efetuou-se o inóculo bacteriano, reiniciando-se a recirculação da solução lixiviante.

Fase III - Ataque sulfúrico complementar: após a estabilização da atividade bacteriana, indicada pelos teores estáveis de urânio e molibdênio na solução, efetuou-se um ataque ácido complementar, com concentrações mais elevadas de H₂SO₄, para uma efetiva solubilização dos elementos citados. Essa fase foi subdividida em várias etapas, com o objetivo de se produzir soluções adequadas, a uma operação posterior de extração do urânio da solução por solventes orgânicos (pH < 1,5 e concentração do urânio entre 300-600 mg/l). As condições de cada etapa de ataque ao minério podem ser vistas na tabela 5.

TABELA 5 - Condições básicas de cada etapa de ataque ácido na fase III, do ensaio semipiloto de lixiviação do minério de Figueira - PR.

ETAPA	VOLUME (ℓ)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ SO ₄ (g/ℓ)
1	180	95,5
2	400	34,4
3	200	33,2
4	200	98,2
5	400	20,9
6	400	6,5
7	400	28,2

Uma visão geral do sistema operacional utilizado para realização do ensaio semipiloto é mostrada na figura 6.

Amostragens. Antes de cada amostragem, paralisou-se a recirculação para total drenagem da solução lixiviante. Retirou-se alíquotas para dosagem do Fe^{2+} , Fe^{3+} , U e Mo. Nessa escala não houve correções de volumes. Após as etapas de ataque ácido, foi feita a lavagem do minério, através de solução sulfúrica a um pH idêntico ao da última etapa (sem reciclagem de efluente), até a concentração do U em solução atingir valores inferiores a 20 mg/l. Utilizou-se um total de 300 litros de água de lavagem.

B. Minério de Poços de Caldas - MG.

Devido às diferentes características físicas desse minério em relação ao de Figueira - PR, procurou-se avaliar no ensaio semipiloto, a influência da granulometria do minério, no processo de lixiviação. A utilização de soluções sulfúricas para ataque complementar ao minério, após a fase de lixiviação bacteriana, também foi avaliada para o minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas-MG. As condições básicas do ensaio são mostradas na tabela 6.

Procedimento experimental. Iniciou-se o ensaio percolando-se a solução de H_2SO_4 pH 3,0, a qual foi recolhida em baldes plásticos. Devido a granulometria mais elevada do minério e à sua própria condição de pouco material alcalino (sobretudo carbonatos), não houve necessidade de correções ácidas, ao contrário do observado com o minério de Figueira-PR. Como em ensaios anteriores foi observada uma atividade bacteriana natural significativa, não foi feito inoculo adicional. Assim, essa etapa foi considerada a fase de lixiviação bacteriana. Quando a concentração de urânio estabilizou-se em solução, iniciou-se as fases de ataque ácido, corrigindo-se a acidez das



FIGURA 6 - Vista geral da unidade semipiloto para lixiviação bacteriana em colunas de percolação, do minério de Figueira - PR.

TABELA 6 - Condições básicas do ensaio semipiloto de lixiviação bacteriana em colunas, com minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG.

PARÂMETROS	COLUNA ¹		
	1	2	3
MASSA DE MINÉRIO (Kg)	206	98,5	51
GRANULOMERIA (100% <)	5"	2"	1/2"
VOLUME DE SOLUÇÃO (ℓ) ²	50	25	12,5
TAXA DE PERCOLAÇÃO (ℓ/h.m ²) ³	40	40	40

- Foram usadas colunas de PVC medindo 1,5m de altura por 0,33m de diâmetro interno.
- Solução inicial: H₂O acidulada ao pH 3,0. Após a fase bacteriana, foram feitas 4 etapas de ataque sulfúrico, utilizando-se a mesma solução original. O ataque foi feito corrigindo-se a acidez da solução com H₂SO₄ concentrado, para as seguintes concentrações:
 - etapa 1 - 10 g/l
 - etapa 2 - 30 g/l
 - etapa 3 - 50 g/l
 - etapa 4 - 100 g/l
- A solução foi constantemente reciclada por bomba dosadora marca OMEL, modelo DMP 0/5.

soluções com H_2SO_4 concentrado, para as concentrações indicadas na tabela 6. Os volumes de ácido gasto nas correções, foram registrados para se calcular o consumo de ácido em relação à massa de minério.

Amostragens. As amostragens foram feitas seguindo a mesma sistemática do ensaio semipiloto como minério de Figueira-PR, da mesma forma que a lavagem final dos resíduos das colunas. Utilizou-se nas colunas 1, 2 e 3, respectivamente 200, 100 e 50 litros de solução sulfúrica, com pH idêntico ao da solução da última etapa. Com esses volumes, o teor de urânio em solução atingiu um valor inferior a 20 mg/l.

IV.4.5. Ensaio em pilhas (piloto)

Em função dos resultados promissores que foram sendo obtidos, culminando com os testes em escala semipiloto, foi decidida a realização de testes em escala piloto, através da técnica de lixiviação estática em pilhas.

Para a execução dos testes foi necessária a construção de instalações como pátios, tanques, bacias, etc., bem como a montagem de sistemas, sobretudo hidráulico, afim de dotar as unidades, de uma infraestrutura adequada para o desenvolvimento do processo (ver um esquema na figura 1, item I).

Poderão ser notadas nas apresentações seguintes, algumas diferenças com relação às características de cada unidade piloto. Isto se deve ao fato, que as mesmas foram construídas em épocas diferentes e para atender situações diferentes. Assim, a experiência adquirida na construção da primeira unidade (Figueira - PR), foi utiliza

da para a construção da unidade de Poços de Caldas - MG, tentando-se obviamente, aprimorar as instalações e conseqüentemente, o processo.

IV.4.5.1. Unidade piloto de Figueira - PR.

Pátio de lixiviação. Uma área de 2500 m² (50 x 50m) subdividida em dois pátios de lixiviação de 1250 m² (25 x 50m), foi regularizada como motoniveladora para propiciar um desnível adequado (1%), à drenagem das soluções para as bacias coletoras, construídas em um nível 3m abaixo dos pátios.

Essa área recebeu uma manta de polietileno (rafia) para regularizar a superfície e posteriormente uma lona plástica de 0,3 mm de espessura (Lonaplas - Eletronlastic - SP), para impermeabilização dos pátios. As figuras 7 e 8, mostram essa etapa de preparação da área. A seguir, uma camada de 15 - 20 cm de areia foi colocada sobre a lona, para protegê-la de possíveis rupturas quando da montagem da pilha de minério, efetuada por máquinas e caminhões.

Na saída dos pátios, foi construída uma caixa de coleta ("boca de lobo"), revestida com emulsão asfáltica para receber os efluentes do pátio. Essa caixa de coleta foi conectada com as bacias coletoras através de tubos soldáveis de PVC de 4", os quais podiam ser bloqueados independentemente com tampões de borracha, para desvio dos efluentes para a bacia coletora desejada.

Reservatórios de captação de soluções. Para a coleta, transferência e estocagem dos efluentes oriundos dos pátios de lixiviação, foram construídas em nível inferior aos pátios (cerca de 3m), três bacias de coleta e um tanque de concreto, para ajustes das solu



FIGURA 7 - Colocação de lona plástica, para impermeabilização do pátio de lixiviação em pilhas, na unidade piloto de Figueira - PR.



FIGURA 8 - Vista geral do pátio de lixiviação em pilhas da unidade piloto de Figueira - PR, já impermeabilizado com lona plástica.

ções lixiviantes. A capacidade de estocagem de cada bacia foi de 250 m³ e do tanque de ajuste de 40 m³.

As bacias foram escavadas no solo previamente nivelado, a uma profundidade de 2,5 m. Em suas laterais, foram construídas muretas de 50 cm de altura para impedir o acesso de efluentes pluviais ao interior das bacias. Após esses preparativos, foi feito um revestimento impermeabilizante constituído de uma camada de manta de polietileno (ráfia), para regularizar as paredes e o fundo das bacias, seguida da aplicação de emulsão asfáltica. Sobre essa camada foi colocada manta de bidim (Rhodia - SP), também posteriormente impregnada com a emulsão asfáltica em duas camadas de aplicação. Finalmente, sobre essas camadas foi colocada uma lona plástica, para conferir maior segurança com relação à impermeabilização dos reservatórios coletores.

O tanque de concreto utilizado para preparo das soluções lixiviantes, foi revestido com duas camadas de aplicação da emulsão asfáltica. A figura 9 mostra um dos reservatórios já impermeabilizado.

Vale lembrar, que toda essa impermeabilização é plenamente justificada, pois além das soluções serem de natureza ácida, as mesmas contêm metais pesados e elementos radioativos, como o urânio. Assim, a perda de soluções do sistema, seria extremamente prejudicial ao ambiente, a despeito das dimensões relativamente pequenas da unidade piloto.

Montagem da pilha de minério. Deve-se destacar inicialmente, que foram realizados três testes em escala piloto. Nos dois primeiros testes, em pilhas de aproximadamente 1.000 toneladas, utilizou-se material que já estava estocado a "céu aberto" a vários anos,



FIGURA 9 - Vista de um dos reservatório de coleta de lixívias da unidade de Figueira - PR, já totalmente impermeabilizado.

isto é, um material bastante intemperizado. Objetivou-se nesses primeiros testes, muito mais a aquisição de conhecimentos operacionais do sistema de lixiviação nessa escala, do que propriamente a obtenção de resultados de processo. Dessa forma, serão apresentados a seguir, somente dados referentes à operação da 3ª pilha de lixiviação, esta sim, utilizando-se minério recém extraído da mina.

Após a retirada do minério, este foi transportado até o pátio de lixiviação por caminhões basculante. Inicialmente formou-se uma camada de minério de cerca de 50 cm de altura, por onde os caminhões e a "pá carregadeira" transitavam. Esta foi utilizada para construir a pilha, a partir dos carregamentos de minério que eram depositados nessa base. As dimensões básicas da pilha, em forma de um tronco de pirâmide, foram:

base	= 21m x 13m
superfície	= 16m x 9m
altura	= 3m
massa	= 890 t (determinada por pesagens dos carregamentos)
granulometria	= natural da mina ("run of mine").

A figura 10, mostra a pilha de minério já preparada para sua irrigação.

Para a irrigação da pilha, utilizou-se um conjunto hidráulico constituído de tubos, conexões e registros de PVC e bombas de 7,5 cv, adaptadas com carcaças de madeira e rotores de PVC, para resistirem ao contato com a solução lixiviante de natureza ácida e corrosiva.

As figuras 11, 12 e 13, mostram respectivamente, uma bacia coletora com o sistema de transferência de soluções, um detalhe das



FIGURA 10 - Vista geral da pilha de minério de urânio de Figueira
- PR, pronta para início da lixiviação bacteriana.



FIGURA 11 - Vista parcial das instalações de coleta (reservatório e tanque) e transferência de soluções (bombas, tubulações, etc.) da unidade piloto de Figueira - PR.



FIGURA 12 - Detalhe do sistema hidráulico utilizado nas operações de lixiviação bacteriana, na unidade piloto de Figueira - PR.



FIGURA 13 - Vista geral da linha mestre de irrigação, utilizada nas operações de lixiviação bacteriana, na unidade piloto de Figueira - PR.

bombas utilizadas e uma visão da linha mestre de irrigação com as saídas para a pilha.

A irrigação foi realizada na superfície da pilha, com tubos de PVC perfurados em espaçamento entre furos de 30 cm. As figuras 14 e 15, mostram respectivamente, um detalhe da irrigação na superfície da pilha e uma bacia coletora recebendo a drenagem da solução lixiviante, já percolada pela pilha de minério.

Procedimento operacional. Diferentemente do ensaio semipiloto, onde o processo foi dividido em 3 fases, no ensaio piloto dividiu-se o procedimento operacional em apenas duas fases, em função de uma série de fatores que serão abordados no capítulo seguinte de Resultados e Discussões:

FASE I - Atividade bacteriana natural

- volume inicial de solução: 220 m^3
- pH inicial = 3,0
- vazão de alimentação: $13 \text{ m}^3/\text{h}$
- Taxa de percolação: $35-40 \text{ l/h.m}^2$

Essa solução utilizada no início do ensaio, já havia sido previamente obtida pelos dois ensaios pre-operacionais realizados, conforme mencionado anteriormente. Dessa forma, essa solução inicial pode ser considerada como um inóculo, pois a mesma apresentava a presença ativa de *T. ferrooxidans*.

FASE II - Ataque sulfúrico complementar: após a estabilização da atividade bacteriana, indicada pela estabilização de pH e dos teores de Fe^{3+} e urânio em solução, efetuou-se um ataque ácido complementar, com concentrações mais elevadas de H_2SO_4 , para uma efetiva solubilização dos elementos de interesse. Essa fase foi subdividida em várias etapas, também objetivando-se a produção de solu



FIGURA 14 - Detalhe da irrigação de lixívia na superfície da pilha, durante a operação piloto de lixiviação bacteriana do minério de urânio de Figueira - PR.



FIGURA 15 - Detalhe da drenagem da lixívia no reservatório de coleta, durante a operação piloto de lixiviação bacteriana do minério de urânio de Figueira - PR.

ções adequadas ao processo químico posterior de extração do urânio da solução, por solventes orgânicos (pH < 1,5 e concentração do urânio entre 300-600 mg/l). As condições básicas de cada etapa podem ser vistas na tabela 7.

Amostragens. O controle analítico da operação piloto, foi feito através de amostragens diárias da solução lixiviante contida na bacia de coleta. No momento da amostragens, registrou-se o volume contido na bacia, pela leitura direta da régua indicativa instalada na bacia, para efeito de cálculos da massa de urânio extraída. Ao final de cada etapa, a amostragem foi feita após a drenagem total da solução circulante (2-3 horas). Nas alíquotas retiradas determinou-se pH, Eh, Fe^{2+} , Fe^{3+} , urânio e molibdênio.

A etapa de lavagem da pilha, após estabilização da extração de urânio, foi feita dentro da mesma sistemática operacional, obviamente sem reciclagem do efluente, utilizando-se as soluções ácidas que foram processadas para a extração do urânio. Essas soluções (chamadas "refinado aquoso"), foram estocados após a extração, em uma das bacias coletoras, e por apresentarem acidez adequada (pH < 1,5), foram utilizadas para a lavagem da pilha, que foi finalizada quando o teor de urânio apresentou-se inferior a 10 mg/l.

IV.4.5.2. Unidade piloto de Poços de Caldas - MG.

Pátio de lixiviação. Devido o local de construção da unidade piloto ser plano, foi necessário elevar a base do pátio à aproximadamente 1 m de altura, para se conseguir a drenagem da solução lixiviante aos reservatórios coletores. Essa base foi preparada pela deposição de camadas compactadas de argila. A área total do pátio

TABELA 7 - Condições básicas de cada etapa de ataque ácido na fase II, do ensaio piloto de lixiviação do minério de Figueira - PR.

ETAPA	VOLUME ¹ (m ³)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ SO ₄ (g/l)
1	170	32,3
2	170	59,3
3	125	62,2
4 ²	120	11,8
5	116	30,6

1. Salienta-se que para cada etapa utilizou-se nova solução lixiviante.
2. Nessa etapa, manteve-se constante a concentração de H₂SO₄ em aproximadamente 12 g/l, sendo que nas outras, a concentração indicada é a do início da etapa.

tio foi de 600 m^2 , subdividida em três pátios independentes de 200 m^2 cada um. Nas laterais dos pátios, bem como entre eles, foram construídas canaletas de concreto, com desníveis na direção dos reservatórios de captação.

Após uma primeira impregnação da base com emulsão asfáltica, depositou-se sobre o pátio uma manta de cerca de 3 mm de espessura, composta de bidim impregnado com asfalto e areia (Torodin - Indústria Toro, SP), a qual além de impermealizar a área, confere também resistência mecânica elevada. Como pode ser visto, essa manta substituiu todo o procedimento utilizado na preparação do pátio da unidade de Figueira. Os pátios foram construídos com desnível de 1% do centro para as laterais.

As canaletas receptoras dos efluentes da pilha, foram revestidas com emulsão asfáltica, com duas camadas de aplicação. As canaletas foram conectadas com os reservatórios através de tubos soldáveis de PVC de 4" e com mangueiras flexíveis de borracha, também de 4". Essas mangueiras permitiam o desvio dos efluentes, para qualquer um dos reservatórios de captação.

Para cada pátio foi construída uma rampa independente, para o acesso de máquinas e caminhões para a montagem das pilhas. Uma visão geral dos pátios (um já revestido), pode ser observada na figura 16.

Reservatórios de captação de soluções. Foram construídas duas bacias e recuperados três tanques de concreto já existentes no local. A capacidade de estocagem das bacias foi de 160 m^3 /bacia e dos tanques 33, 35 e 82 m^3 , respectivamente. O revestimento desses reservatórios, seguiu o mesmo procedimento utilizado nos reservatórios da unidade de Figueira.



FIGURA 16 - Visão geral dos pátios de lixiviação (um já totalmente impermeabilizado), da unidade piloto de Poços de Caldas - MG.

Montagem da pilha de minério. O material a ser processado, foi transportado da mina de urânio do Campo do Cercado, Caldas - MG, por caminhões basculante até a unidade piloto, onde o mesmo foi depositado ao lado do pátio de lixiviação. Uma "pá carregadeira" construiu a pilha sobre o pátio, conforme pode ser visto nas figuras 17 e 18.

As dimensões básicas da pilha foram:

- base = 19m x 9m
- superfície = 14m x 5m
- altura = 2m
- massa = 360 t (determinada por pesagens dos carregamentos)

Para a irrigação da pilha, utilizou-se um conjunto hidráulico semelhante ao utilizado nos ensaios piloto de Figueira, à exceção do sistema de irrigação que no caso de Poços de Caldas, foi com aspersores plásticos com raio de ação de cerca de 1 m. As figuras 19 e 20 mostram respectivamente, os tanques coletores com o sistema hidráulico já montado e um detalhe lateral da pilha já recebendo a irrigação.

Procedimento operacional. A exemplo do teste piloto realizado com o minério de Figueira, esse teste piloto também foi dividido em duas fases:

FASE I - Atividade bacteriana natural

- volume inicial de solução: 77 m³
- pH inicial = 3,0
- vazão de alimentação: 6 m³/h
- taxa de percolação: 35 - 40 l/h.m²
- granulometria: natural de mina ("run of mine")



FIGURA 17 - Preparo da pilha de minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG, para a operação piloto de lixviação bacteriana.



FIGURA 18 - Vista geral da pilha de minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG, durante a operação piloto de lixiviação bacteriana.



FIGURA 19 - Vista geral dos reservatórios, tanques coletores e sistema hidráulico, da unidade piloto de lixiviação bacteriana de Poços de Caldas - MG.



FIGURA 20 - Vista lateral da pilha piloto de lixiviação bacteriana, de minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG, mostrando um detalhe da irrigação.

Devido às características do minério, não houve necessidade de correções ácidas durante essa fase. Durante o período de reciclagem, notou-se rapidamente atividade bacteriana, conforme comprovado tanto pelos dados analíticos (abaixamento do pH, elevação da concentração de Fe^{3+} , etc.), como também por testes de viabilidade bacteriana (discutido em "Determinações Analíticas").

FASE II - Ataque sulfúrico complementar: após a estabilização da atividade bacteriana natural, indicada pelos parâmetros mencionados no teste de Figueira, efetuou-se um ataque ácido complementar, com concentrações mais elevadas de H_2SO_4 , objetivando-se também uma maior solubilização dos elementos de interesse. Essa fase foi subdividida em quatro etapas, objetivando-se nesse caso, avaliar a eficiência de concentrações crescentes de acidez em cada etapa de ataque. A tabela 8 mostra as condições de cada etapa.

Amostragens. O procedimento adotado foi o mesmo utilizado no teste piloto de Figueira. A lavagem da pilha foi iniciada quando não mais se detectou extração adicional de urânio na etapa 4. Utilizou-se somente água, visto que a solução dessa etapa final ainda apresentava acidez elevada (cerca de 300 g/l), fazendo com que a umidade retida no minério, determinasse acidez adequada à água que foi sendo irrigada. Também nesse caso, não houve circulação da solução: o efluente foi sendo recuperado em reservatório distinto do reservatório de alimentação, até o teor de urânio ser inferior a 10 mg/l.

TABELA 8 - Condições básicas de cada etapa de ataque ácido na fase II, do ensaio piloto de lixiviação do minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG.

ETAPA	VOLUME ¹ (m ³)	CONCENTRAÇÃO DE H ₂ SO ₄ (g/ℓ)
1	63,0	18,0
2	56,7	55,4
3	58,8	101,0
4	14,6	302,8

1. Salienta-se que utilizou-se sempre a mesma solução, corrigindo-se apenas a acidez para se iniciar a etapa seguinte.

IV.5. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

IV.5.1. Amostras líquidas

IV.5.1.1. pH e Eh (potencial de óxido-redução)

O pH e Eh das soluções foram medidos com um equipamento marca MICRONAL, modelo B221, utilizando-se eletrodo combinado de vidro para as determinações de pH e eletrodo de platina (referência Ag/AgCl) para as determinações de Eh.

As medidas foram feitas diretamente nos frascos experimentais ou nos frascos coletores de solução, como no caso dos ensaios em colunas de percolação, escala de laboratório. Nos ensaios em escalas maiores, onde a disponibilidade de soluções foi grande, as medidas foram feitas nas próprias alíquotas, retiradas para dosagem posterior dos elementos de interesse.

Em determinados experimentos (por exemplo, lixiviação em frascos), houve necessidade de uma prévia assepsia dos eletrodos, através da exposição destes por 1 hora à luz ultravioleta.

IV.5.1.2. Fe^{2+} e Fe^{3+}

As determinações de Fe^{2+} e Fe^{3+} foram feitas por volumetria redox, titulando-se as amostras com soluções padronizadas de dicromato de potássio, utilizando-se como indicador difenilamino sulfato de bário (solução 0,5%).

Nessas condições, Fe^{2+} é determinado diretamente em meio ácido (H_2SO_4 e H_3PO_4) e o Fe^{3+} é previamente reduzido à Fe^{2+} com clo

reto estanoso em meio ácido (HCl) sob aquecimento; adiciona-se cloreto mercúrico para eliminar excesso de cloreto estanoso que poderia reagir com o dicromato. Titula-se a solução e do resultado obtido (Fe^{2+} total) subtrai-se o valor do Fe^{2+} inicialmente determinado, obtendo-se então o valor do Fe^{3+} presente (VOGEL, 1978).

IV.5.1.3. Acidez livre (H^+)

A acidez das soluções lixiviantes foram determinadas por volumetria ácido-base, titulando-se potenciométricamente as amostras com soluções padronizadas de NaOH, até pH 5,6.

Devido à presença de cátions facilmente hidrolizáveis nos licores de lixiviação (Fe^{3+} , Mo^{6+} , U^{6+}), os quais durante a titulação poderiam provocar hidrólise liberando H^+ e assim, influir nos resultados de uma simples titulação, utilizou-se uma solução de oxalato de potássio 8% à pH 5,6 para complexação desses íons. Após a mistura da alíquota da amostra à solução de oxalato de potássio (2ml: 30ml), titulou-se potenciométricamente até pH 5,6 com NaOH. (VOGEL, 1978).

IV.5.1.4. Tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)

Nos experimentos citados no item IV.2.1., avaliou-se a oxidação do S_2O_3^- pelos isolados bacterianos, titulando-se o S_2O_3^- presente após o período de incubação, com solução padrão de iodo e usando-se solução de amido 2% como indicador (VOGEL, 1978).

IV.5.1.5. Urânio

Três tipos de determinação da concentração de urânio nas soluções foram utilizados, dependendo do tipo de lixívia produzida e da concentração do elemento em solução.

Para lixívias obtidas nos experimentos envolvendo o minério de Figueira, utilizou-se a técnica de espectrometria de emissão por plasma de indução acoplada através de um espectrômetro JARRELL-ASH, modelo Atoncomp-975.

No caso de lixívias obtidas nos experimentos com minério de Poços de Caldas, como essa técnica não mostrou resultados satisfatórios, devido à interferência de elementos "terras raras", determinou-se o urânio por espectrofotometria.

Uma alíquota da amostra foi tratada à quente com HNO_3 e H_2O_2 . Após resfriamento, o íon uranila (UO_2^{2+}) foi extraído com acetato de etila e uma alíquota da fase orgânica foi então colocada em balão contendo o reagente colorimétrico, constituído de dibenzoilmetano em meio piridina/acetona. Após repouso por 1 hora em ambiente escuro, a intensidade da cor foi medida à 410 nm em um espectrofotômetro UV-VIS PERKIN-ELMER, modelo coleman 55. No caso dos ensaios piloto com o minério de Figueira, as análises de urânio também foram realizadas por essa técnica (CARL, 1958).

Quando as concentrações de urânio apresentavam-se reduzidas ($< 20 \text{ mg/l}$), como por exemplo em águas de lavagem, determinou-se esse elemento pela técnica fluorimétrica, utilizando-se um fluorímetro JARRELL-ASH, modelo 26.000.

IV.5.1.6. Molibdênio

O molibdênio das lixívias também foi determinado por espectrometria de emissão por plasma. No caso dos ensaios em Figueira, onde não se dispunha do equipamento, determinou-se o elemento por espectrofotometria.

Uma alíquota da amostra foi tratada com H_2SO_4 , H_3PO_4 e o reagente colorimétrico ditiol (3,4 ditiol, tolueno) durante 20 minutos. A seguir extraiu-se o complexo ditiol-tolueno, pouco solúvel em meio aquoso, com clorofórmio. A intensidade da cor foi medida à 670 nm em espectrofotômetro (SANDELL, 1959).

IV.5.2. Amostras sólidas

IV.5.2.1. Urânio, Molibdênio e Fe total

Nas amostras originais dos minérios estudados, bem como nos resíduos produzidos após os testes de lixiviação bacteriana, esses elementos foram determinados pela técnica de fluorescência de raios-X, utilizando-se um espectrômetro sequencial de raios-X fluorescente, marca RIGAKU-GEIGER/FLEX, modelo 9581, série BR 12.029.

IV.5.2.2. Sulfeto e S_{total}

Tanto no minério como nos resíduos finais dos ensaios, essas duas espécies foram determinadas utilizando-se método gravimétrico pela precipitação do sulfato como sulfato de bário.

O teor S_{total} foi inicialmente determinado como sulfato, após uma prévia fusão oxidante da amostra mineral com uma mistura de MgO e Na_2CO_3 (3:1) à 600 - 800°C.

A seguir foi determinado o teor de sulfato presente (também por gravimetria), após prévia digestão da amostra com HCl concentrado à quente.

O teor de sulfeto das amostras minerais foi obtido pela diferença entre o teor de S_{total} e o de sulfato presente (VOGEL, 1978).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE *T. ferrooxidans* E *T. thiooxidans*.

Conforme salientado anteriormente (item IV.1.1), conseguiu-se o isolamento dessas espécies bacterianas com uma certa facilidade, utilizando-se amostras líquidas ou sólidas com as características já mencionadas: presença de sulfetos metálicos, sobretudo a pirita, e pH ácido.

As amostras utilizadas com algumas características básicas, bem como as espécies isoladas, podem ser vistas na tabela 9. Pode-se notar que todas as amostras utilizadas apresentaram um pH ácido. Tal acidez decorre da própria atividade bacteriana oxidando os sulfetos metálicos presentes no minério. Normalmente, essa oxidação é devida a presença das duas espécies de *Thiobacillus*.

Entretanto, em algumas amostras somente foi possível isolar uma delas, com predominância do *T. ferrooxidans*. Assim conseguiu-se 13 isolados de *T. ferrooxidans* e 8 de *T. thiooxidans*. Provavelmente condições específicas da composição da amostra determinam a presença predominante de uma espécie em relação à outra; concentração elevada de um metal tóxico, valores mais baixos ou mais altos de pH, etc., podem determinar a viabilidade de uma espécie mais adaptada a essas condições.

A seleção das espécies desejadas foi feita pela inoculação das amostras nos meios de cultura específicos de cada espécie. Quando ocorreu o indício da atividade bacteriana, realizou-se uma inoculação em meio de cultura novo. Após 3 a 5 inocula-

TABELA 9 - Amostras utilizadas para o isolamento e purificação de *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*.

Tipo de amostra	Caracterização	Localização	pH	Espécie isolada	Código
Sólida	Minério uranífero contendo pirita	Poços de Caldas - MG	3,1	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-PCE
Líquida	Efluente de pilha de lixiviação estática com minério uranífero contendo pirita	Poços de Caldas - MG	1,5	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-PCP01 Tt-PCP01
Líquida	Efluente de pátio de estocagem de minério uranífero contendo pirita	Poços de Caldas - MG	2,7	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-001E Tt-001E
Sólida	Minério uranífero contendo pirita	Figueira - PR	3,8	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-FG02
Líquida	Efluente de coluna de lixiviação estática com minério uranífero contendo pirita	Figueira - PR	1,0	<i>T. thiooxidans</i>	Tt-FG01
Líquida	Efluente de pátio de estocagem de minério uranífero contendo pirita	Figueira - PR	2,4	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-FG460 Tt-FG460
Sólida	Rejeito piritoso de mina de carvão abandonada	Figueira - PR	1,9	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-ELC Tt-ELC
Sólida	Rejeito piritoso da mina de carvão ativa - Cia. Carbonífera Cambui	Figueira - PR	2,4	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MCPI
Líquida	Efluente da lavagem do carvão da mina da Cia. Carbonífera Cambui	Figueira - PR	1,7	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-MC01 Tt-MC01

(Continuação TABELA 9)

Tipo de amostra	Caracterização	Localização	pH	Espécie isolada	Código
Líquida	Idem a anterior, porém em outro ponto de amostragem	Figueira - PR	2,1	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MC04
Líquida	Efluente de rejeitos piritosos de mina de carvão abandonada	Figueira - PR	2,1	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MC115
Líquida	Efluente naturais de mina de carvão ativa	Siderópolis - SC	1,7	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-SSP Tt-SSP
Líquida	Efluente da lavagem de mina de carvão	Siderópolis - SC	2,0	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-SLP Tt-SLP
Líquida	Efluente de coluna de lixiviação estática em minério uranífero	Lagoa Real - BA	1,5	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-LR

1. Medidas de pH feitas diretamente nas amostras líquidas e para amostras sólidas as medidas foram feitas numa suspensão de 10g e 50 ml de H₂O destilada, após 30 minutos de agitação.

ções obteve-se a seleção das mesmas. No caso do *T. ferrooxidans*, esse indício foi revelado pela oxidação do $\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}$ do meio de cultura. Essa oxidação foi detectada pela titulação do Fe^{3+} presente no meio ou pela medida da variação do Eh do meio: de um potencial inicial de ~ 340 mV (presença do íon Fe^{2+}), a oxidação bacteriana em poucos dias (~ 2 dias), determina um potencial superior a ~ 550 mV (presença do íon Fe^{3+}). Além disso a própria variação da cor do meio cultura, indica qualitativamente a atividade biológica: nas condições ácidas iniciais do meio (pH $\sim 2,5$) a solução contendo Fe^{2+} é verde-claro e vai se tornando vermelho-tijolo, com a elevação do Fe^{3+} no meio devido a oxidação bacteriana.

No caso do *T. thiooxidans*, acompanhou-se o desenvolvimento no meio contendo enxofre, pelo abaixamento de pH. Quando o pH atingiu valores inferiores a 1,0, procedeu-se um repique em meio novo. Após 3 a 5 passagens, foi iniciada a purificação da espécie. Deve-se destacar que tanto *T. thiooxidans* como *T. ferrooxidans* oxidam o enxofre. Assim, essa fase de enriquecimento por diluição sucessiva, não assegura a presença só da primeira espécie. Entretanto, como *T. ferrooxidans* não cresce em meio sólido contendo agar e o *T. thiooxidans* forma normalmente colônias, conseguiu-se a purificação dessa última espécie, utilizando-se o meio de cultura contendo tiosulfato como fonte de energia e ágar como agente solidificante.

Para purificar os isolados de *T. ferrooxidans*, utilizou-se meio de cultura contendo Fe^{2+} como fonte de energia específico, solidificado com agarose ou ácido silícico. Melhores resultados foram conseguidos com o primeiro agente solidificante. Mesmo assim conseguiu-se obter formação colonial em meio com ácido silícico, o que justifica o esforço em controlar melhor a obtenção desse gel, para posteriores trabalhos de rotina. A substituição da agarose pelo

gel de ácido silícico é fundamental para a execução desses trabalhos, devido ao alto custo da agarose. Atualmente em nosso laboratório, consegue-se boa reprodutividade de resultados utilizando-se esse agente de solidificação do meio de cultura para *T. ferrooxidans*.

O crescimento dessa espécie em meio sólido, mesmo utilizando-se agarose, é muito lento e irregular. As colônias são pequenas e só se tornam visíveis após 8 a 10 dias do inóculo. Entretanto, essa visualização é facilitada pela cor marrom-avermelhada característica da presença de precipitados de Fe^{3+} . As colônias são irregulares em sua forma e apresentam um tamanho médio de cerca de 1 mm. Praticamente nenhuma variação na morfologia colonial pode ser observada nos vários isolados bacterianos. Essas dificuldades também são citadas por TUOVINEN & KELLY (1973), MANNING (1975), MISHRA *et alii* (1983). As figuras 21 e 22 mostram colônias de dois isolados de *T. ferrooxidans* de regiões diferentes e a figura 23 mostra uma colônia em detalhe. As colônias obtidas foram semelhantes às descritas por MISHRA *et alii* (1983) e HARRISON Jr. (1984)

Por outro lado, colônias de *T. thiooxidans* foram mais fáceis de serem obtidas. Cerca de 10 dias após o inóculo, conseguiu-se visualizar as colônias que se apresentaram claras (amarelo pálido a branco), mais regulares, mas também diminutas. Como pode ser visto nas figuras 24 e 25, alguma variação na forma e na cor pode ser detectada entre dois isolados diferentes, ao contrário da espécie *T. ferrooxidans*.

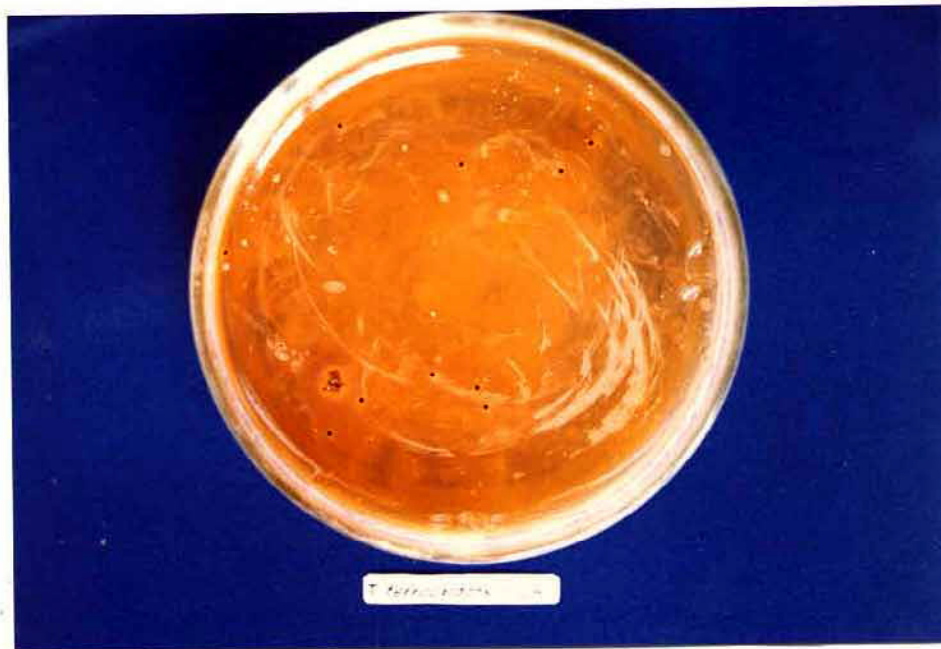


FIGURA 21 - Colônias de um isolado de *T. ferrooxidans* (LR), obtidas em meio de cultura solidificado com agarose (≈20 dias após inóculo).



FIGURA 22 - Colônias de um isolado de *T. ferrooxidans* (FG-02), obtidas em meio de cultura solidificado com agarose (~20 dias após inóculo).



FIGURA 23 - Colônia típica de *T. ferrooxidans* obtida em meio de cultura solidificado com agarose (aumento de 50x).



FIGURA 24 - Colônias de um isolado de *T. thiooxidans* (FG-01), obtidas em meio de cultura solidificado com agar (≈10 dias após inóculo).



FIGURA 25 - Colônias de um isolado de *T. thiooxidans* (ELC), obtidas em meio de cultura solidificado com agar (≈10 dias após inóculo).

V.2. ALGUNS ESTUDOS FISIOLÓGICOS BÁSICOS

V.2.1. Oxidação de diferentes substratos pelos isolados bacterianos.

Um dos critérios fisiológicos mais simples e totalmente aceito para identificar as espécies *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, é a utilização de substratos inorgânicos oxidáveis por essas espécies bacterianas. Como já salientado, enquanto que o *T. ferrooxidans* utiliza Fe^{2+} e formas reduzidas de enxofre, sobretudo S^0 e S^{2-} , o *T. thiooxidans* só utiliza essas últimas para obter energia para o seu crescimento.

Após a purificação dos respectivos isolados bacterianos, que devido à própria seletividade dos meios utilizados já garante a identificação das espécies desejadas, realizou-se esse teste de oxidação de substratos para assegurar de forma definitiva a identificação dos isolados obtidos.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos com os 13 isolados de *T. ferrooxidans*. Pode-se notar que todas as culturas foram capazes de oxidar os 3 substratos oxidáveis. Em relação à oxidação do Fe^{2+} , observa-se alguma variação em termos do tempo máximo para oxidar todo o Fe^{2+} presente no meio ($\sim 9,0$ g/l). Enquanto que Tf-PCE, Tf-FG02, Tf-MC01, Tf-MCPI, Tf-MC115, Tf-SSP e Tf-SLP, utilizaram todo o substrato em até 48 horas, as outras culturas oxidaram somente parte deste. Entretanto observou-se que até 60 horas de cultivo (resultados não mostrados), estas culturas oxidaram totalmente o íon Fe^{2+} . Em suma, houve alguma variação na resposta em relação ao tempo de oxidação, porém pode-se afirmar que esse período está compreendido entre 40 a 60 horas após o inóculo.

TABELA 10 - Utilização de 3 substratos oxidáveis pelos diferentes isolados de *T. ferrooxidans*.

ISOLADO	Fe ²⁺ *	S ⁰ **	S ₂ O ₃ ²⁻ ***
	(%)	(pH)	(%)
Tf-PCE	100	1,1	45,9
Tf-PCPO1	95,5	1,2	50,8
Tf-001E	73,0	0,9	46,0
Tf-FG02	100	0,8	36,3
Tf-FG460	100	0,8	51,0
Tf-ELC	77,5	0,9	46,0
Tf-MCO1	100	0,7	58,8
Tf-MCPI	100	0,7	15,6
Tf-MCO4	55,0	0,9	41,0
Tf-MC115	100	0,7	41,0
Tf-SSP	64,0	0,9	28,0
Tf-SLP	100	0,8	36,0
Tf-LR	74,0	0,9	26,1

* Porcentagem de oxidação após 48 horas de cultivo

** Valor do pH do meio (inicial ~3,0), após 10 dias de cultivo

*** Porcentagem de oxidação após 15 dias de cultivo

Tal resultado não deve ser entendido como uma variação fisiológica entre os isolados, pois as condições do teste foram estabelecidas somente para se verificar a utilização ou não do referido substrato.

Ainda pela tabela 10, pode-se observar que todos os isolados utilizaram o enxofre elementar (S^0) como fonte de energia. Após 10 dias de cultivo no meio contendo enxofre, os valores do pH do meio situaram-se em torno de 1,0, indicando a produção de H_2SO_4 a partir da oxidação do S^0 . A utilização do tiosulfato como fonte de energia por *T. ferrooxidans*, apesar de ser também citada como uma característica fisiológica da espécie, não é um critério tão essencial quanto os anteriores. Vários trabalhos tem mostrado um crescimento não muito vigoroso, e em alguns casos até ausência de crescimento, do *T. ferrooxidans* quando cultivado na presença de tiosulfato como fonte energética (KINSEL, 1960; CORRICK & SUTTON, 1961, UNZ & LUNDGREN, 1961; RAZZELL & TRUSSELL, 1963).

De qualquer forma, o teste realizado mostrou que todos os isolados de *T. ferrooxidans*, utilizaram em maior ou menor extensão, o tiosulfato como fonte de energia (tabela 10).

Em relação aos isolados purificados de *T. thiooxidans* os resultados obtidos indicaram de forma inequívoca o que era esperado. A tabela 11 mostra que em nenhum caso houve a utilização do Fe^{2+} como substrato e que, a utilização tanto do enxofre como do tiosulfato, ocorreu nos 8 isolados obtidos. Pode-se observar que a utilização do enxofre foi mais efetiva que pelos isolados de *T. ferrooxidans*, pois enquanto que estes determinaram em média um pH $\sim 1,0$ após

TABELA 11 - Utilização de 3 substratos oxidáveis pelos diferentes isolados de *T. thiooxidans*.

ISOLADO	Fe ²⁺ *	S ⁰ **	S ₂ O ₃ ²⁻ ***
	(%)	(pH)	(%)
Tt-PCP01	ND	1,1	40,0
Tt-001E	ND	0,7	70,1
Tt-FG01	ND	1,1	20,1
Tt-FG460	ND	0,9	50,1
Tt-ELC	ND	0,6	65,2
Tt-MC01	ND	0,6	51,0
Tt-SSP	ND	1,0	40,0
Tt-SLP	ND	0,9	40,0

* Porcentagem de oxidação após 10 dias de cultivo

** Valor do pH do meio (inicial ~3,0), após 5 dias de cultivo

*** Porcentagem de oxidação após 10 dias de cultivo

ND - Não detectada

10 dias de cultivo, aqueles de *T. thiooxidans* determinaram um pH $\approx 0,7$ em apenas 5 dias. O tiosulfato também foi melhor utilizado pelas culturas de *T. thiooxidans*, à exceção do Tt-FG01 (tabela 11), que pelo *T. ferrooxidans*, pois em 10 dias de cultivo, obteve-se aproximadamente 50% de oxidação em média.

Associados aos resultados obtidos durante a etapa de purificação em meio sólido, a qual praticamente já selecionou as duas espécies procuradas, os dados de utilização de substratos oxidáveis reforçaram as definições de cada espécie.

V.2.2. Efeito da temperatura e agitação no crescimento de *T. ferrooxidans*.

Após a verificação da oxidação de diferentes substratos oxidáveis pelos isolados obtidos, a qual foi feita em condições consideradas adequadas segundo a literatura consultada, realizou-se este ensaio procurando-se definir as condições ótimas de cultivo para realização dos estudos subseqüentes. Dois parâmetros importantes foram examinados: temperatura e aeração, através de agitação constante das culturas.

As figuras 26 e 27, mostram o efeito da temperatura no crescimento dos isolados Tf-PCE e Tf-FG460, respectivamente. Pode-se notar claramente que a máxima taxa de crescimento foi obtida à temperatura de 30°C, enquanto que a 10°C essa taxa diminuiu consideravelmente; enquanto que a 30°C obteve-se 100% de oxidação em apenas 2 dias de cultivo (em ambos isolados), a 10°C esse percentual foi atingido somente após 15 dias no isolado Tf-PCE (figura 26). No caso do

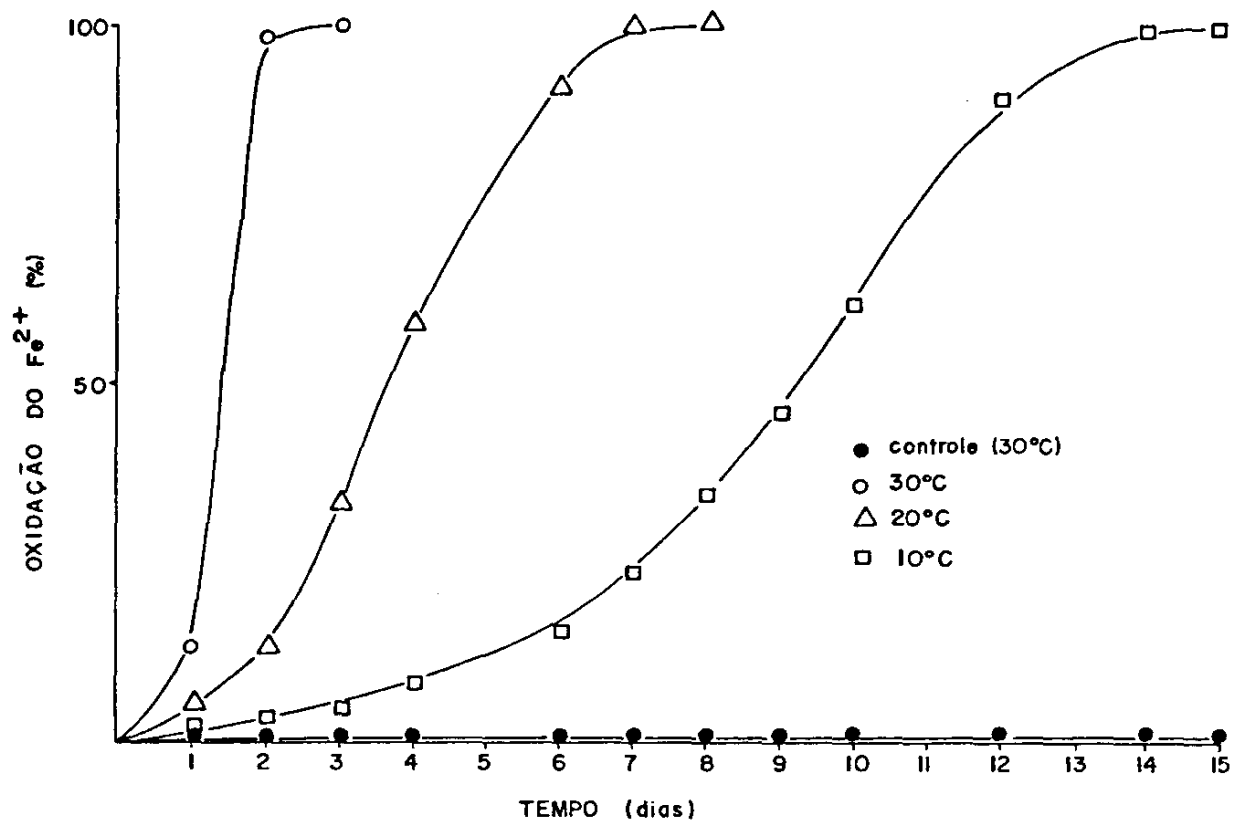


FIGURA 26 - Efeito da temperatura no crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE.

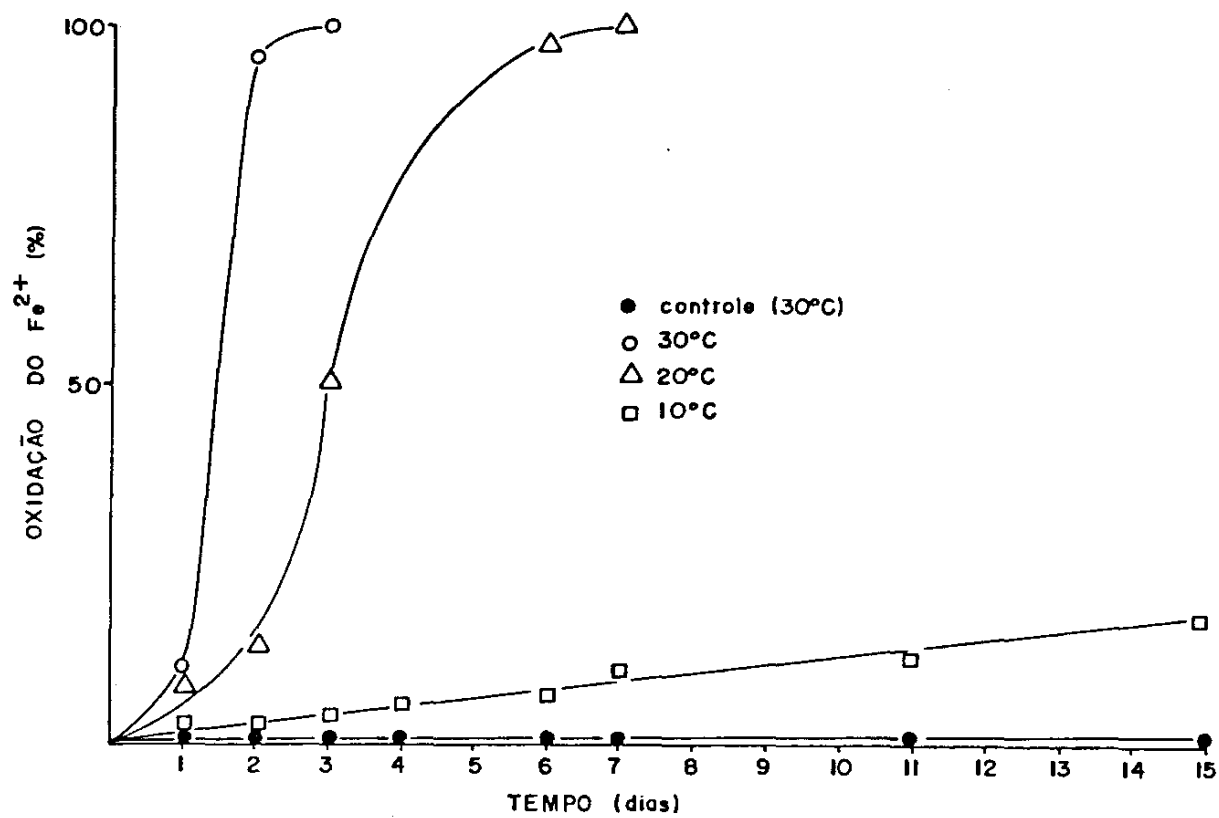


FIGURA 27 - Efeito da temperatura no crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG460.

isolado Tf-FG460 (figura 27) esse percentual não excedeu 20% após 15 dias de cultivo; somente após cerca de 30 dias atingiu-se 100% de oxidação do Fe^{2+} (resultado não mostrado), já evidenciando alguma diferença fisiológica entre esses dois isolados.

Ainda nas mesmas figuras, observa-se que a 20°C a taxa de oxidação do íon ferroso já é significativamente reduzida em relação a 30°C . Foram necessários cerca de 6 dias de cultivo dos dois isolados, para oxidação total de todo o Fe^{2+} presente no meio de cultura. Em paralelo aos frascos inoculados, realizou-se também um controle a 30°C (não inoculado), para evidenciar que a oxidação puramente química, é inexistente nessas condições.

Diversos autores tem demonstrado que a temperatura ótima de crescimento da espécie *T. ferrooxidans* é ao redor de 30°C . SILVERMAN & LUNDGREN (1959a) mostraram que a 37°C não ocorre crescimento da espécie e que o ótimo foi a 28°C . MacDONALD & CLARK (1970) e NOIKE *et alii* (1983), também obtiveram em vários isolados de *T. ferrooxidans* a mesma temperatura ótima de crescimento. Um fato interessante que deve ser destacado nesse trabalho de SILVERMAN & LUNDGREN (1959a), é que foi encontrada a melhor taxa de oxidação do Fe^{2+} a 37°C , porém em suspensões celulares lavadas e na ausência de crescimento (estudos respirométricos). Esse fato indica que a espécie oxida o íon ferroso, desacoplada da fixação do CO_2 atmosférico.

Na parte introdutória deste trabalho, foi destacada a característica aeróbia estrita da espécie. Dessa forma, a disponibilidade de O_2 como acceptor final de elétrons da cadeia respiratória, é crucial para o processo oxidativo e conseqüentemente para o crescimento da bactéria. GUAY & SILVER (1977) demonstraram claramente o efeito da agitação nas taxas oxidativas do Fe^{2+} pelo *T. ferrooxidans*. Em função dessa característica, era de esperar uma influência deci-

siva do cultivo sob agitação, para um ótimo crescimento celular. As figuras 28 e 29, mostram claramente o efeito da agitação nos isolados Tf-PCE e Tf-FG460, respectivamente.

Enquanto que sob agitação a 30°C o tempo máximo de oxidação completa do Fe^{2+} foi de 2 dias em ambos os isolados, em condições estáticas essa oxidação total demorou 17 dias no isolado Tf-PCE (figura 28) e 11 dias no isolado Tf-FG460 (figura 29). Novamente foi detectada outra diferença fisiológica entre os dois isolados.

V.2.3. Crescimento de *T. ferrooxidans*

Conforme salientado anteriormente, o interesse maior do trabalho foi sobre a espécie *T. ferrooxidans* pelos motivos já discutidos. Dessa forma, realizou-se alguns estudos fisiológicos básicos apenas com os isolados dessa espécie, objetivando-se obter informações que permitissem um melhor conhecimento das condições de crescimento da mesma e uma verificação de possíveis diferenças de cultivo (algumas já apresentadas no item anterior) entre alguns isolados representativos de cada amostra utilizada para o isolamento da espécie,

Foi feito um estudo do crescimento do *T. ferrooxidans* utilizando-se 4 isolados provenientes das seguintes amostras: minério uranífero de Poços de Caldas - MG (Tf-PCE); efluente ácido da mina uranífera de Figueira - PR (Tf-FG460); efluente ácido de mina de carvão de Siderópolis - SC (Tf-SSP); efluente ácido de lixiviação de minério uranífero de Lagoa Real - BA (Tf-LR). Para esse tipo de ensaio utilizou-se o meio "TK", o qual como já foi visto, não apresen

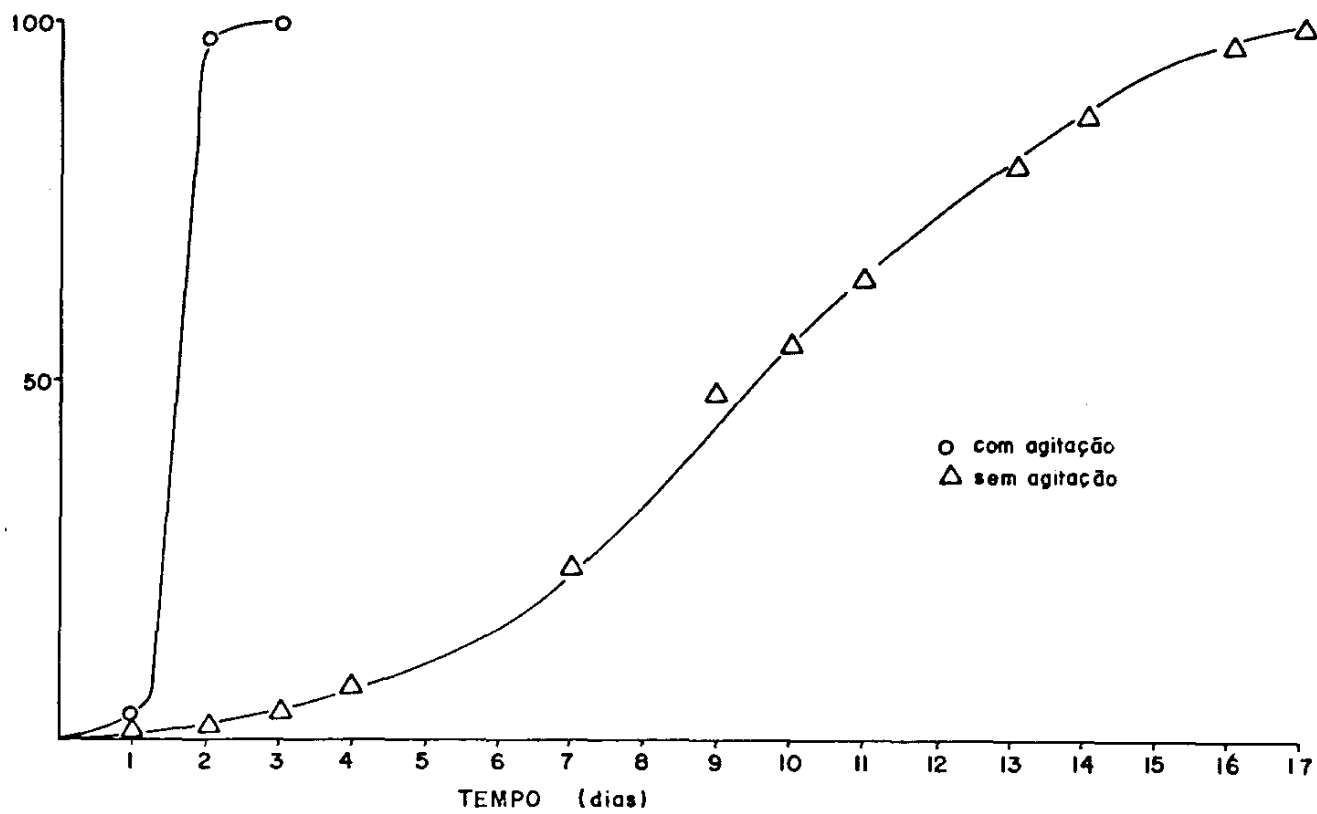


FIGURA 28 - Efeito da agitação no crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE.

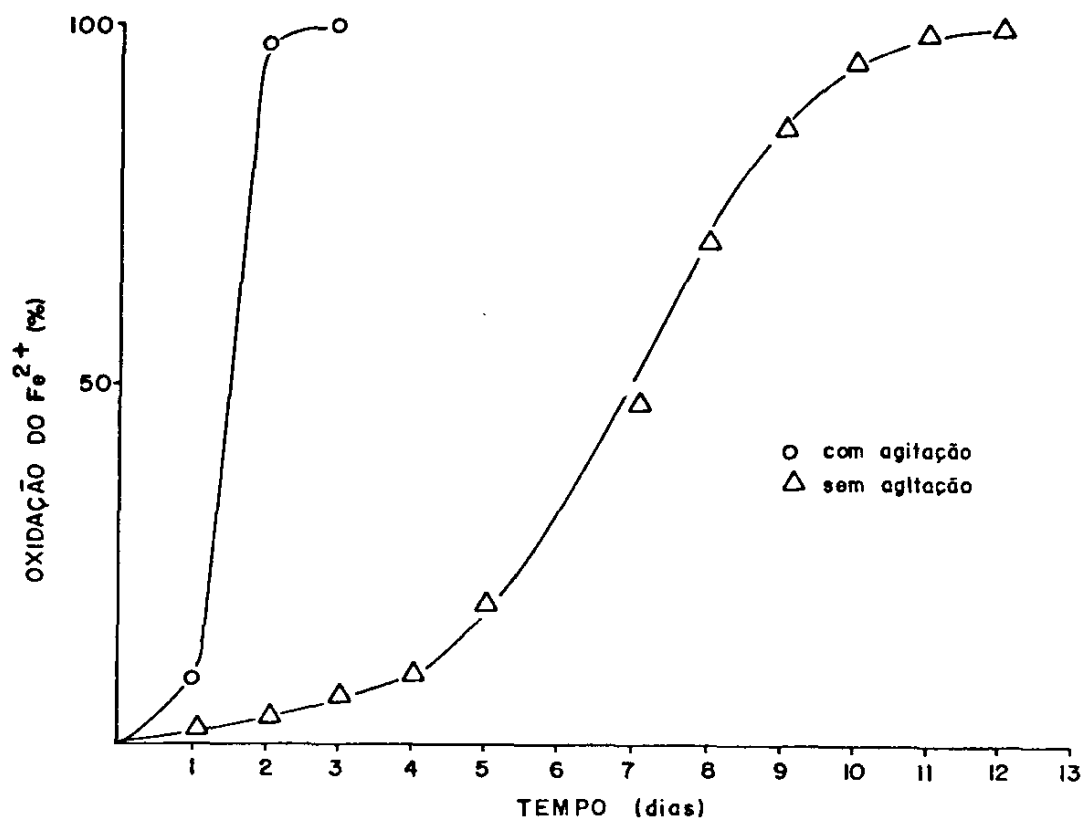


FIGURA 29 - Efeito da agitação no crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG460.

ta problemas de formação de precipitados devido ao seu pH permanecer inferior à 1,8, durante o cultivo bacteriano. Essa característica é fundamental para a determinação da turbidez como um parâmetro de crescimento celular. Além disso, realizou-se os ensaios à 30°C e sob agitação constante, pois conforme demonstrado no item anterior, essa são as melhores condições de cultivo do *T. ferrooxidans*.

As figuras 30, 31, 32 e 33 demonstram a similaridade do comportamento dos quatro isolados. Pode ser observado que independente do isolado, os critérios utilizados para avaliar o crescimento das culturas, isto é, porcentagem de oxidação do Fe^{2+} , absorvância e o número de células, estão extremamente análogos. Entretanto deve-se destacar como um fato interessante, a rápida queda da viabilidade de todos os isolados. Após ser atingido o máximo de crescimento celular em torno de 60 horas de cultivo, ocorre uma significativa diminuição das unidades formadoras de colônias; em geral, detectou-se após 72 horas de ensaio, a metade de células viáveis em relação aos valores obtidos após 60 horas. Dessa forma, a fase estacionária de crescimento dessa espécie é praticamente inexistente, fato esse não muito comum no estudo bacteriano.

Essa queda rápida de viabilidade pode ser conseqüência do próprio acúmulo de Fe^{3+} , o qual começa ser tóxico à bactéria em determinadas concentrações, sobretudo na ausência do Fe^{2+} ou outra fonte de energia (KELLY & JONES, 1978; JONES & KELLY, 1983). Essa constatação mostra ainda, que essa espécie não dispõe de sistema de reserva de substâncias, que poderiam ser usadas como fonte energética na ausência do íon Fe^{2+} . Ao se esgotar essa fonte, a cultura entra imediatamente em fase de decaimento. Assim é importante que logo após a oxidação total do Fe^{2+} , as culturas sejam retiradas da agitação e conservadas em geladeira.

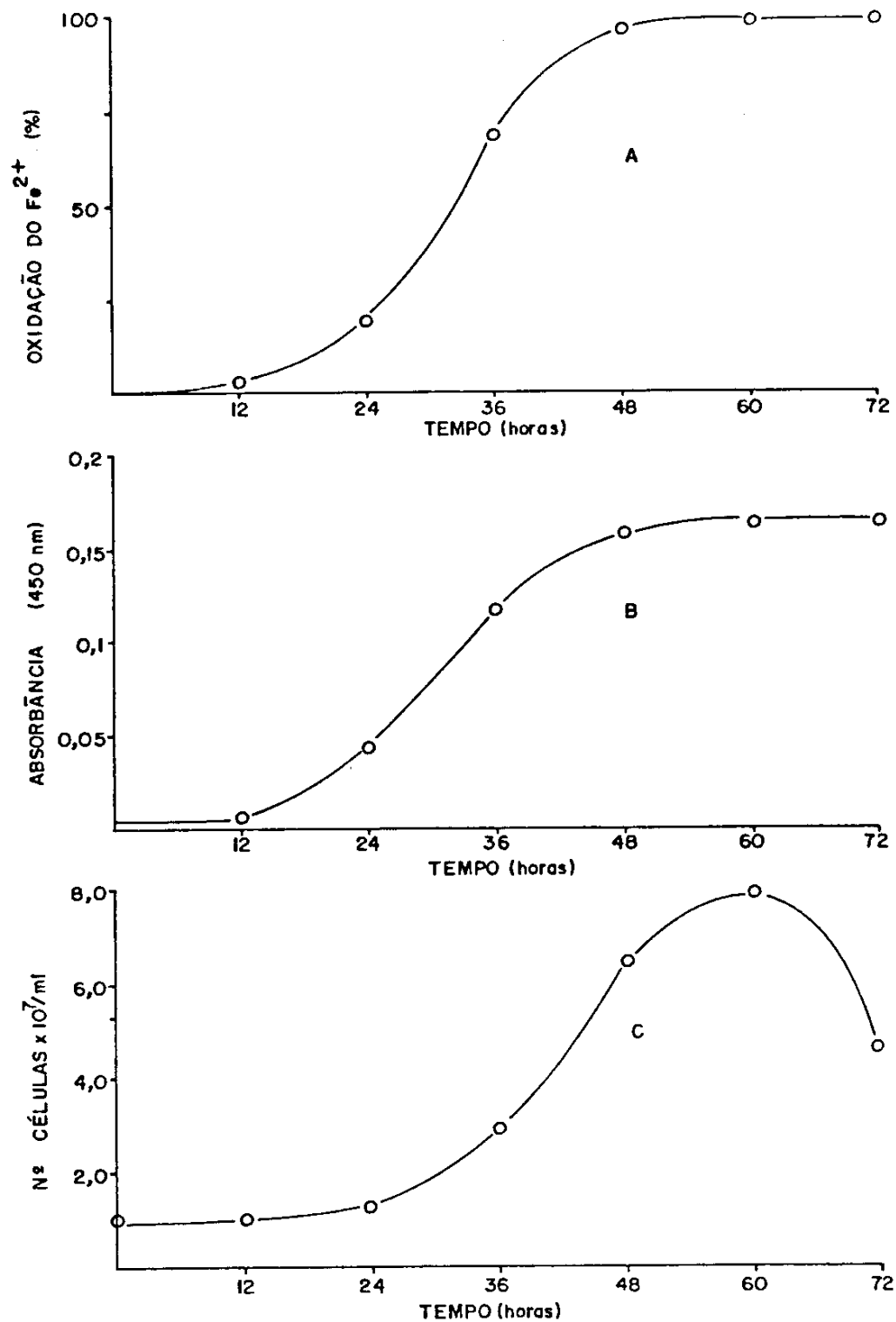


FIGURA 30 - Curvas de crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE, segundo a oxidação do Fe²⁺ (A), a absorvância da cultura (B) e o número de células (C).

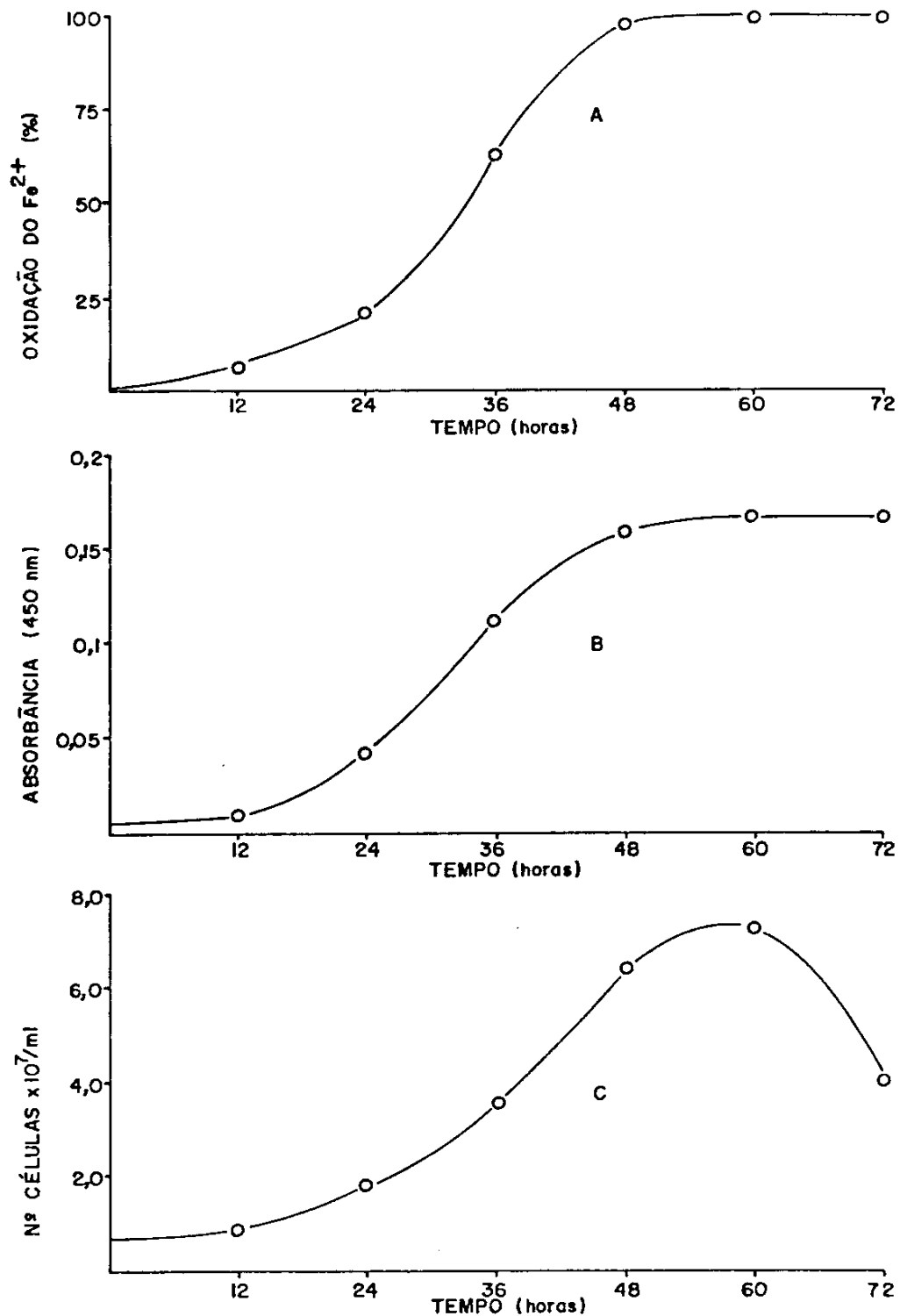


FIGURA 31 - Curvas de crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG460, segundo a oxidação do Fe²⁺ (A), a absorvância da cultura (B) e o número de células (C).

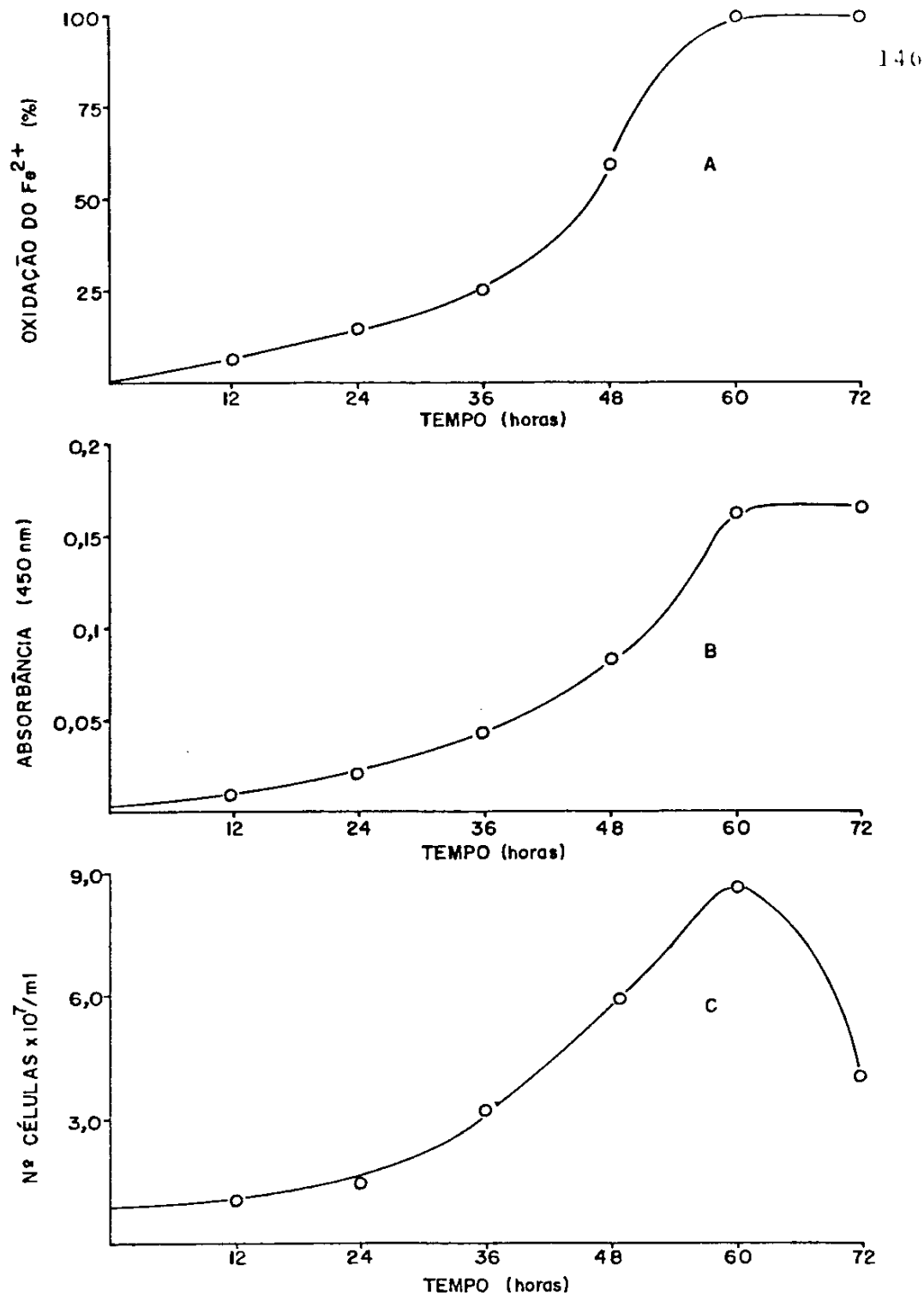


FIGURA 32 - Curvas de crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-SSP, segundo a oxidação do Fe^{2+} (A), a absorbância da cultura (B) e o número de células (C).

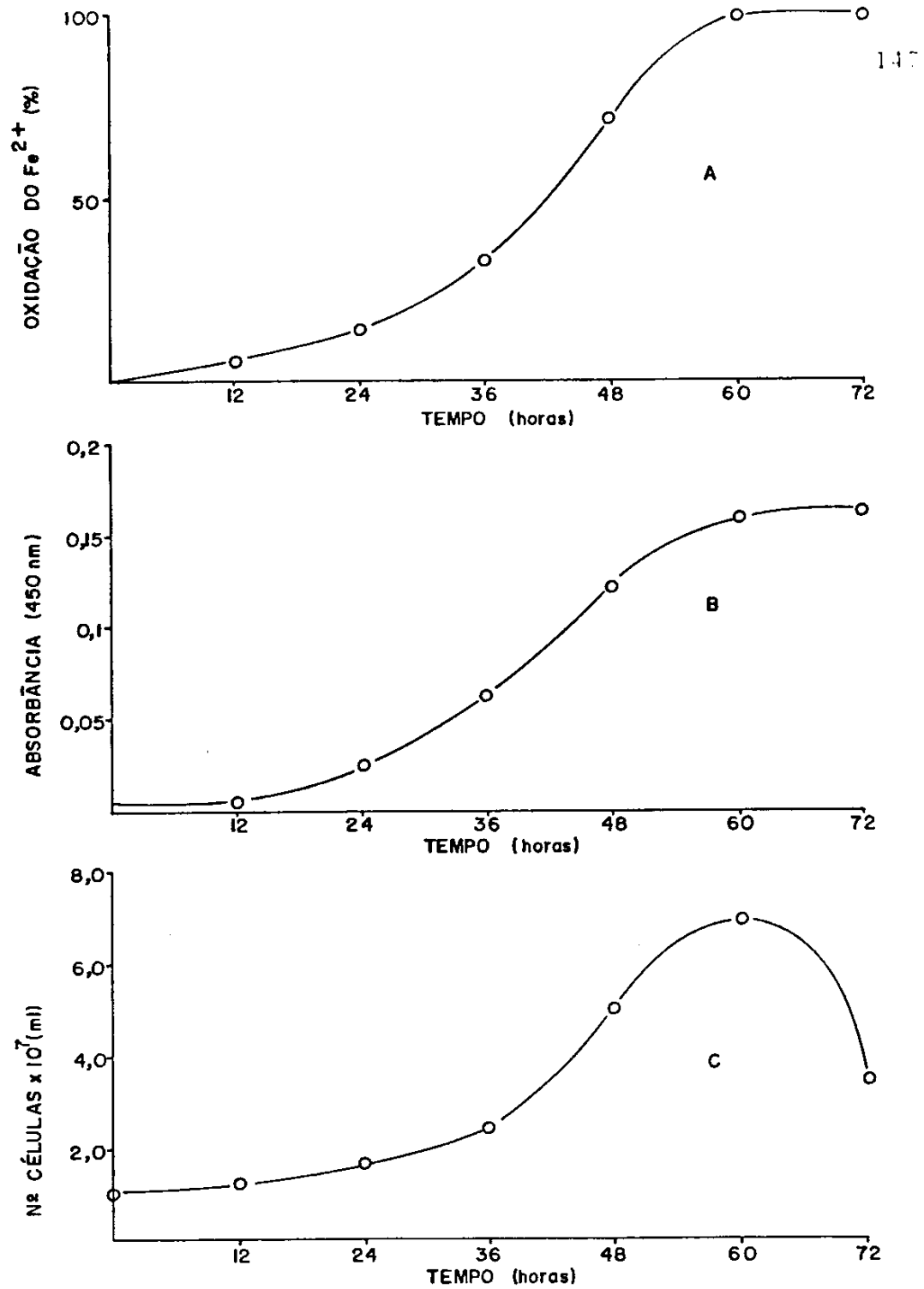


FIGURA 53 - Curvas de crescimento de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-LR, segundo a oxidação do Fe^{2+} (A), a absorbância da cultura (B) e o número de células (C).

Independente desse aspecto, essa analogia entre curvas de avaliação de crescimento, comprova que o critério "oxidação do Fe^{2+} " é suficiente para acompanhar o crescimento da espécie, conforme também demonstraram HOFFMAN & HENDRIX (1976), pois como já foi mencionado, a contagem de colônias em meio sólido é problemática devido à necessidade do uso de agarose ou outro agente solidificante sem contaminantes orgânicos (TUOVINEN & KELLY, 1973).

Outra observação que pode ser feita ainda pelas figuras 30, 31, 32 e 33, é a uniformidade de respostas dos quatro isolados de *T. ferrooxidans*. Aparentemente poucas diferenças podem ser notadas simplesmente pelos gráficos. A título de se obter informações que possibilitem estabelecer algumas diferenças fisiológicas entre os isolados, foram calculados para cada um as taxas de oxidação (Vox) e o tempo de geração (G) das culturas, utilizando-se as partes lineares de cada curva de crescimento.

Pela tabela 12 pode-se observar algumas diferenças fisiológicas entre os isolados estudados. Enquanto o isolado Tf-PCE apresentou a maior velocidade de oxidação do íon Fe^{2+} ($4,2 \text{ mM } Fe^{2+} \cdot h^{-1}$) e o menor tempo de geração (8,4 horas), o isolado Tf-SSP mostrou a menor velocidade (3,7) e o maior tempo de geração (13,2). Esses valores para tempo de geração (de 8,4 a 13,2 horas) estão acima de alguns dados encontrados na literatura, sobretudo para o isolado Tf-SSP; esses dados indicam um tempo de geração de 4,5 a 8,0 horas (SHAFIA & WILKINSON, 1969; TUOVINEN & KELLY, 1973; MANDL, 1984). Entretanto, deve-se destacar que inúmeros fatores durante o cultivo da bactéria, podem influenciar o seu crescimento, a começar do próprio meio sólido (tipo de agarose, por exemplo) utilizado para a contagem de células. TUOVINEN & KELLY (1973) obtiveram cerca de 3×10^8 células $\times \text{ ml}^{-1}$ após 48 horas de cultivo, enquanto que neste trabalho,

TABELA 12 - Velocidade de oxidação do íon Fe^{2+} (Vox) e tempo de geração (G) dos isolados Tf-PCE, Tf-FG460, Tf-SSP e Tf-LR.

ISOLADO	Vox ¹ ($\text{mMFe}^{2+} \cdot \text{h}^{-1}$)	G ² (horas)
Tf-PCE	4,2	8,4
Tf-FG460	3,9	10,4
Tf-SSP	3,7	13,2
Tf-LR	3,9	10,2

1. Vox = velocidade de oxidação do Fe^{2+}

2. G = tempo de duplicação da população bacteriana.

o número máximo de células viáveis obtido foi de aproximadamente 9×10^7 (Tf-SSP). Por outro lado, esses dados concordam com aqueles publicados por MISHRA *et alii* (1983), que obtiveram de $0,8-1,0 \times 10^8$ células $\times \text{ml}^{-1}$.

Em relação à utilização do íon Fe^{2+} , obteve-se 100% de oxidação após 48 horas de cultivo (figuras 30 e 31), para os isolados TfPCE e Tf-FG460 e 60 horas (figuras 32 e 33), para os isolados Tf-SSP e Tf-LR. As taxas de oxidação obtidas variaram de 3,7 a 4,2 $\text{mM Fe}^{2+} \cdot \text{h}^{-1}$, que expressas com $\text{mg} \cdot \ell^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ situam-se entre 206,5 e 234,4. Em um trabalho de avaliação tanto de linhagens obtidas em diferentes minas, bem como com mutantes obtidos a partir dessas linhagens selvagens, GROUDEV & GENCHEV (1978), obtiveram valores que variaram de 182 a 275 $\text{ml} \cdot \ell^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Dessa forma, pode-se dizer que os resultados obtidos neste estudo, estão dentro de uma faixa esperada; apesar de não ocorrer uma variação tão significativa como a obtida por esses autores, essas diferenças indicam com uma certa consistência, que efetivamente os isolados são fisiologicamente diferentes.

V.2.4. Efeito do urânio no crescimento de *T. ferrooxidans*

T. ferrooxidans apresenta uma elevada resistência a metais conforme já discutido (LUNDGREN & SILVER, 1980; HUTCHINS *et alii*, 1986). Memo assim, o melhoramento genético da espécie para essa característica é importante, pois em futuros processos mais controlados (biorreatores), tal característica poderá determinar desejadas otimizações. Assim, objetivou-se nesse estudo, bem como nos de respirometria, avaliar uma variabilidade natural entre os isolados, para se selecionar aqueles potencialmente mais resistentes, como passo inicial de um programa de melhoramento genético.

Inicialmente utilizou-se todos os isolados de *T. ferrooxidans* obtidos, os quais foram submetidos à concentrações crescentes de urânio: 2, 4, 6 e 8 mM. Conforme apresentado em "Materiais e Métodos", houve necessidade de se diminuir a concentração de PO_4^{2-} do meio de cultura "9K" (de 0,5 para 0,1 g/l) além de um abaixamento do pH inicial de 2,8 para 2,0, para evitar precipitação do urânio no meio, fato inevitável no meio original. Para se certificar que essas pequenas modificações não interfeririam no crescimento normal das culturas, realizou-se em paralelo testes controles sem adição do urânio.

Pela tabela 13, pode-se notar inicialmente que, de fato, essas modificações no meio de cultura não interferiram significativamente no crescimento dos isolados, pois 2 a 3 dias após o início, todas as culturas oxidaram totalmente o Fe^{2+} presente.

Dentre todos os isolados, aquele que apresentou a maior resistência foi o Tf-LR, pois mesmo na presença de 8 mM de urânio, ocorreu oxidação total do Fe^{2+} em 24 dias de cultivo. Nenhum outro isolado, mesmo após 30 dias de cultivo (período do ensaio), conseguiu utilizar o Fe^{2+} nessa condição. Rigorosamente, pode-se dizer, ainda observando-se a tabela 13, que a concentração de 4 mM (cerca de 1 g/l) já diferencia esse isolado Tf-LR dos demais, pois enquanto este oxidou o Fe^{2+} em 3 dias, os outros levaram acima de 10 dias (exceto Tf-PCE e Tf-PC01) para oxidarem totalmente a fonte energética. Na presença de 6 mM, além do Tf-LR (8 dias para oxidação completa), somente outros três isolados conseguiram metabolizar o Fe^{2+} : Tf-PCE, Tf-PCP01 e Tf-FG02.

Aparentemente não existe uma correlação entre a resposta ao urânio e isolados da mesma procedência. Por exemplo, os isolados Tf-MC01 e Tf-MCPI mostraram-se mais resistentes (ver concentração de

TABELA 13 - Efeito¹ de diferentes concentrações de Urânio, no crescimento dos 13 isolados de *T. ferrooxidans*.

ISOLADO DE <i>T. ferrooxidans</i>	CONCENTRAÇÃO DE URÂNIO (mM)				
	0	2	4	6	8
Tf-PCE	2	3	7	22	N.O ²
Tf-PCP01	2	3	9	22	N.O
Tf-001E	3	3	14	N.O	N.O
Tf-FGO2	2	3	10	21	N.O
Tf-FG460	2	10	16	N.O	N.O
Tf-ELC	3	9	19	N.O	N.O
Tf-MC01	2	3	17	N.O	N.O
Tf-MCPI	2	3	16	N.O	N.O
Tf-MC04	3	14	21	N.O	N.O
Tf-MC115	2	14	20	N.O	N.O
Tf-SSP	2	3	10	N.O	N.O
Tf-SLP	2	3	10	N.O	N.O
Tf-LR	2	2	3	8	24

1. Tempo (dias) para oxidação total do Fe²⁺ (9 g/l) presente no meio de cultura.

2. Não oxidou em até 30 dias de cultivo.

2 mM) que os isolados Tf-MC04 e Tf-MC115; esses quatro isolados são oriundos da mesma mina de carvão, porém de pontos diferentes, conforme a tabela 9 (mostrada anteriormente). Por outro lado, aparentemente existe uma correlação entre a característica da amostra quanto ao seu teor de urânio e o respectivo isolado de *T. ferrooxidans*, como era naturalmente de se esperar. Assim, Tf-LR foi obtido de um licor que apresentava cerca de 3 g/l em urânio; os isolados Tf-PCE, Tf-PCP01 e Tf-FG02, também foram obtidos de amostras contendo urânio.

Aproveitando essas informações, selecionou-se 4 isolados para se estudar as cinéticas de crescimento na presença desse metal. Pode ser visto pela tabela 14 que cada tipo de isolado é proveniente de amostras contendo diferentes concentrações de urânio desde a virtual ausência (Tf-SSP) até cerca de 3500 ppm (Tf-LR).

Os resultados obtidos podem ser vistos nas figuras 34, 35, 36 e 37. Pela figura 34, observa-se que o isolado Tf-LR praticamente manteve sua cinética normal de oxidação do Fe^{2+} , na presença de 2 mM de urânio. Os isolados Tf-PCE e Tf-SSP apresentaram uma ligeira queda nas suas taxas oxidativas e o Tf-FG-460 foi o isolado que mostrou uma sensibilidade marcante a 2 mM de urânio.

A figura 35, mostra o efeito de 4 mM de urânio no crescimento dos referidos isolados. Essa concentração já diferencia claramente a resistência ao urânio entre esses isolados. Novamente o Tf-LR mostrou resistência quase total à essa concentração, pois sua fase exponencial de crescimento não foi alterada; a oxidação total do Fe^{2+} presente completou-se em 3 dias. Os demais isolados (Tf-PCE, Tf-SSP e Tf-FG460), mostraram uma sensibilidade, nessa mesma ordem de aumento, tanto na fase lag de crescimento como também, e principalmente, em suas fases logarítmicas. ROY & MISHRA (1981a), traba

TABELA 14 - Isolados de *T. ferrooxidans* e suas respectivas procedências, utilizados no experimento de efeito do urânio no crescimento destes isolados.

ISOLADO DE <i>T. ferrooxidans</i>	PROCEDÊNCIA	CONCENTRAÇÃO DO URÂNIO DA AMOSTRA (ppm)
Tf-PCE	Minério uranífero de baixo teor de Poços de Caldas-MG	~400
Tf-FG460	Efluente de pátio de estocagem de minério uranífero de Figueira-PR.	~200
Tf-SSP	Efluente de mina de carvão de Siderópolis-SC	ND
TF-LR	Efluente de coluna de <u>lixiviação</u> estática de minério uranífero de Lagoa Real-BA.	3500

ND: Não detectado

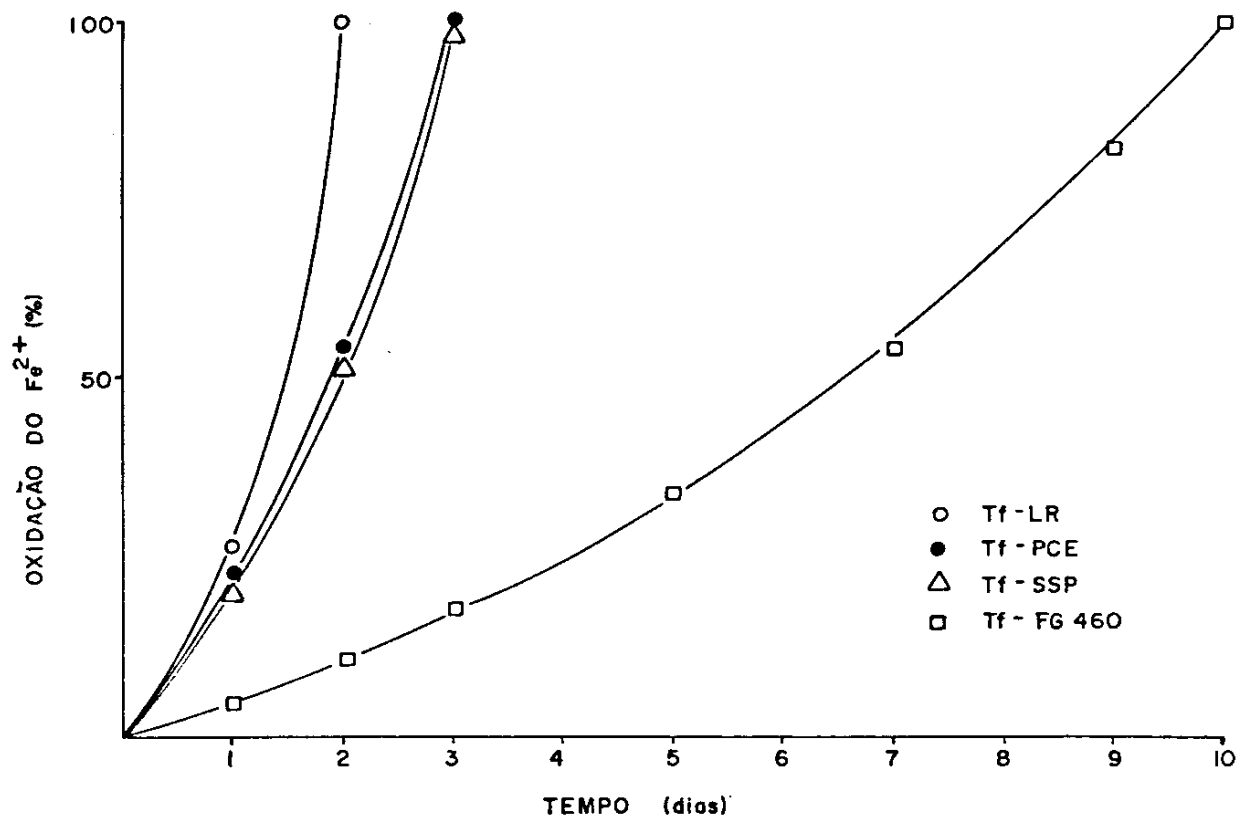


FIGURA 34 - Efeito do urânio (2mM) no crescimento de 4 isolados de *T. ferrooxidans*.

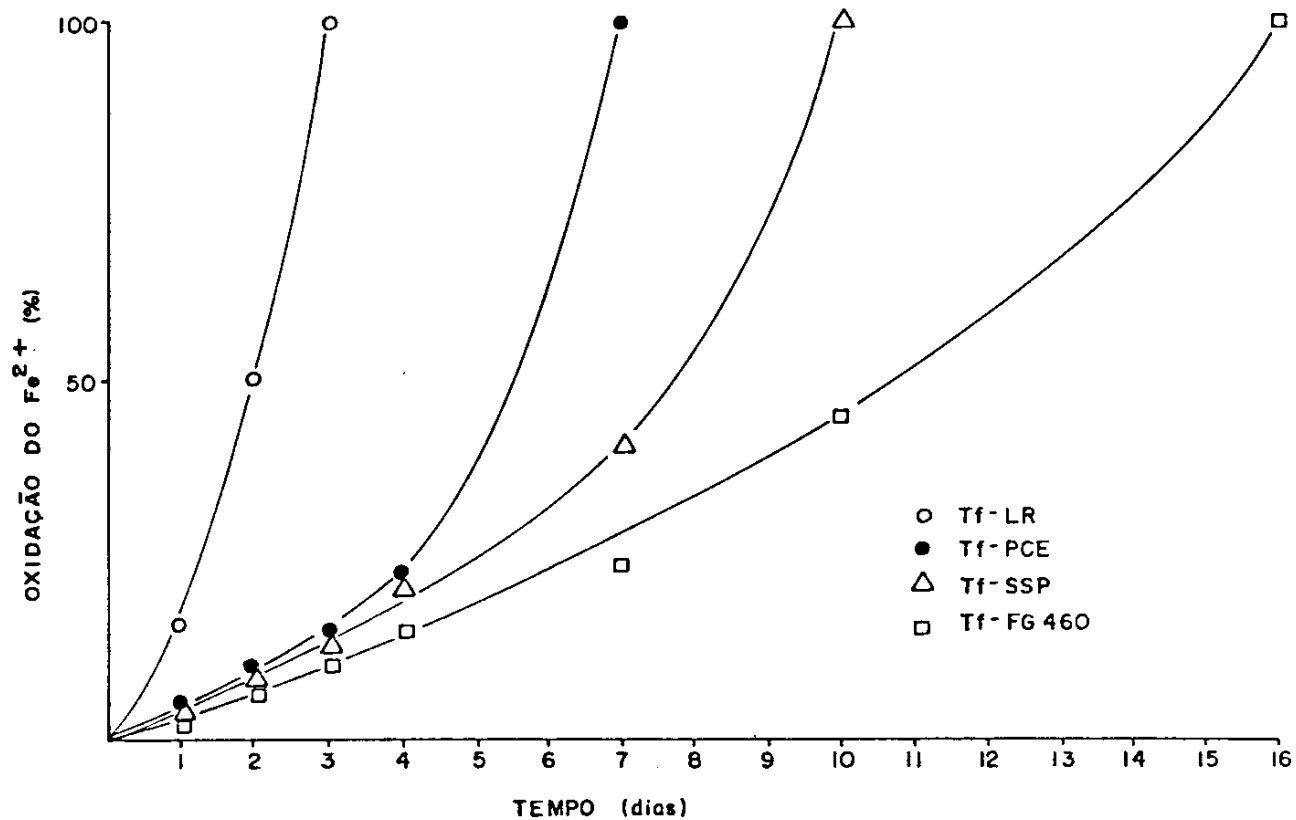


FIGURA 35 - Efeito do urânio (4mM) no crescimento de 4 isolados de *T. ferrooxidans*.

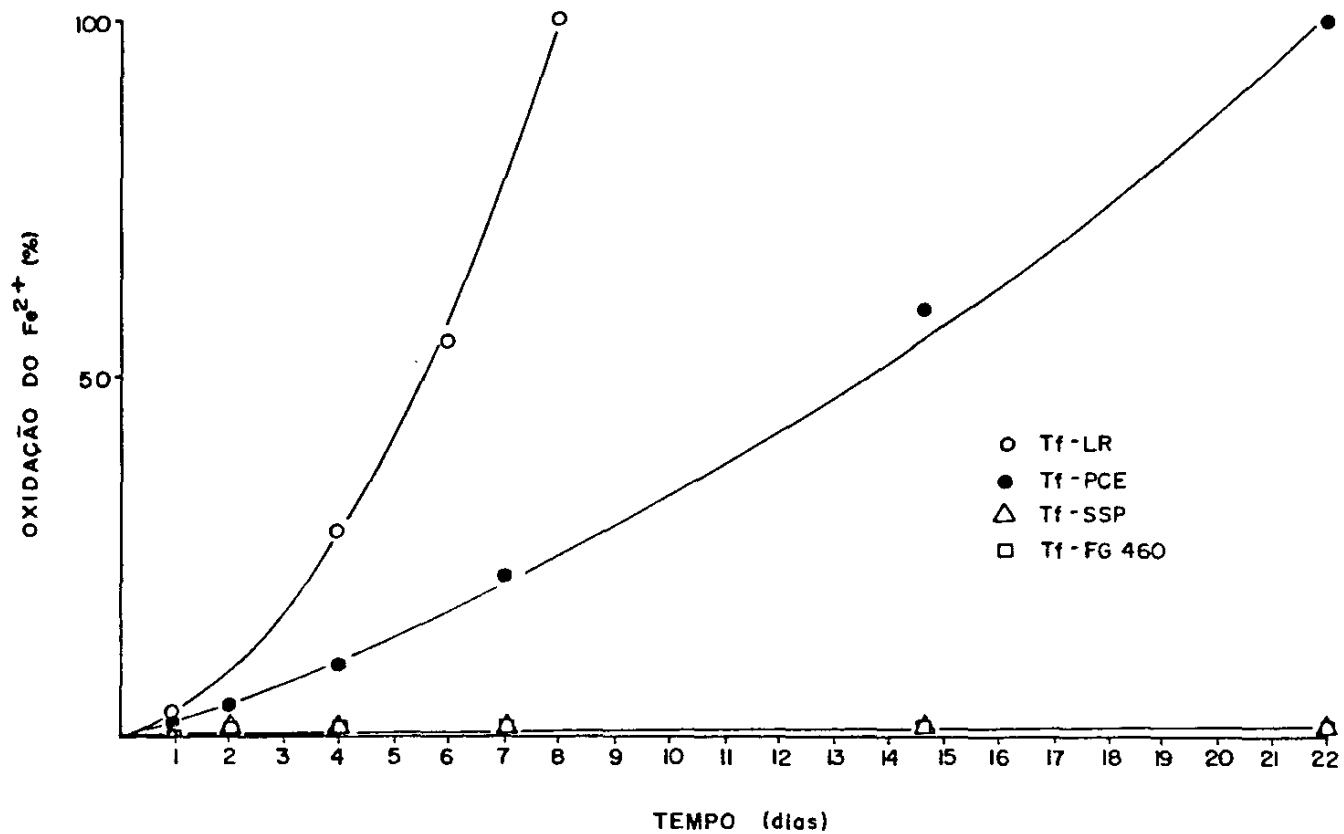


FIGURA 36 - Efeito do urânio (6mM) no crescimento de 4 isolados de *T. ferrooxidans*.

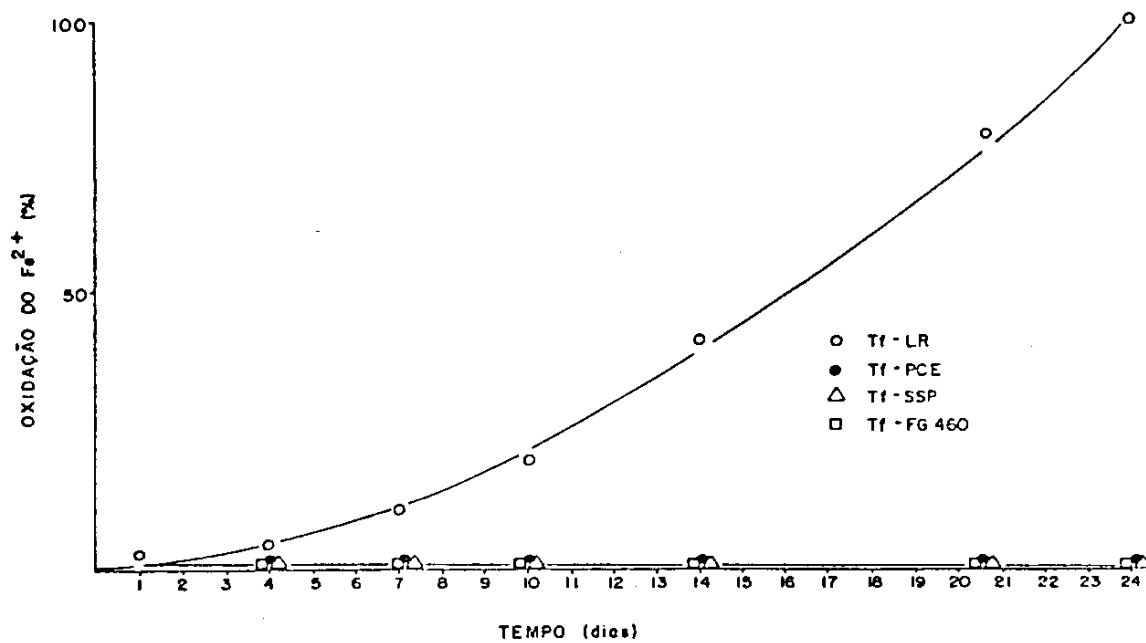


FIGURA 37 - Efeito do urânio (8mM) no crescimento de 4 isolados de *T. ferrooxidans*.

lhando com uma linhagem de *T. ferrooxidans*, encontraram resultado semelhante, porém para uma concentração de urânio bem menor (~ 1 mM).

Pela figura 36, percebe-se que o isolado Tf-LR começa a ser inibido por 6 mM de urânio. Sua taxa oxidativa do Fe^{2+} (fase exponencial) diminuiu, determinando um período de 7 dias para oxidação completa da fonte de energia. Dos outros isolados, somente Tf-PCE ainda apresentou crescimento; este no entanto, foi extremamente lento, tornando-se praticamente linear. Somente após 22 dias, todo o Fe^{2+} foi oxidado. Para os outros isolados (Tf-SSP e Tf-FG460) nenhum crescimento foi detectado.

Na presença de 8 mM de urânio (figura 37), somente o isolado Tf-LR, mostrou crescimento. Mesmo assim pode-se observar que este foi severamente prejudicado pela presença do metal, pois somente após 24 dias de cultivo, é que ocorreu a oxidação completa do íon ferroso.

TUOVINEN & KELLY (1973b) demonstraram que 5 mM de urânio adicionado a uma cultura em crescimento, causou imediata paralisação da oxidação do Fe^{2+} e da fixação de $^{14}\text{CO}_2$, evidenciando dessa forma que o mecanismo de oxidação do Fe^{2+} está acoplado ao crescimento da espécie. Ocorre uma rápida perda da viabilidade celular, causada por uma aparente plasmólise das células, como mostrado por fotomicrografias eletrônicas. O urânio apareceu nessas preparações, ligados à constituintes celulares, sobretudo a nível de membrana, onde estão alojadas as enzimas respiratórias da espécie (TUOVINEN & KELLY, 1974a,b).

Nos resultados apresentados (tabela 13), ficou evidente uma razoável variabilidade entre os isolados, em relação à resistência ao urânio. Da mesma forma que notou-se uma variabilidade entre isolados provenientes da mesma região, DiSPIRITO & TUOVINEN (1982) acharam níveis de resistência variando de 1 a 5 mM entre linhagens iso-

ladas de amostras de uma mesma mina de urânio do Canadá (Agnew Lake Uranium Mine). Foi mostrado ainda nesse trabalho, que essa resistência é muito mais acentuada em pHs mais elevados. Assim, uma mesma linhagem que foi resistente à 5 mM de urânio à pH 2,5, não resistiu 1 mM quando cultivado à pH 1,5. Essas diferenças podem ser devidas a uma possível complexação do urânio em pHs mais elevados, tornando-o inócuo ao microorganismo. Conforme demonstrado por TUOVINEN & KELLY (1974a) cátions bivalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+}) e EDTA reduzem acentuadamente a toxicidade do urânio.

Apesar de não estar definitivamente comprovado que a resistência ao urânio é de natureza plasmidial, MARTIN *et alii* (1983) mostraram correlação entre a presença de 1 plasmídio de 13 megadaltons em uma linhagem resistente ao urânio, o que não foi detectado em linhagens sensíveis.

Destaca-se finalmente, que muito mais que nos outros ensaios já discutidos, a presença de um metal tóxico (no caso o urânio) permitiu verificar diferenças significativas no comportamento dos isolados de *T. ferrooxidans*.

V.3. ALGUNS ESTUDOS RESPIROMÉTRICOS EM *T. ferrooxidans*

A energia decorrente da oxidação do Fe^{2+} por *T. ferrooxidans* é utilizada na fixação do CO_2 atmosférico para o crescimento da bactéria. Nesse processo, o oxigênio é consumido estequiometricamente ($4\text{Fe}^{2+} = 1\text{O}_2$, conforme equação 1), pois o mesmo é o aceptor final dos elétrons, provenientes do Fe^{2+} , conduzidos pelas enzimas respiratórias dessa espécie, conforme já discutido.

Em um sistema celular em repouso ("resting cells"), isto é, células sem crescimento, as enzimas do sistema oxidativo do *T. ferrooxidans* metabolizam normalmente o Fe^{2+} , consumindo o oxigênio, porém desacoplado da fixação do CO_2 atmosférico (KELLY & JONES, 1978).

Dessa forma o estudo de aspectos metabólicos da espécie (cinéticas oxidativas), pode ser efetuado através de técnicas respirométricas, utilizando-se por exemplo o sistema Warburg, conforme demonstrado por SILVERMAN & LUNDGREN (1959 b), ou pelo eletrodo de oxigênio de Clark (DISPIRITO & TUOIVINEN, 1982a,b). Por esses métodos, pode-se estudar de maneira rápida e eficiente (2-3 horas), fatores que interferem positiva ou negativamente na oxidação do Fe^{2+} , metabolismo fundamental da espécie *T. ferrooxidans*.

Procurou-se nesse estudo, avaliar o comportamento respirométrico dos quatro isolados utilizados nos ensaios anteriores (Tf-PCE, Tf-LR, Tf-SSP e Tf-PG460, conforme a tabela 14), em relação ao efeito da concentração do substrato, pela determinação do K_m e V_{max} , ao quociente respiratório ($Q_{\text{O}_2(N)} = \text{oxigênio consumido por miligrama de nitrogênio celular em 1 hora}$), e em relação ao efeito do pH e de metais pesados (U, Mo e Hg). O objetivo central dessa avaliação, foi o de se verificar de forma mais conclusiva em relação aos

testes de crescimento, possíveis diferenças fisiológicas entre os isolados, determinadas por uma variabilidade genética natural.

V.3.1. Efeito da concentração do substrato (Fe^{2+}).

As figuras 38-A, 39-A, 40-A e 41-A, evidenciam claramente que a atividade respiratória do *T. ferrooxidans* e, conseqüentemente, a ação oxidativa do Fe^{2+} , obedecem a cinética de Michaelis-Menten para enzimas, conforme demonstrado por DiSPIRITO & TUOVINEN (1982a,b). As mesmas figuras na parte B, mostram respectivamente os gráficos de Lineweaver-Burk dos isolados Tf-PCE, Tf-PG460, Tf-SSP e Tf-LR, obtidos por regressão linear dos pontos das curvas de Michaelis-Menten de cada isolado de *T. ferrooxidans*.

Pode ser visto pelas citadas figuras, que em geral a concentração de saturação de Fe^{2+} está situada entre 10 a 20 mM. Utilizando-se os gráficos de Lineweaver-Burk- foram calculados os valores de Km e Vmax. A tabela 15, mostra esses valores, bem como o $Q_{O_2(N)}$ dos quatro isolados utilizados nos ensaios.

Pode-se verificar que ocorreu uma diferença significativa entre os isolados, pois o Km variou de 4,88 mM para o isolado Tf-PCE, a 9,09 mM para o isolado Tf-PG460. O Vmax para esses mesmos isolados variou de 100 a 196,07 $\mu\text{l O}_2$ consumido/min.mg N total, respectivamente. O quociente respiratório ($Q_{O_2(N)}$) também revelou diferenças fisiológicas entre os isolados, uma vez que nesse parâmetro obteve-se um mínimo de 4.162,7 $\mu\text{l O}_2$ consumido/hora.mg N total para o isolado Tf-PCE e um máximo de 6.774,8 $\mu\text{l O}_2$ /h.mg N total para o isolado Tf-LR.

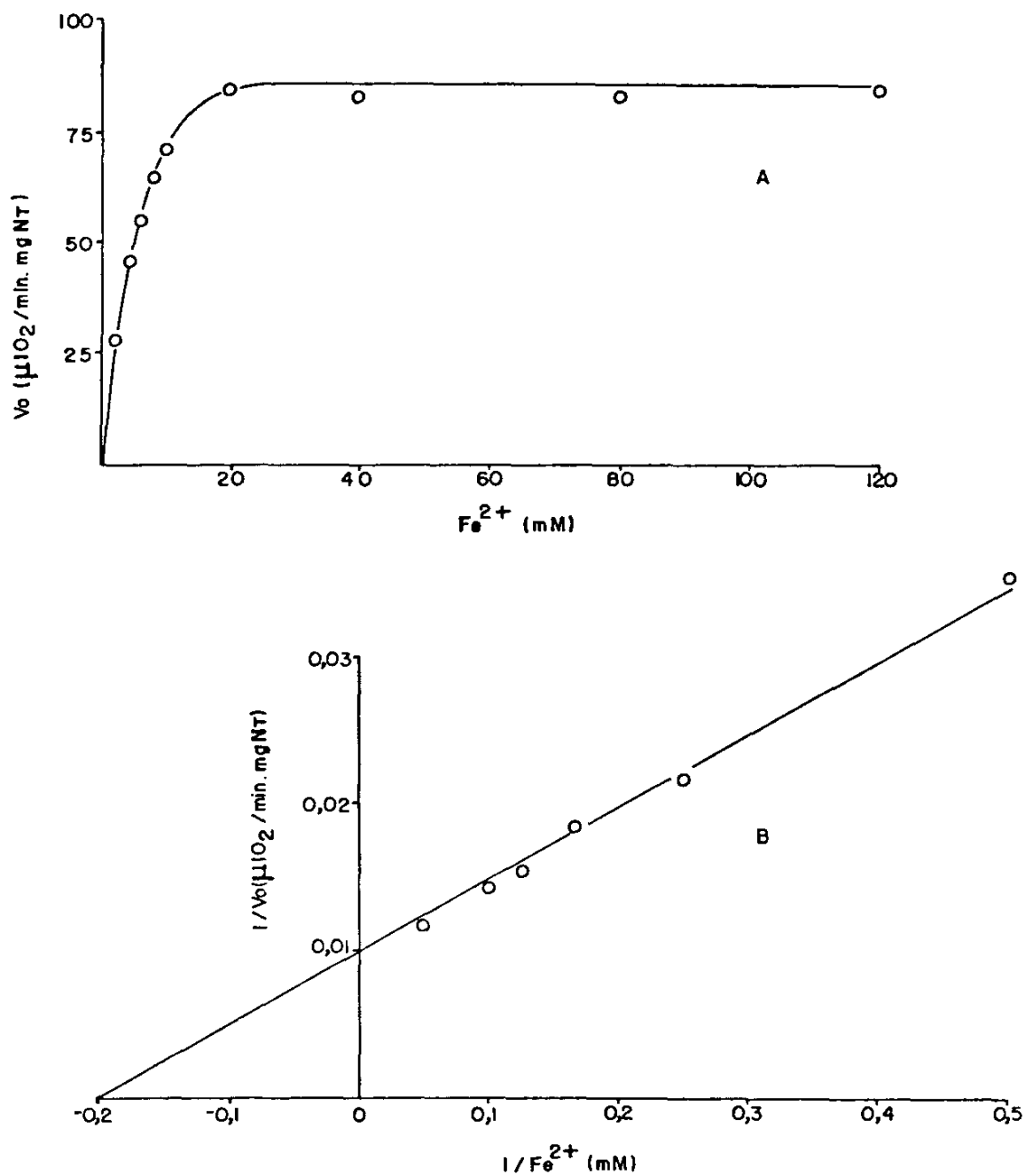


FIGURA 38 - (A) Efeito da concentração do substrato (Fe^{2+}) na velocidade de consumo de O_2 e (B) gráfico de Lineweaver-Burk a partir de (A) de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE.

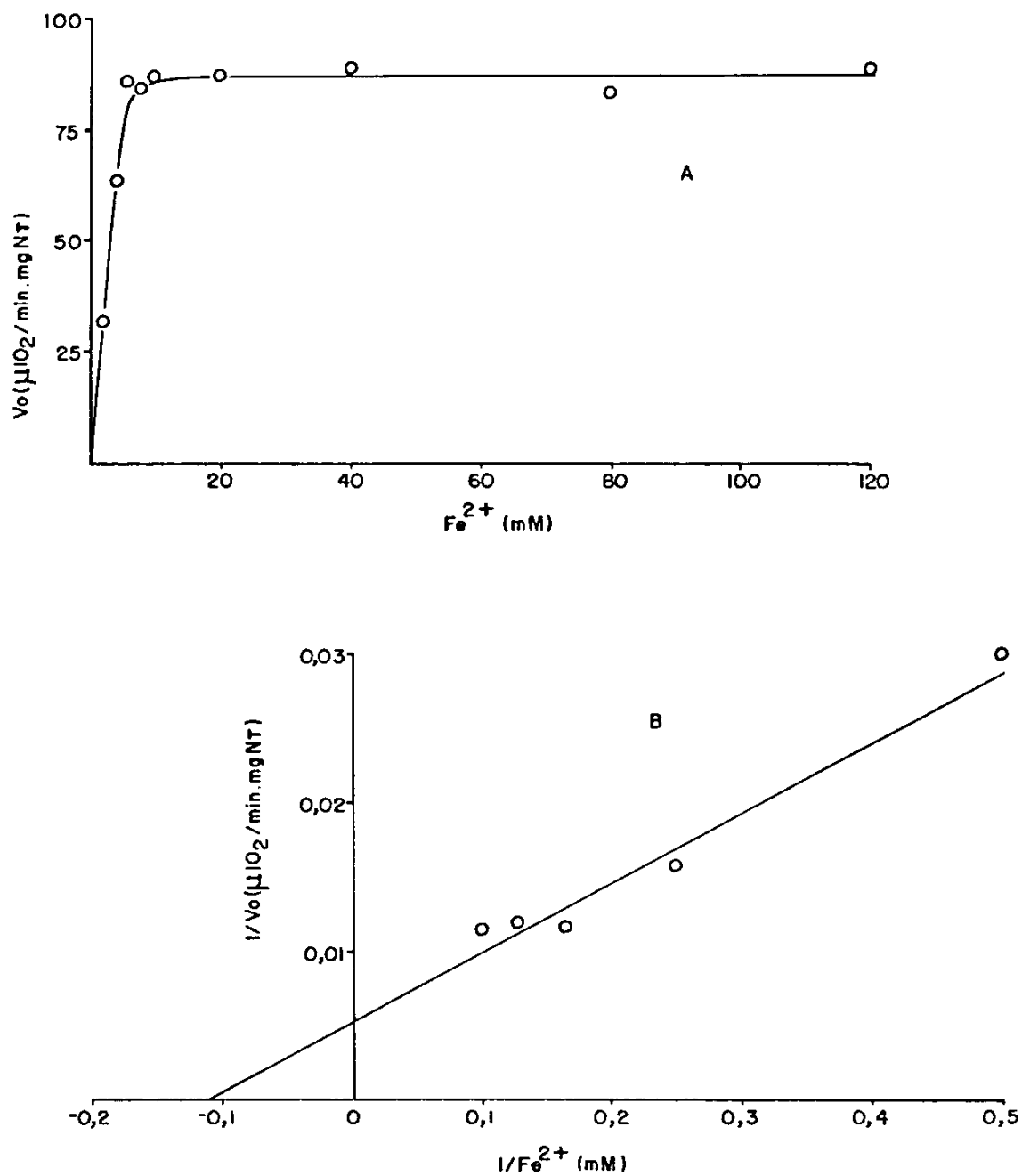


FIGURA 39 - (A) Efeito da concentração do substrato (Fe^{2+}) na velocidade de consumo de O_2 e (B) gráfico de Lineweaver-Burk a partir de (A) de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG460.

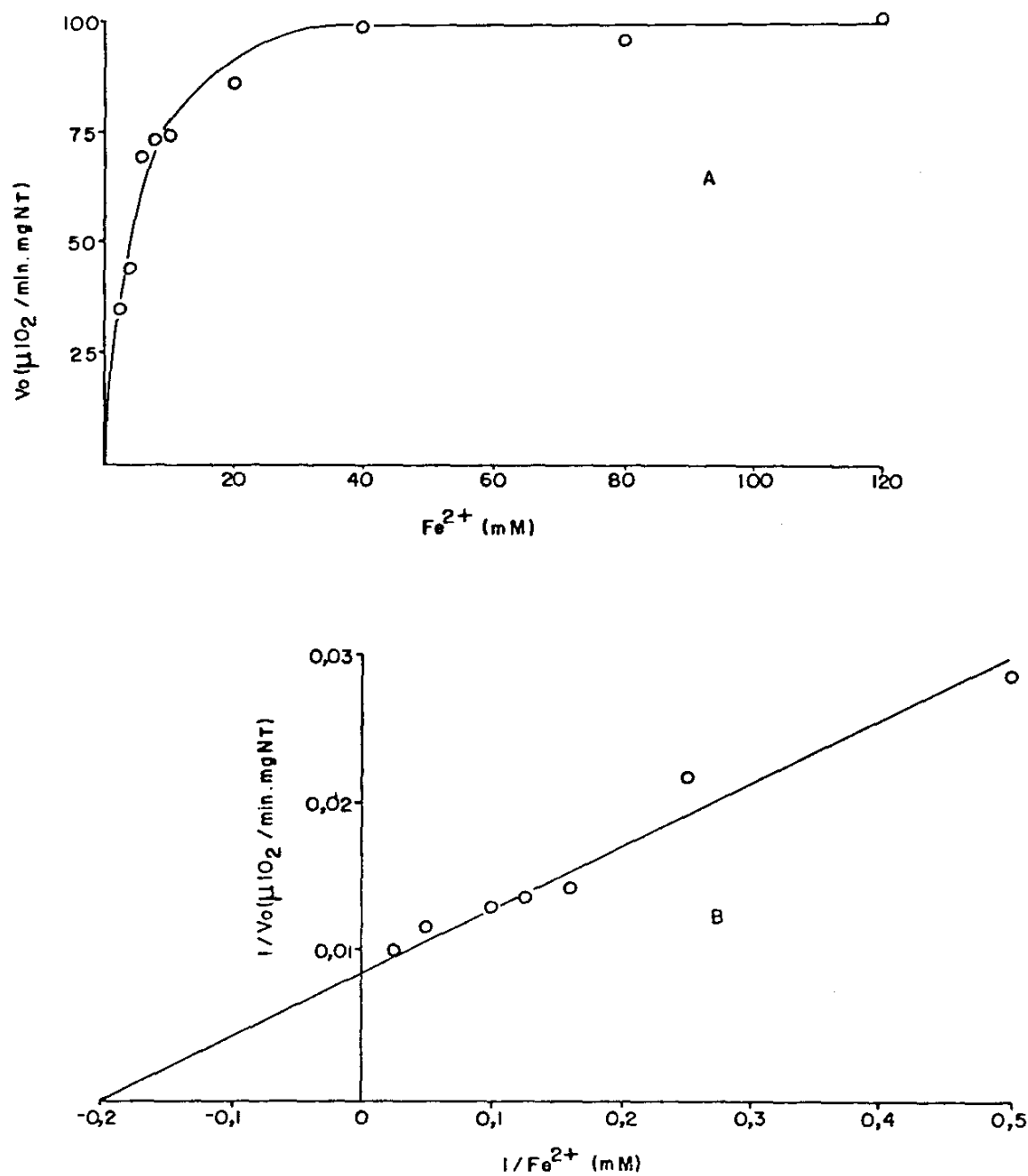


FIGURA 40 - (A) Efeito da concentração do substrato (Fe^{2+}) na velocidade de consumo de O_2 e (B) gráfico de Lineweaver-Burk à partir de (A) de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-SSP.

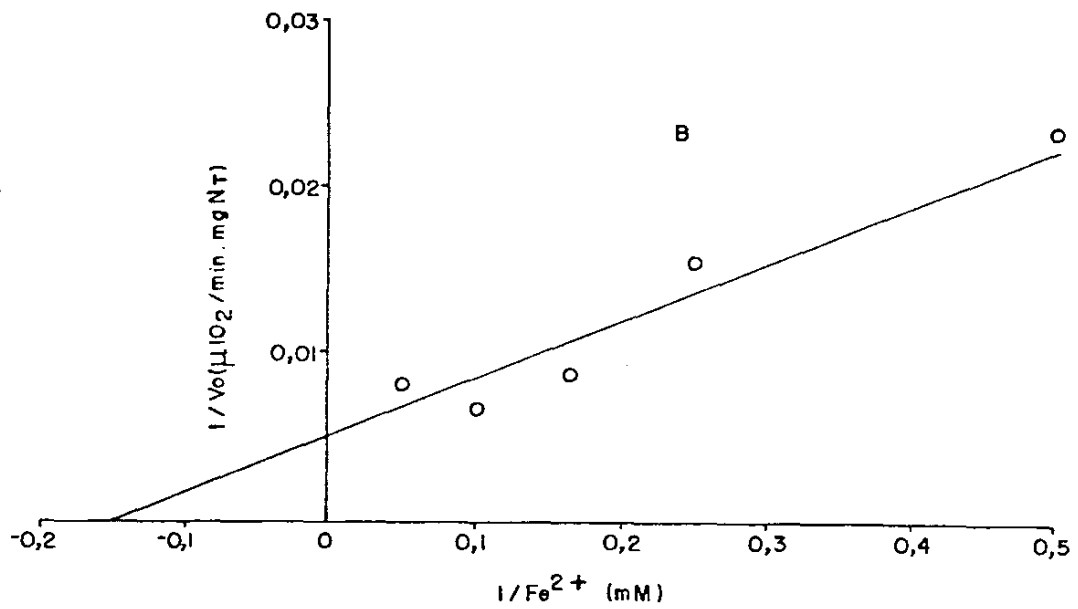
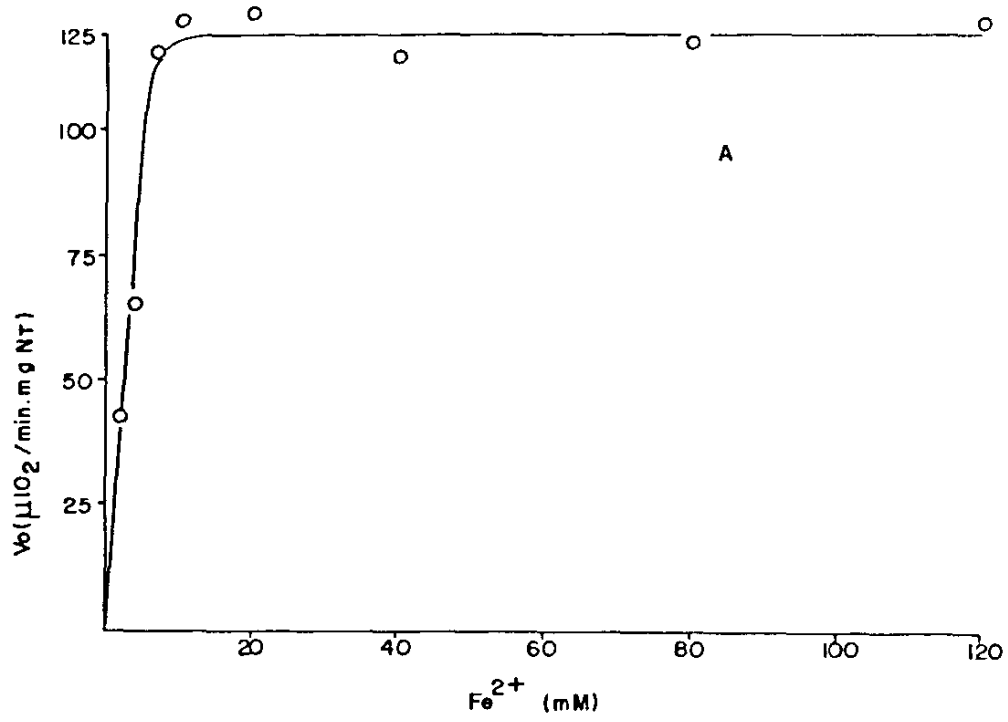


FIGURA 41 - (A) Efeito da concentração do substrato (Fe^{2+}) na velocidade de consumo de O_2 e (B) gráfico de Lineweaver-Burk à partir de (A) de *T. ferrooxidans*, isolado Tf-LR.

TABELA 15 - Valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e $Q_{O_2}(N)$ obtidos nos estudos cinéticos de respiração celular, com diferentes isolados de *T. ferrooxidans*.

ISOLADOS	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ¹	$Q_{O_2}(N)$ ²
<i>T. ferrooxidans</i> -PCE	4,88	100,0	4.167,75
<i>T. ferrooxidans</i> -FG460	9,09	196,07	6.774,81
<i>T. ferrooxidans</i> -SSP	4,99	117,65	5.921,87
<i>T. ferrooxidans</i> -LR	7,38	195,2	5.703,45

1. $V_{m\acute{a}x}$ em $\mu\text{lO}_2/\text{min.mg N total}$

2. $Q_{O_2}(N)$ em O_2 consumido ($\mu\text{l}/\text{h.mg N}_{\text{total}}$), calculado no ensaio a 120 mM de Fe^{2+} e pH 1,8.

Em linhas gerais os valores de Km e Vmax obtidos estão em boa concordância com os obtidos por KELLY & JONES (1978) e DiSPIRITO & TUOVINEN (1982b) e os valores de $Q_{O_2(N)}$ estão próximas dos valores obtidos por SILVERMAN & LUNDGREN (1959b).

V.3.2. Efeito do pH

As figuras 42, 43, 44 e 45 mostram as cinéticas de consumo de O_2 em diferentes valores de pH inicial (0,9; 1,2; 1,8; 2,3) dos isolados Tf-PCE, Tf-FG460, Tf-SSP e Tf-LR, respectivamente. A melhor atividade oxidativa de todos isolados foi atingida em pH 1,8, diferentemente dos resultados alcançados por SILVERMAN & LUNDGREN (1959b); nesse trabalho os autores mostraram um pH em torno de 2,5, como o melhor em termos de atividade oxidativa de uma linhagem de *T. ferrooxidans*. Deve-se ressaltar entretanto, que os isolados testados foram mantidos e cultivados (para obtenção da suspensão celular) em meio de cultura em pH aproximado de 1,8, enquanto que no trabalho citado, a cultura foi cultivada em meio a pH 2,8. Essa diferença no pH de manutenção e cultivo das culturas pode explicar os diferentes resultados obtidos.

Pelas mesmas figuras, pode-se observar que apenas o isolado Tf-LR apresentou atividade respiratória significativa em pH 0,9. Os demais isolados praticamente foram inibidos nessa condição extrema. A tabela 16 mostra o efeito do pH nas atividades oxidativas dos quatro isolados, em termos relativos à atividade específica verificada em pH 1,8 (admitida no caso como 100%). Como já mencionado, em pH 0,9 o Tf-LR apresenta 35,1% de atividade respiratória em relação a sua atividade em pH 1,8, enquanto os demais não ultrapassam 5%. Isso mostra uma severa inibição desses isolados nessa elevada acidez.

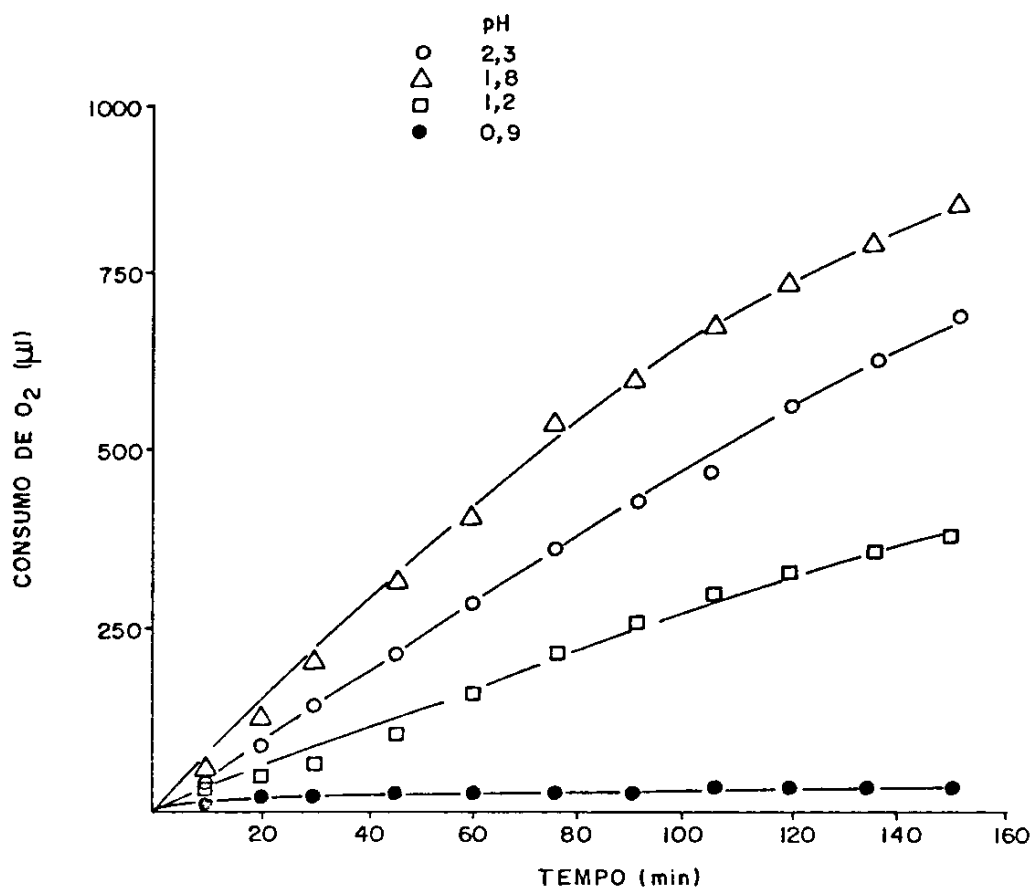


FIGURA 42 - Efeito do pH (valores indicados na legenda) na oxidação de Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE. Os frascos de reação contêm: $Fe^{2+} = 120$ mM e 0,5 ml de suspensão celular (0,135 mgN_{total}).

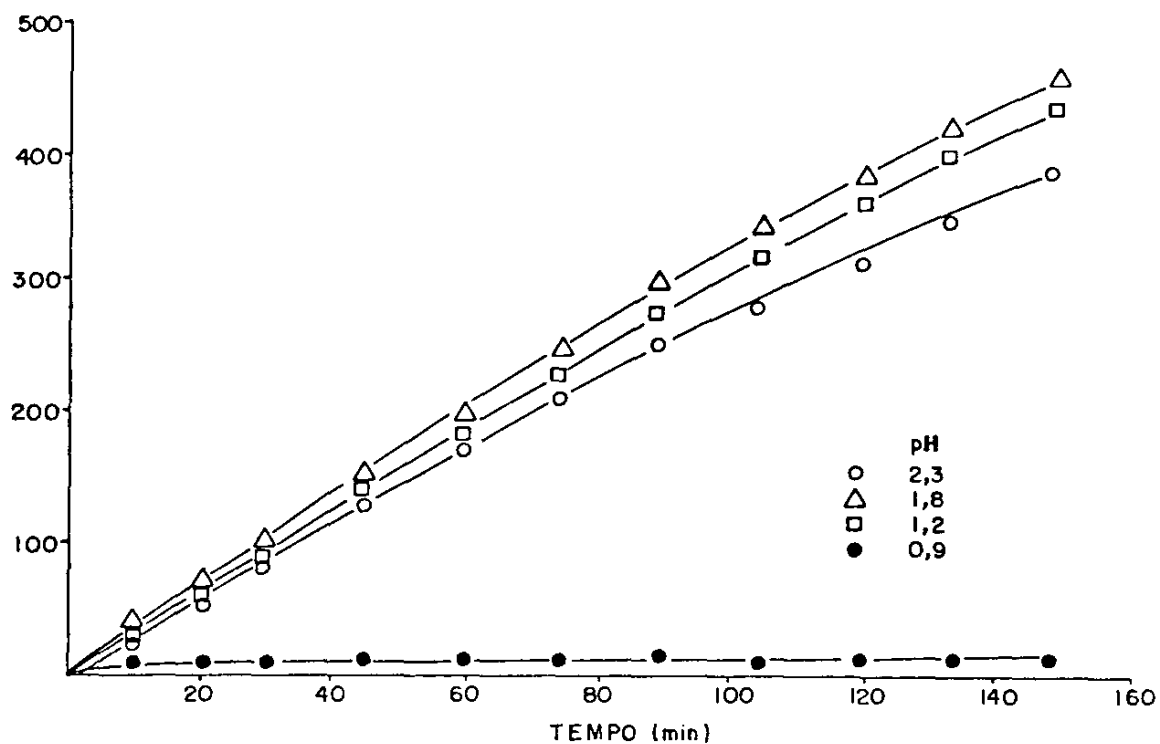


FIGURA 43 - Efeito do pH (valores indicados na legenda) na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG-460. Os frascos de reação continham $Fe^{2+} = 120$ mM e 0,5 ml de suspensão celular ($0,126$ mgN_{total}).

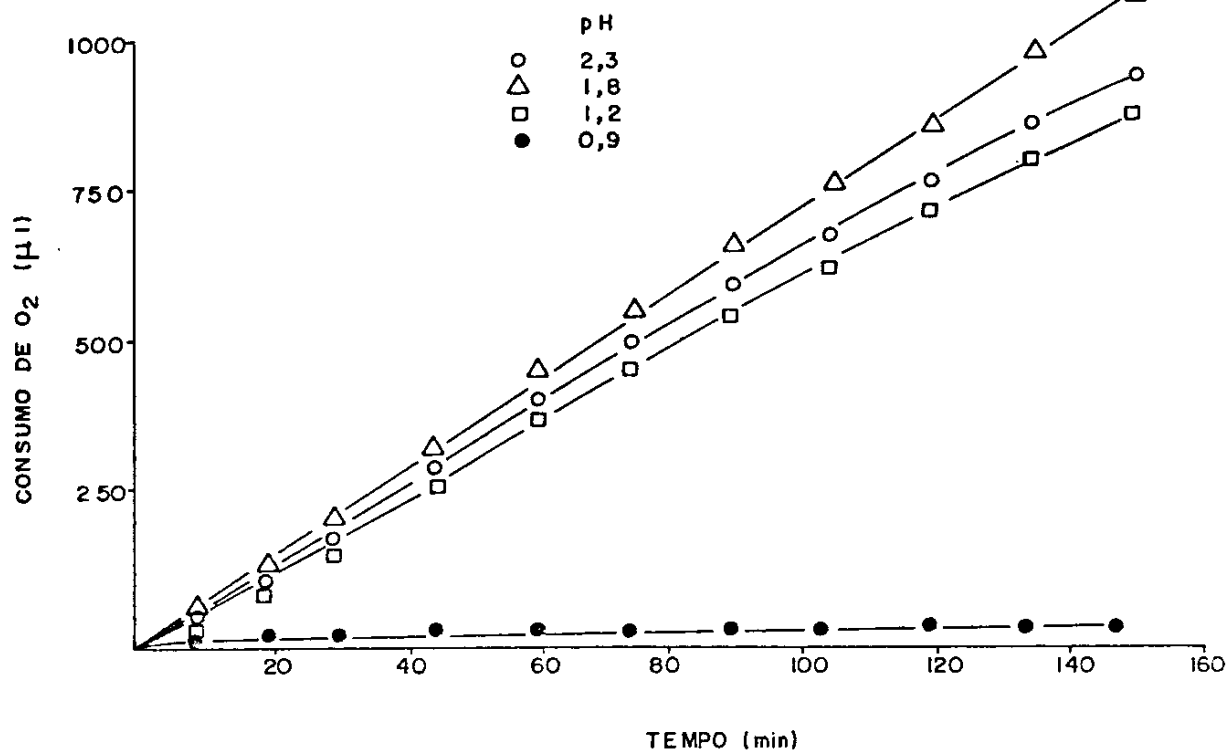


FIGURA 44 - Efeito do pH (valores indicados na legenda) na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-SSP. Os frascos continham: $Fe^{2+} = 120$ mM e 0,5 ml de suspensão celular (0,119 mgN_{total}).

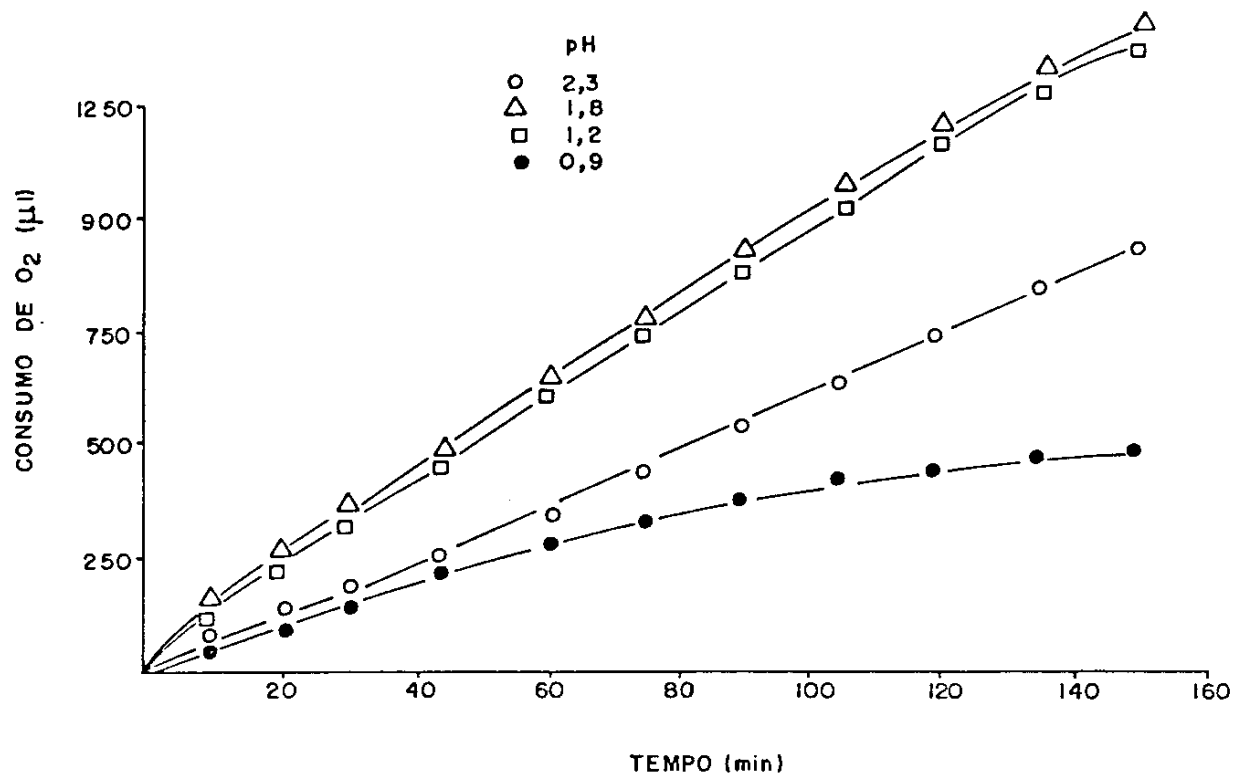


FIGURA 45 - Efeito do pH (valores indicados na legenda) na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-LR. Os frascos continham: $Fe^{2+} = 120$ mM e 0,5 ml de suspensão celular ($0,107 \text{ mgN}_{\text{total}}$).

TABELA 16 - Efeito do pH na atividade oxidativa dos quatro isolados de *T. ferrooxidans*. Os resultados estão expressos em porcentagem relativa às atividades específicas dos respectivos isolados em pH 1,8 e 120 mM de Fe^{2+}

ISOLADOS	pH		
	0,9	1,2	2,3
Tf-PCE	5,1	49,9	75,84
Tf-FG460	2,2	97,8	78,9
Tf-SSP	2,5	86,3	88,9
Tf-LR	35,1	94,7	66,5

Em pH 1,2 o isolado Tf-PCE ainda apresenta uma razoável inibição (~50%), enquanto Tf-LR e Tf-FG460 mostram uma atividade oxidativa praticamente normal (95 e 98%, respectivamente). Tf-SSP também mostrou pouca inibição nesse valor de pH (86% de atividade). Nota-se que em pH 2,3 todas as atividades oxidativas foram reduzidas, sendo que o isolado Tf-SSP apresentou-se com a melhor atividade, em relação aos outros isolados.

De qualquer forma, pode-se verificar que existe respostas diferenciadas de cada isolado em relação ao pH do meio no qual os isolados foram submetidos. Essa diferença foi detectada praticamente em todas as condições testadas.

V.3.3. Efeito de metais pesados.

A Figura 46-A, mostra o efeito do urânio no isolado Tf-PCE. Nota-se claramente uma inibição progressiva na atividade respiratória da bactéria: na presença de 6 e 8 mM do metal, essa inibição é virtualmente total, indicando uma paralisação completa no sistema oxidativo do Fe^{2+} desse isolado. No caso do molibdênio (figura 46-B) o comportamento do isolado é bem semelhante, pois nas concentrações de 1 e 2 mM ainda detecta-se alguma atividade e em 3 e 4 mM, essa atividade é totalmente inibida.

Por outro lado, o mercúrio revelou a mais potente inibição (figura 46-C), pois mesmo na menor concentração (0,1 mM ou cerca de 20 ppm), ocorre uma severa paralisação da atividade oxidativa do isolado.

As figuras 47 e 48 (A, B e C) mostram as cinéticas respiratórias dos isolados Tf-FG-460 e Tf-SSP, respectivamente, na presença dos três metais pesados. Pode ser visto que os dois isolados res

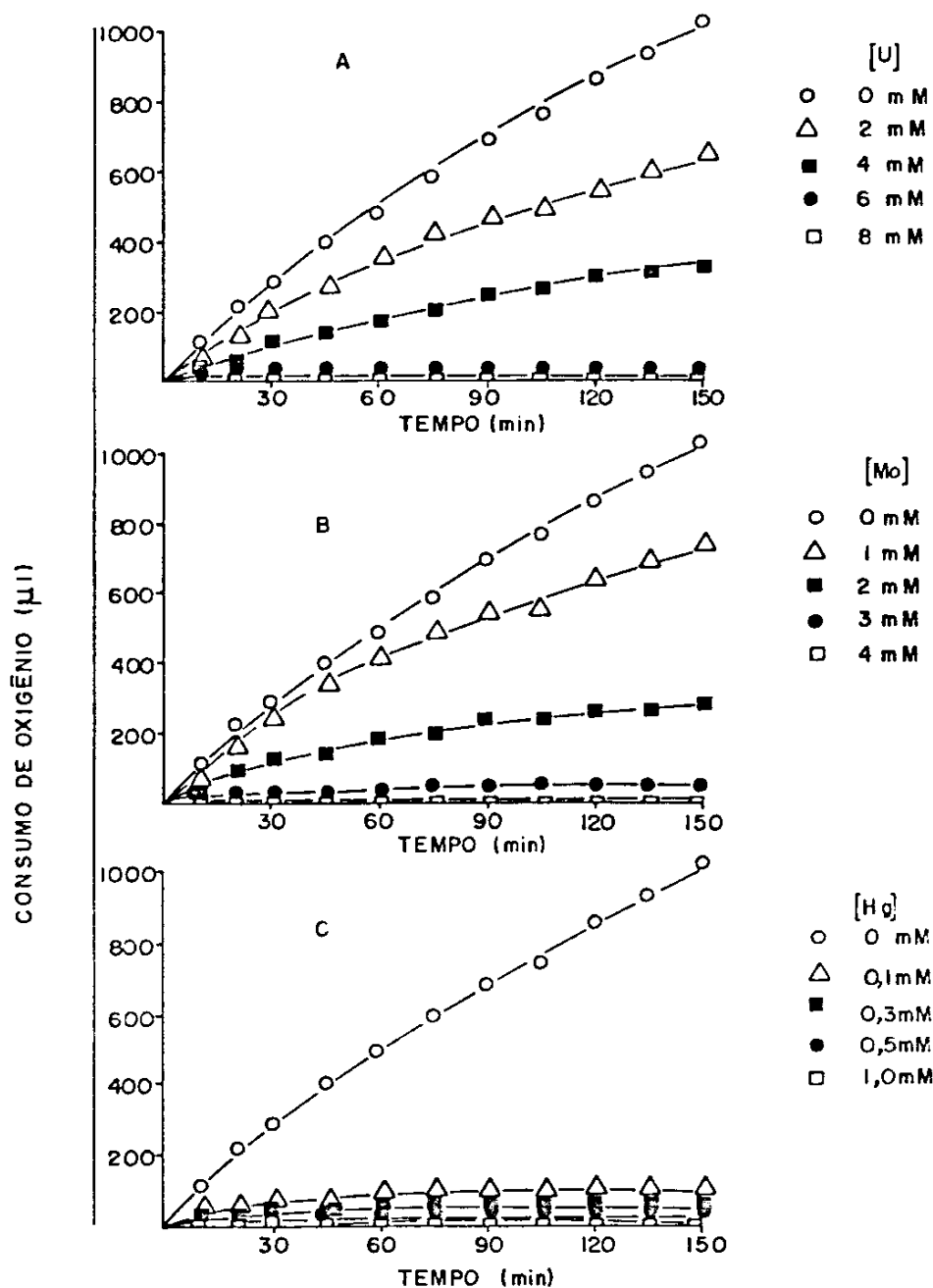


FIGURA 46 - Efeito de metais pesados na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-PCE. (A) urânio; (B) molibdênio; (C) mercúrio. Os frascos continham: $\text{Fe}^{2+} = 120 \text{ mM}$ e $0,5 \text{ ml}$ de suspensão celular ($0,135 \text{ mgN}_{\text{total}}$).

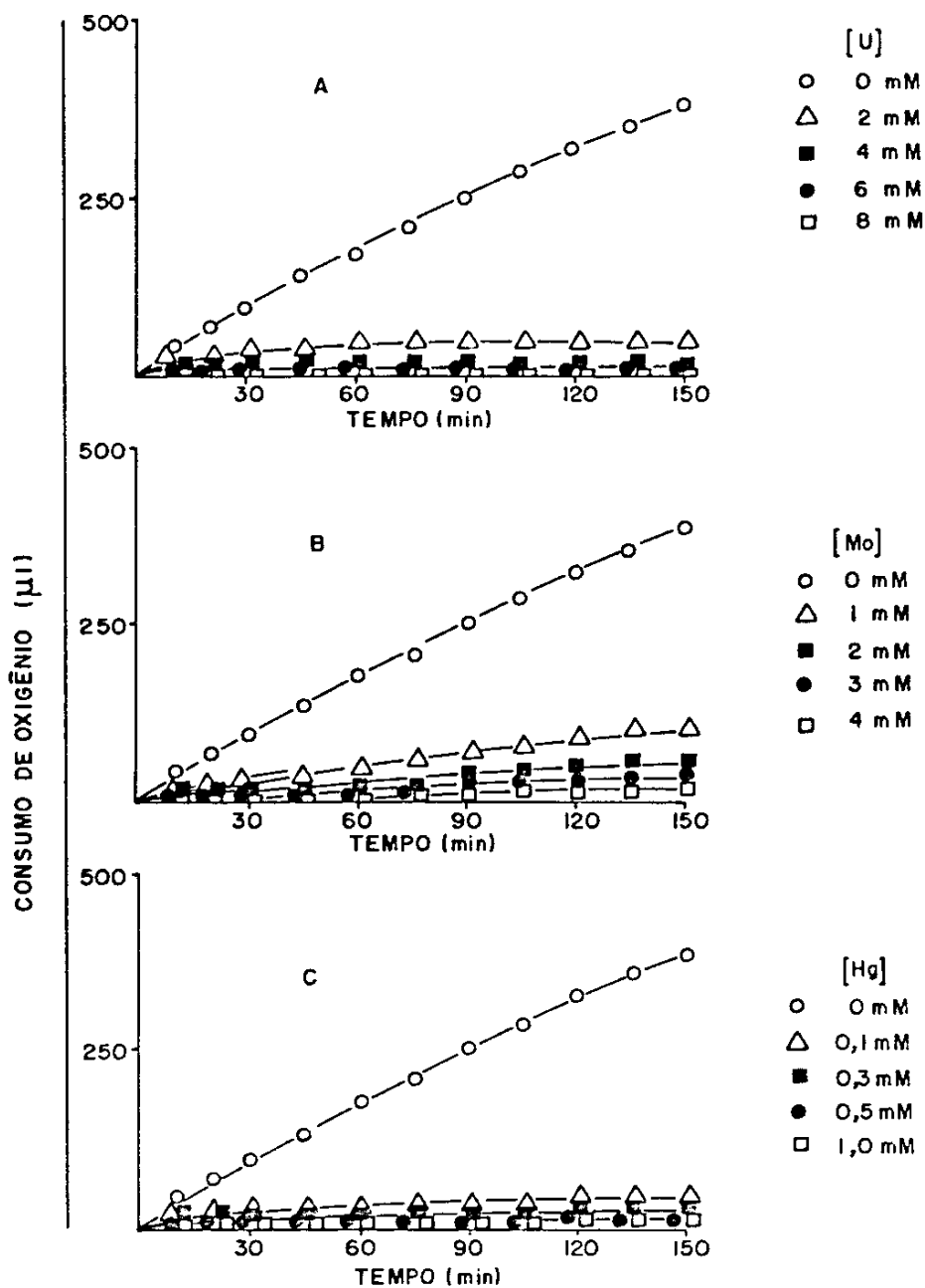


FIGURA 47 - Efeito de metais pesados na oxidação do Fe^{2+} avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-FG460. A) urânio; B) molibdênio; C) mercúrio. Os frascos continha: $\text{Fe}^{2+} = 120 \text{ mM}$ e $0,5 \text{ ml}$ de suspensão celular ($0,126 \text{ mgN}_{\text{total}}$).

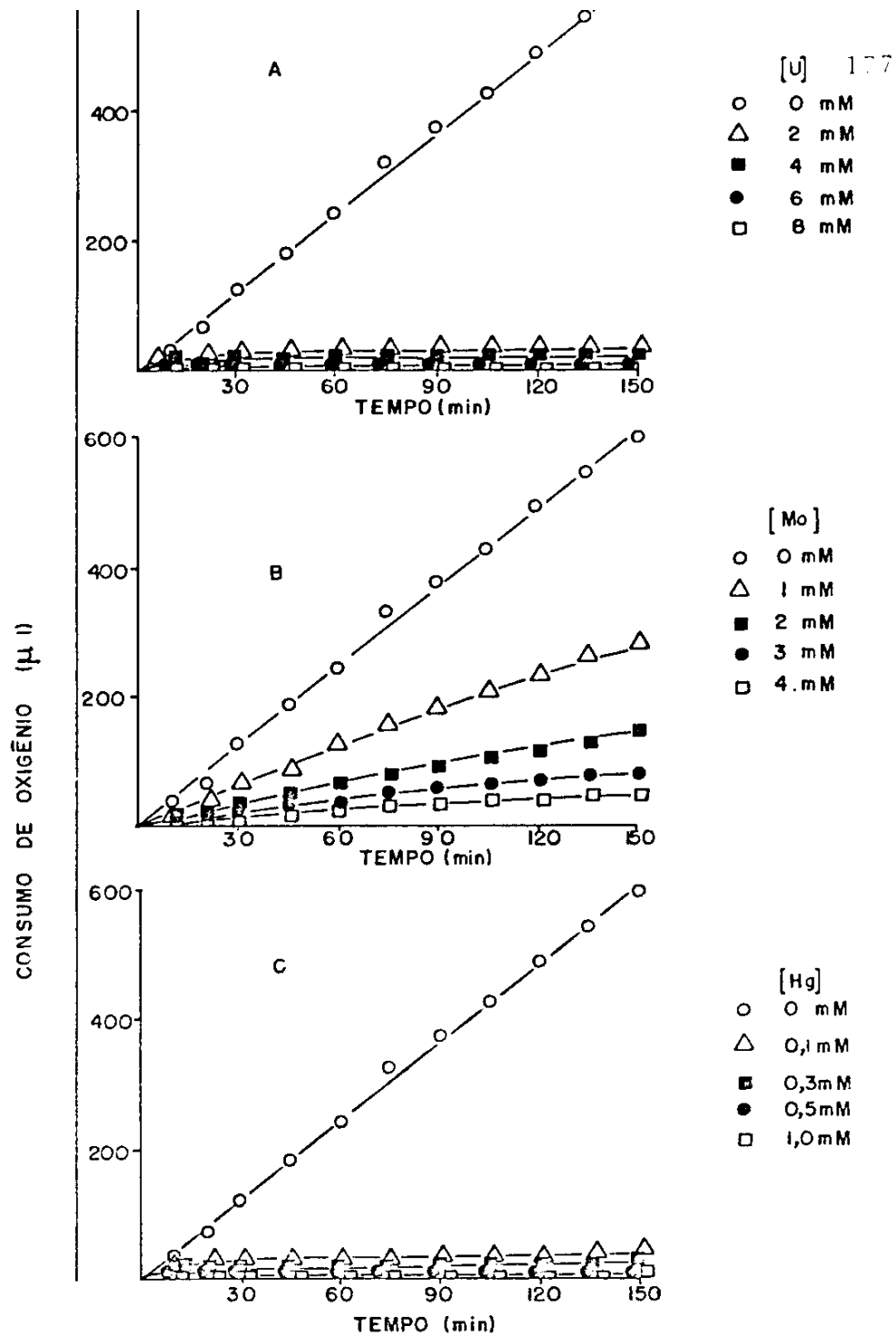


FIGURA 48 - Efeito de metais pesados na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-SSP. (A) urânio; (B) molibdênio; (C) mercúrio. Os frascos continham: $Fe^{2+} = 120$ mM e 0,5 ml de suspensão celular ($0,119$ mgN_{total})

ponderam de forma semelhante, sobretudo em relação ao urânio e ao mercúrio, pois mesmo nas menores concentrações (2 e 0,1 mM, respectivamente), ocorreu inibição quase total em suas atividades oxidativas. Alguma diferença pode ser notada entre esses isolados, nas curvas de inibição pelo molibdênio. Enquanto que o isolado Tf-FG460 (figura 47-B) apresentou uma forte inibição em 1 mM do metal (inibição quase total nas demais concentrações), o isolado Tf-SSP (figura 48-B) conseguiu apresentar uma atividade relativamente boa nessa menor concentração (cerca de 50% do controle).

Dentre os isolados testados, o Tf-LR foi aquele que apresentou os melhores níveis de resistência aos metais pesados. Pela figura 49-A, nota-se claramente que o urânio nas concentrações de 2 e 4 mM não teve qualquer efeito inibidor na atividade de oxidação do Fe^{2+} pelo isolado. Rigorosamente pode-se até observar algum estímulo dessa atividade na presença de 2 mM de urânio. Entretanto, da mesma forma que os outros isolados de *T. ferrooxidans*, as concentrações de 6 e 8 mM foram altamente tóxicas para a bactéria.

Na presença de molibdênio (figura 49-B), também pode ser observada uma diferença marcante desse isolado (Tf-LR) em relação aos demais. Como foi visto, esse metal mesmo em sua menor concentração (1 mM), provocou significativas inibições nesses isolados (menor no Tf-PCE), enquanto que no Tf-LR essa concentração praticamente não interferiu com a atividade do isolado. As outras concentrações, a exemplo do observado com Tf-PCE, Tf-FG40 e Tf-SSP, provocaram também severas inibições no Tf-LR.

O mercúrio, no caso do Tf-LR (Figura 49-C), também mostrou ser um potente inibidor da atividade respiratória desse isolado, a exemplo do ocorrido com os demais. Assim, as concentrações de Hg utilizadas nos ensaios, mesmo a mais baixa (0,1 mM), não permitiu

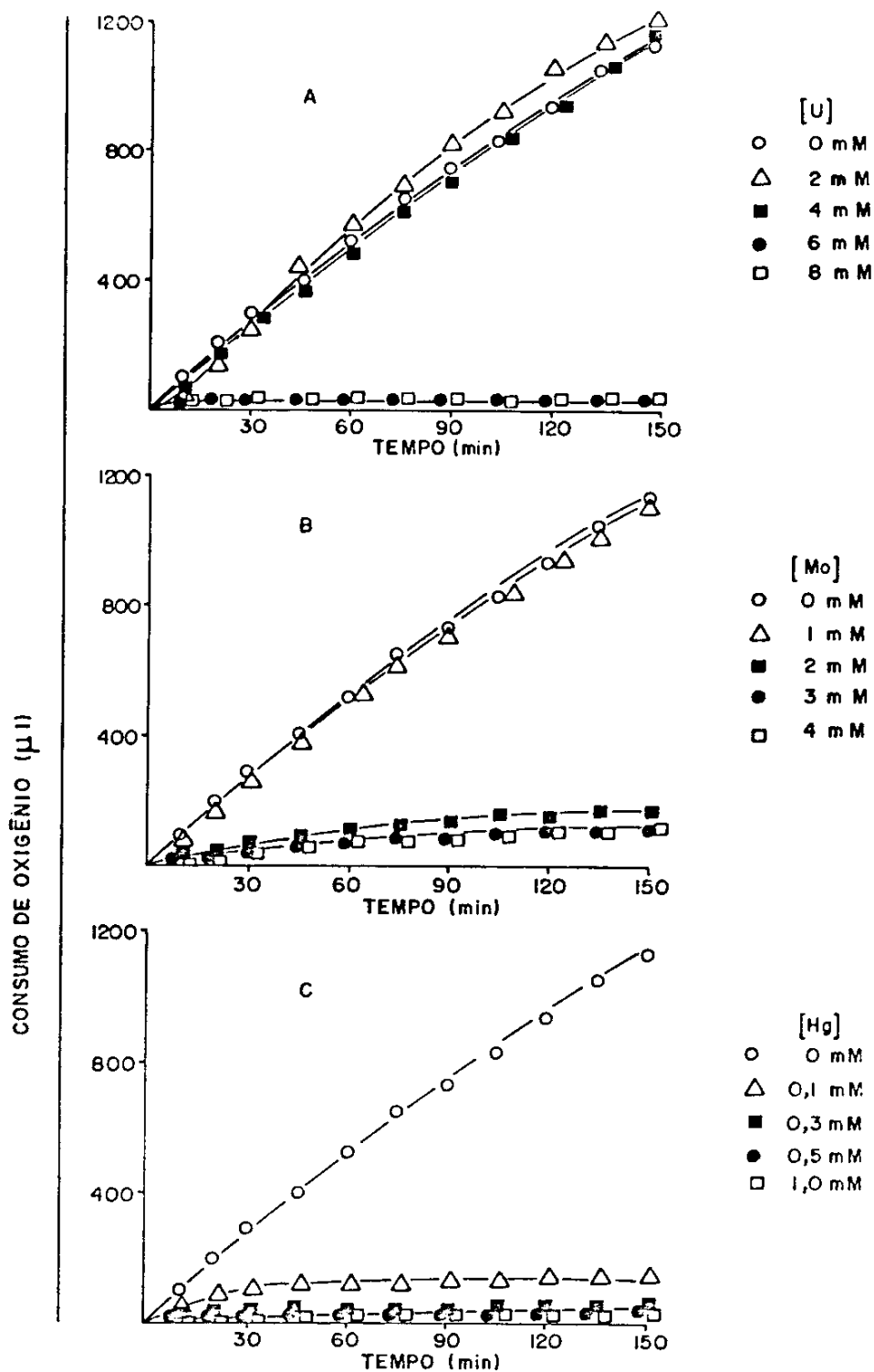


FIGURA 49 - Efeito de metais pesados na oxidação do Fe^{2+} , avaliada pelo consumo de O_2 , por *T. ferrooxidans*, isolado Tf-LR. A) urânio; B) molibdênio; C) mercúrio. Os frascos continham: $\text{Fe}^{2+} = 120 \text{ mM}$ e $0,5 \text{ ml}$ de suspensão celular ($0,107 \text{ mgN}_{\text{total}}$).

estabelecer diferenças significativas em relação à resistência a esse metal, pelos isolados de *T. ferrooxidans*.

Utilizando os dados cinéticos obtidos, calculou-se os percentuais inibitórios de cada concentração dos metais testados, para cada isolado bacteriano. Tomou-se como controle, o quociente respiratório de cada isolado obtido na ausência dos metais ($Q_{O_2}/h.mg\ N\ total$).

A tabela 17 mostra esses valores. Na presença de 2 e 4 mM de urânio, os isolados são facilmente diferenciados entre si. O Tf-LR não foi inibido (zero e 2,8%), Tf-PCE foi moderadamente (28,2 e 63,6%) e Tf-FG460 e Tf-SSP foram severamente inibidos (98 e 94,9%, respectivamente).

Diferenças significativas entre os isolados, também podem ser observadas em relação à resistência a 1 mM de molibdênio. Essa concentração desse metal, é na realidade, a que permite uma diferenciação mais completa entre todos os isolados. Tf-LR apresentou uma alta resistência (2,1% de inibição), Tf-PCE mostrou uma boa resistência (15,0% de inibição), Tf-SSP uma resistência média (52,8% e o Tf-FG460 uma baixa resistência, pois ocorreu 78,2% de inibição de sua atividade na referida concentração do molibdênio.

Como já destacado, o mercúrio não permitiu uma boa diferenciação entre os isolados, pois em 0,1 mM todos foram inibidos de forma quase semelhante: 81,6%, 90,3%, 94,1% e 78,5% para os isolados Tf-PCE, Tf-FG460, Tf-SSP e Tf-LR, respectivamente. Mesmo assim, nota-se uma certa ordem de resistência coerente com os outros metais, prevalecendo Tf-LR e Tf-PCE.

Dessa forma, pode-se estabelecer uma classificação entre os isolados, em relação à resistência aos metais pesados utilizados nesses ensaios: Tf-LR > Tf-PCE > Tf-SSP ≥ Tf-FG460. Esses resulta-

TABELA 17 - Efeito de metais pesados na atividade oxidativa dos quatro isolados de *T. ferrooxidans*. Resultados expressos como porcentagem de inibição, em relação aos quocientes respiratórios - $Q_{O_2}(N)$ - de cada isolado, na ausência dos metais

METAL	CONCENTRAÇÃO (mM)	ISOLADOS			
		Tf-PCE	Tf-FG460	Tf-SSP	Tf-LR
Urânio	2	38,2	91,4	94,5	5,9(+)
	4	63,6	98,0	94,9	2,8
	6	97,8	98,1	98,9	99,3
	8	98,2	99,4	99,8	99,9
Molibdênio	1	15,0	78,2	52,8	2,1
	2	62,6	86,1	86,1	79,2
	3	95,4	91,3	84,7	84,9
	4	97,3	93,2	89,9	85,0
Mercúrio	0,1	81,6	90,3	94,1	78,5
	0,3	91,8	97,0	94,5	92,3
	0,5	94,2	99,3	96,0	92,5
	1,0	94,5	99,8	96,5	92,8

(+) Indica maior $Q_{O_2}(N)$ que o controle sem o metal

dos obtidos, praticamente comprovaram os estudos já discutidos, sobre o crescimento dos isolados na presença de urânio (figuras 34, 35, 36 e 37) onde a ordem de resistência foi basicamente a mesma.

V.4. LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE URÂNIO POR *T. ferrooxidans*.

Paralelamente ao desenvolvimento dos estudos básicos apresentados, foi conduzido um programa de trabalho objetivando avaliar a potencialidade de dois tipos de minérios uraníferos (minério damina de Figueira - PR e de Poços de Caldas - MG), frente à técnica de lixiviação bacteriana.

V.4.1. Ensaio em frascos agitados

A. Minério de Figueira - PR.

A figura 50 (A, B e C) mostra os resultados obtidos com adição do meio 9K (sem Fe^{2+}), nos três tratamentos realizados. São apresentados nas citadas figuras, três critérios básicos para avaliar a ação bacteriana sobre o referido minério: A e B mostram respectivamente a evolução do pH e do Eh (potencial de oxi-redução), e C mostra as curvas de solubilização do urânio.

Após um período de 15 dias, necessário para a estabilização do pH em aproximadamente 2,8 pela adição de H_2SO_4 , foram realizados os tratamentos "inoculado", "esterilizado" e "não inoculado-não esterilizado". Pode-se observar que com a adição inicial do meio de cultura sem a fonte energética, tanto o frasco inoculado como o sem inocular e sem esterilizar, mostraram atividade bacteriana significativa. Essa atividade fica evidenciada pelo progressivo abaixamento do pH até cerca de 1,2 (figura 50-A) e pela elevação do Eh até aproximadamente 500 mV (figura 50-B); esses dois parâmetros no

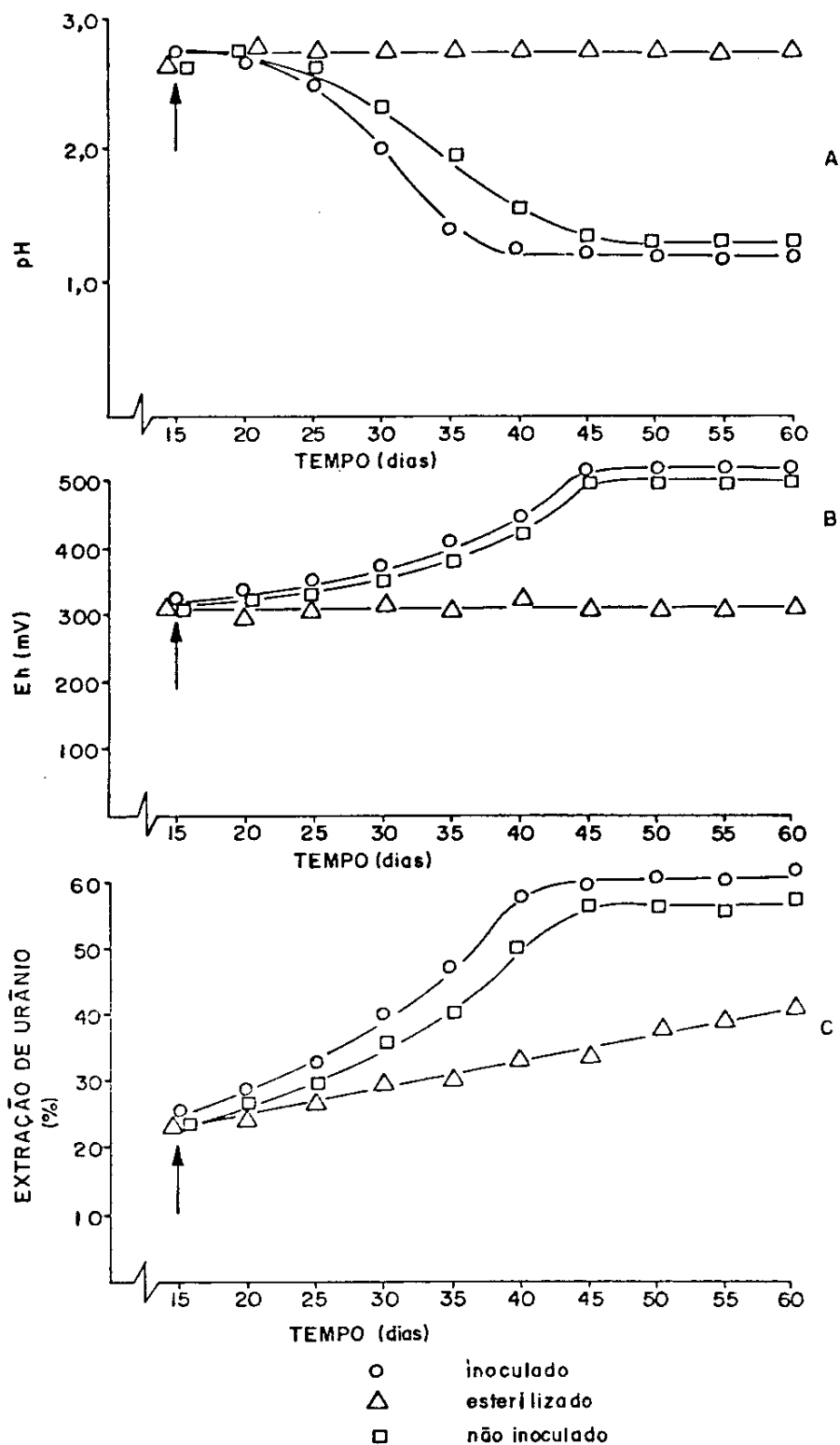


FIGURA 50 - Lixiviação bacteriana em frascos do minério da Figueira - PR, na presença de meio de cultura 9K (sem Fe^{2+}). a) pH; b) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio. A seta indica o início dos tratamentos, após a fase de correções ácidas.

frasco esterilizado, permaneceram praticamente inalterados durante todo o período do ensaio (60 dias). Ressalta-se ainda que o pH desse tratamento foi mantido em 2,8, devido a adições subseqüentes de ácido sulfúrico.

O abaixamento do pH nos dois tratamentos citados, mostra que houve produção de ácido pelas bactérias a partir da pirita presente no minério, conforme mecanismo já discutido anteriormente. Além disso, a elevação do Eh foi devido a oxidação do Fe^{2+} , originado também a partir da pirita, pois esse substrato oxidável não foi adicionado no meio de cultura (9K, sem Fe^{2+}). No final do ensaio, as concentrações de Fe^{3+} nesses tratamentos situaram-se em torno de 4 g/l, enquanto que no esterilizado obteve-se apenas 0,2 g/l, devido provavelmente a uma oxidação pelo próprio oxigênio nas condições de pH ($\sim 2,8$) e sob agitação constante.

No caso do frasco "não inoculado-não esterilizado", essas indicações revelaram a presença natural do *T. ferrooxidans* no próprio minério. Além dessas, testes de viabilidade nesse tratamento, apresentaram sempre resultados positivos, ao contrário do tratamento esterilizado.

Como conseqüência dessa ação microbiana sobre o sulfeto metálico presente no minério (FeS_2), gerando H_2SO_4 e Fe^{3+} , a extração do urânio foi significativamente maior nesses dois tratamentos (61,0% e 57,6% respectivamente, no "inoculado" e "não inoculado"), em relação ao frasco esterilizado (40% de extração). Nota-se claramente na figura 50-C, que a cinética de extração do metal é bastante semelhante às cinéticas da produção de ácido (Figura 50-A) e do Eh (50-B). Deve-se destacar contudo, que mesmo no tratamento esterilizado, nota-se uma elevação da extração do urânio a partir do 15º dia (valor obtido na fase de ajustes de acidez para os três tratamentos). Essa

elevação entretanto, foi devido às novas adições de ácido efetuadas sô nesse tratamento, para a manutenção do pH no valor indicado (2,8).

Essa adição suplementar de H_2SO_4 , determinou um maior consumo de ácido no tratamento esterilizado; enquanto neste o consumo foi de cerca de 1,5 g de H_2SO_4 (ou ~ 50 kg/t), nos tratamentos bacterianos o consumo situou-se em torno de 1,1 g (ou ~ 37 kg/t), gastos apenas na fase de correção ácida inicial.

Evidenciando a ação indireta bacteriana no processo, isto é, os produtos de seu metabolismo sobre a pirita (H_2SO_4 e Fe^{3+}), são os responsáveis pela solubilização de metais presentes no minério, obteve-se também diferenças significativas de solubilização de molibdênio: 28, 24 e 15% nos tratamentos "inoculado", "não inoculado" e "esterilizado", respectivamente.

Algumas diferenças em relação ao teste anterior, foram observadas no ensaio sem a adição do meio de cultura, como pode ser constatado pela figura 51 (A, B e C). Somente o tratamento "inoculado" mostrou atividade bacteriana satisfatória. Observa-se que ocorreu abaixamento do pH (figura 51-A) após a realização do inóculo, porém sem a mesma eficiência do mesmo tratamento do teste anterior: enquanto que com a adição do meio o pH atingiu cerca de 1,2, sem essa adição o pH caiu à 1,8. Tanto o "esterilizado" como o "sem inocular", mostram que o pH obtido com ajustes com H_2SO_4 ($\sim 2,8$) manteve-se sem alteração. A figura 51-B (potencial de oxi-redução) mostra o mesmo tipo de comportamento. A concentração de Fe^{3+} no final do ensaio do tratamento "inoculado", foi menos da metade (1,8 g/l) daquela alcançada no teste anterior no mesmo tratamento.

Em relação à solubilização do urânio (Figura 51-C), como era de se esperar, o tratamento "inoculado" foi o mais eficiente,

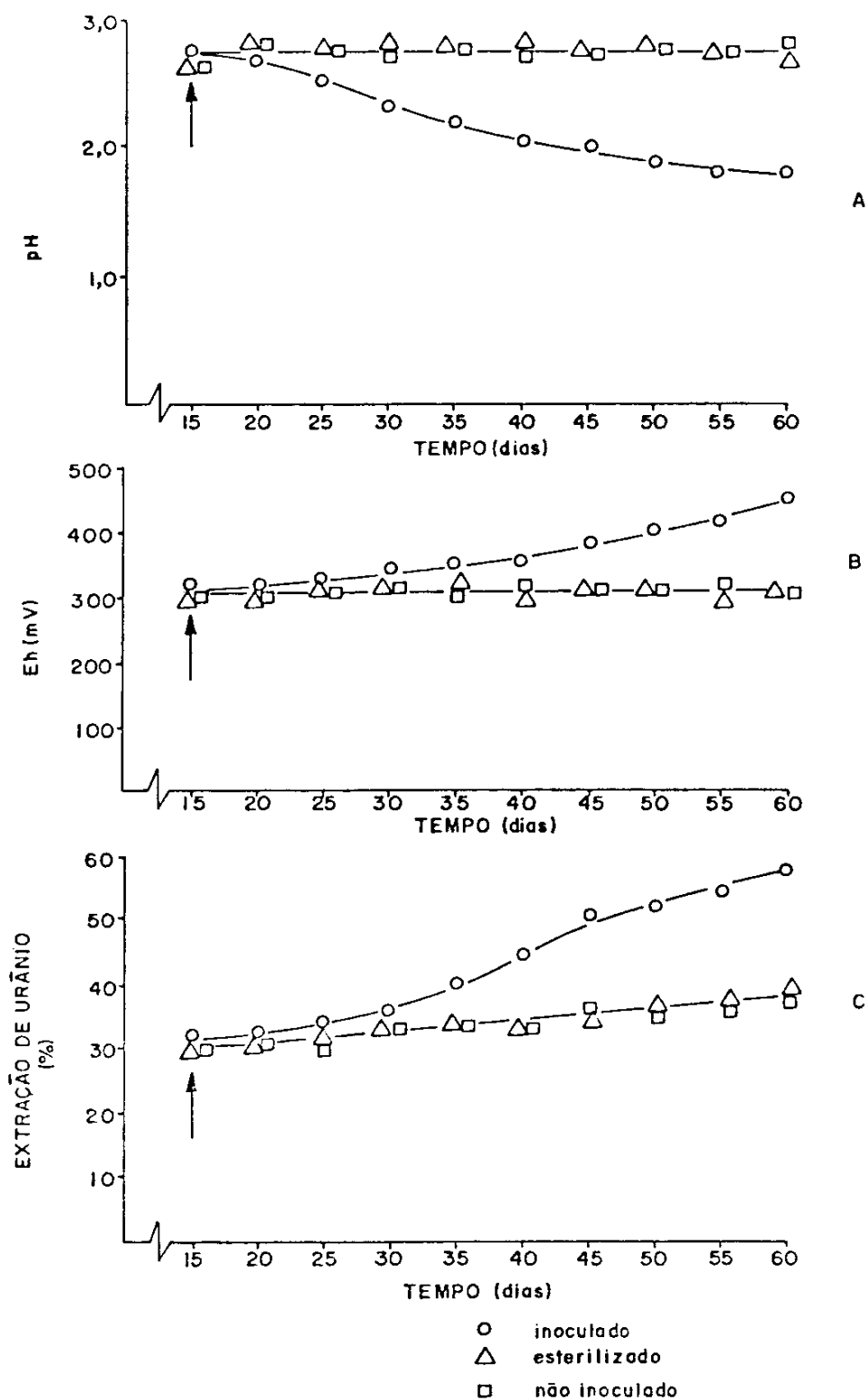


FIGURA 51 - Lixiviação bacteriana em frascos do minério de Figueira - PR, na ausência de meio de cultura 9K. a) pH; B) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio. A seta indica o início dos tratamentos, após a fase de correções ácidas.

pois após 60 dias, obteve-se cerca de 58% de extração, enquanto que nos outros dois, "esterilizado" e "não inoculado", esses rendimentos foram 38 e 39%, respectivamente. Nota-se que mesmo não se detectando a mesma atividade no tratamento "inoculado" desse ensaio em relação ao anterior, o nível de extração de urânio foi praticamente o mesmo (~60%). O consumo de ácido foi aproximadamente igual ao do ensaio com adição de meio, pois este consumo foi realizado essencialmente na fase de correção. No tratamento "não inoculado", esse consumo foi mais elevado (a exemplo do "esterilizado"), pois como não houve atividade bacteriana detectável, foi necessário também, correções ácidas subseqüentes.

A adição do meio de cultura, parece ter favorecido um rápido desenvolvimento das bactérias já presentes no minério, fazendo com que no período do ensaio, a atividade dessa população fosse detectada pelos parâmetros mencionados. Na ausência do meio, essa atividade (provavelmente houve, pois foi provado no teste anterior a presença da bactéria), foi insuficiente, no período de incubação, para se verificar positivamente os seus critérios indicativos de pH e elevação do Eh.

Independente desse fato, o minério em estudo mostrou uma boa potencialidade para a aplicação da lixiviação bacteriana do urânio contido, pois existem bactérias endógenas e substrato oxidável que permite a geração de ácido e Fe^{3+} , suficientes para consumir o excesso de materiais alcalinos e solubilizar os metais presentes.

B. Minério de Poços de Caldas - MG.

Como diferença fundamental entre esse tipo de minério e o de Figueira, sob o ponto de vista de lixiviação bacteriana, deve-se

destacar que foi desnecessário a fase inicial de correções ácidas, para ajustes do pH em um valor adequado para a atividade bacteriana ($\sim 3,0$). Nos dois tipos de ensaios realizados, tanto com meio de cultura 9K (sem Fe^{2+}) como na ausência deste (somente água), o pH inicial da polpa (minério + solução lixiviante) apresentou-se com características ácidas ($\sim 3,5$). Essa característica é devido, provavelmente, à baixa concentração de minerais de natureza alcalina, sobretudo carbonatos, e ainda a uma atividade natural de bactérias já presentes no minério. Como esse valor está razoavelmente dentro da faixa de atividade do *T. ferrooxidans*, iniciou-se imediatamente os tratamentos planejados.

A figura 52 mostra as curvas de pH (A), Eh (B) e rendimento de extração do urânio (c), no ensaio com adição do meio de cultura 9K (sem Fe^{2+}). Pode-se observar pela primeira figura, que após 5 dias de cultivo, o pH dos tratamentos "inoculado" e "não inoculado", começou rapidamente a decrescer, indicando uma eficiente utilização da pirita tanto das bactérias inoculadas, como daquelas endógenas na amostra mineral.

Analogamente ao pH, o Eh (figura 52-B) rapidamente se eleva nos dois referidos tratamentos, em função da oxidação biológica do Fe^{2+} à Fe^{3+} . Na ausência dessas bactérias, isto é, no tratamento esterilizado, tanto o pH como o potencial de oxi-redução permanecem estáveis nos valores iniciais.

Cerca de 20 dias após o início do teste, o pH atinge seu menor valor (aproximadamente 1,0) nos frascos contendo bactérias em atividade. O Eh nesse tempo ainda está em ascensão, sendo que seu valor máximo (~ 680 mV) só foi alcançado no final do ensaio (50 dias). Esse fato revela uma constante oxidação bacteriana da pirita durante o período; o íon Fe^{2+} é detectado durante o ensaio em uma concen

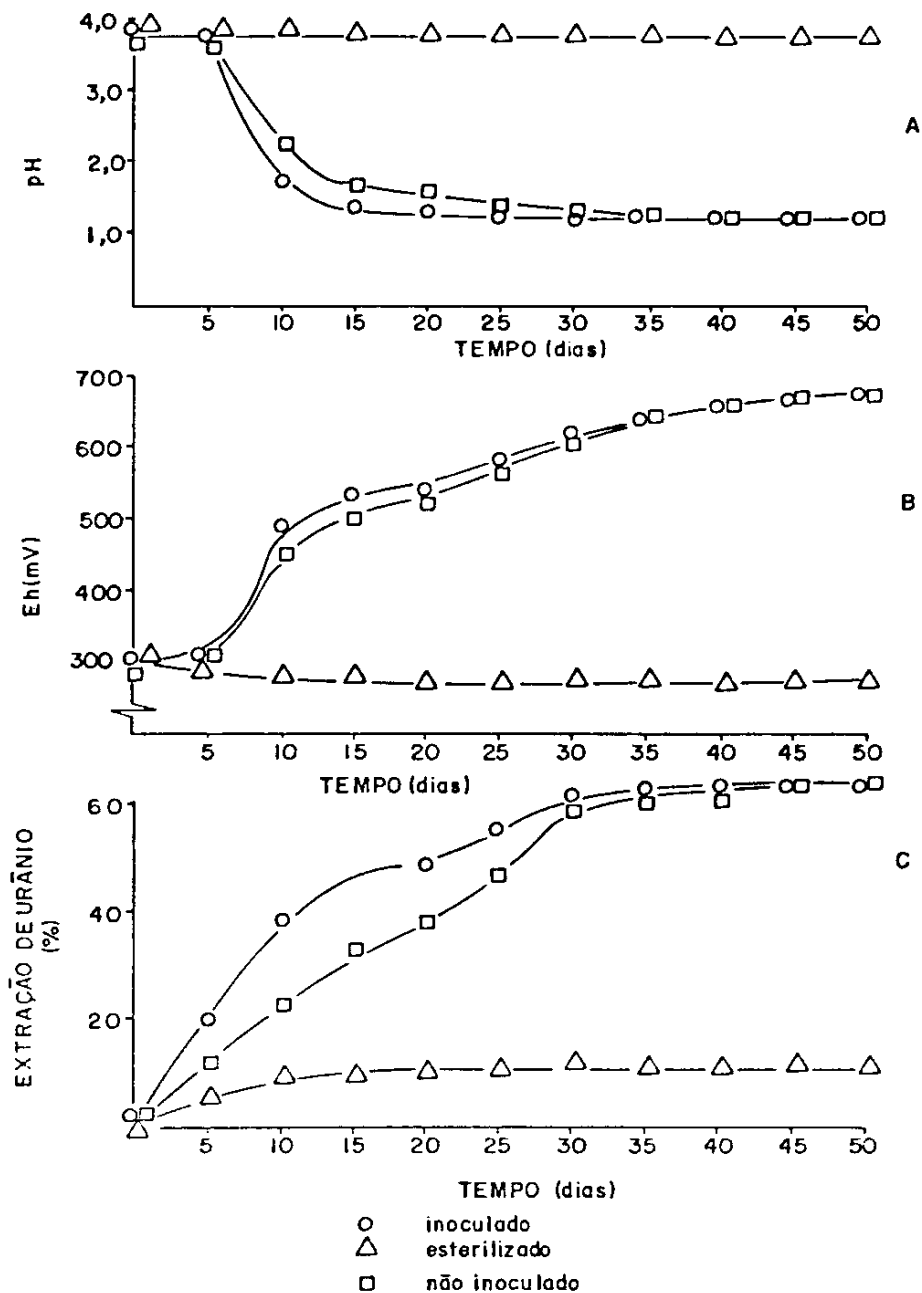


FIGURA 52 - Lixiviação bacteriana em frascos do minério de Poços de Caldas - MG, na presença de meio de cultura 9K (sem Fe^{2+}). a) pH; B) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio.

tração constante (0,2 - 0,3 g/l) e a de Fe^{3+} é crescente durante todo o ensaio, atingido cerca de 3 g/l ao final.

A extração do urânio (figura 52-C) é progressiva até cerca do 30º dia, quando a mesma se estabiliza em torno de 60% nos tratamentos "inoculado" e "não inoculado"; por outro lado, no "esterilizado" essa extração situou-se em torno de 15%.

Assim, uma significativa diferença foi constatada entre uma lixiviação do urânio desse minério via atividade bacteriana e uma não bacteriana. Destaca-se ainda, que praticamente nenhuma diferença significativa foi observada nos dois tratamentos contendo bactérias, ou inoculadas ou naturalmente presentes no minério.

No teste sem a presença do meio de cultura, novamente se comprovou as diferenças entre a presença ativa do *T. ferrooxidans* e a sua ausência. A figura 53 (A, B e C) mostra os resultados obtidos no ensaio. Apesar dos resultados finais serem semelhantes aos do teste anterior, algumas diferenças podem ser constatadas.

Enquanto que no primeiro observou-se um rápido início da atividade bacteriana (5 dias), neste último essa atividade, indicada pela queda do pH (figura 53-A) e elevação do Eh (figura 53-B), só começa a ser detectada após 15 dias de incubação. Essa diferença é, seguramente, devido à disponibilidade imediata dos nutrientes do meio 9K no caso do primeiro teste. Somente após um período de solubilização desses nutrientes (Mg, K, P, N) presentes no próprio minério, é que se intensifica a atividade biológica no segundo ensaio.

Uma outra diferença interessante é que a extração do urânio (figura 53-C) no tratamento "esterilizado", apesar de ser metade daquelas dos tratamentos bacterianos, é significativamente maior que aquela verificada no mesmo tratamento do ensaio com meio de cultura (cerca de 30 e 15%, respectivamente). Provavelmente algum compo

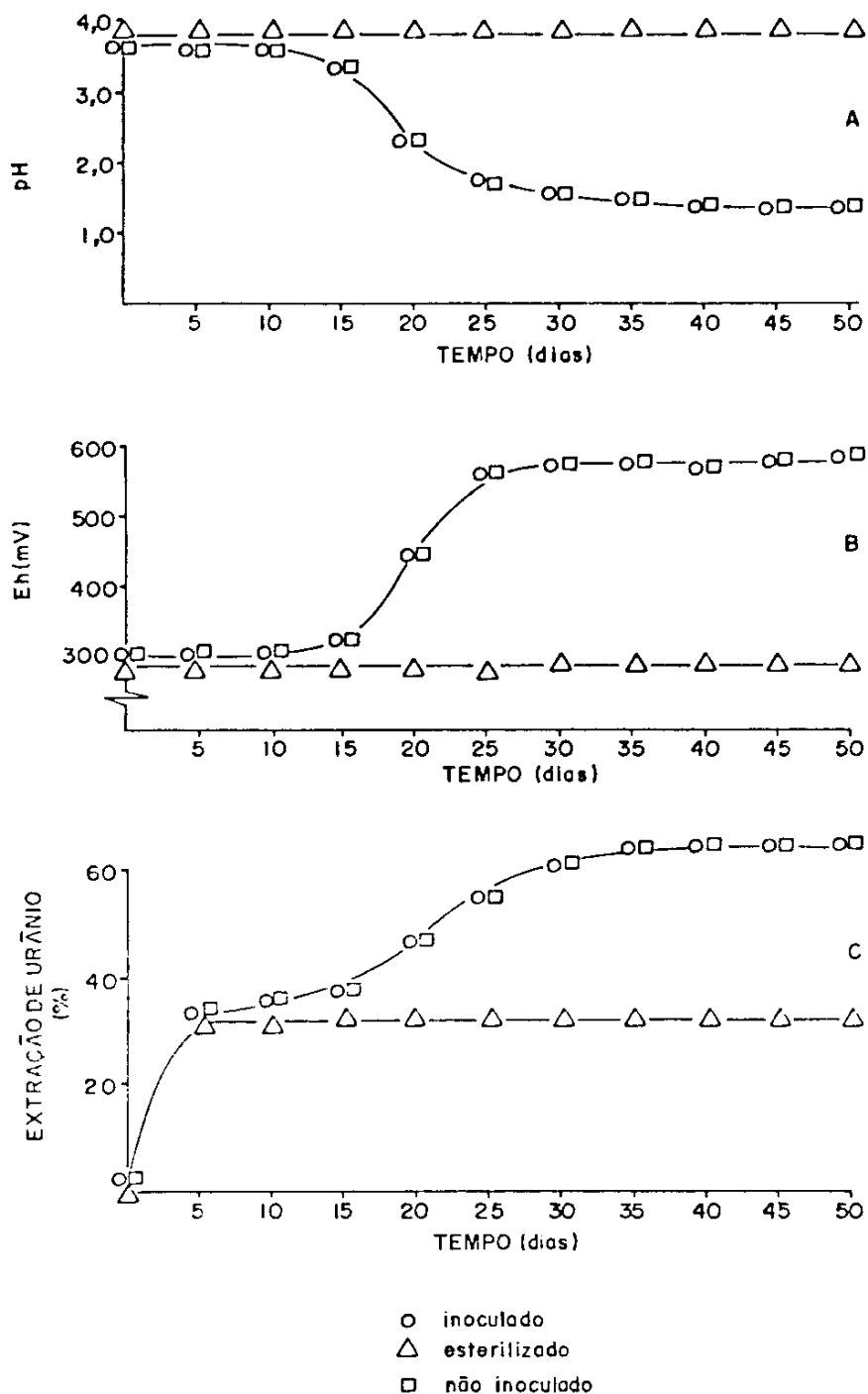


FIGURA 53 - Lixiviação bacteriana em frascos agitados do minério de Poços de Caldas - MG, na ausência do meio de cultura 9K. A) pH; B) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio.

nente do meio de cultura (talvez o fosfato) formou algum complexo insolúvel com o urânio, nas condições de pH desse tratamento ($\sim 3,8$).

De qualquer forma, ficou evidenciado nos dois ensaios, a potencialidade do minério frente a técnica da lixiviação bacteriana. Em suma, os ensaios revelaram que existem substratos no minério, que suportam perfeitamente o crescimento bacteriano, e a conseqüente geração de H_2SO_4 e Fe^{3+} , fundamentais no processo de lixiviação. Dessa forma, tais componentes promoveram uma efetiva solubilização do urânio, a qual situou-se ao redor de 60%. A exemplo do ensaio com o minério de Figueira, também detectou-se uma solubilização de molibdênio (cerca de 10%) nos tratamentos biológicos, ao contrário dos testes esterilizados onde essa solubilização foi zero.

Ainda comparando-se o comportamento do minério de Poços de Caldas em relação ao minério de Figueira, vale destacar finalmente, que no caso do primeiro, o consumo de ácido sulfúrico para ajustar o pH, nas condições adequadas para o desenvolvimento bacteriano, foi praticamente nulo e o rendimento de extração de urânio foi extremamente semelhante ($\sim 60\%$ para ambos).

V.4.2. Ensaio em colunas de percolação (laboratório).

Uma vez detectada a potencialidade dos referidos minérios frente a técnica de lixiviação bacteriana, realizou-se os testes de lixiviação estática por percolação em colunas, inicialmente em escala de laboratório. Esses ensaios, objetivaram avaliar a ação bacteriana sobre os referidos minérios, em condições menos favoráveis que aquelas dos testes em frascos agitados e mais próximas (no seu as-

pecto operacional) às de uma operação em larga escala: isto é, lixiviação estática.

A. Minério de Figueira - PR

Na figura 54 são mostradas as curvas de pH (A), Eh (B) e extração de urânio (C) dos tratamentos realizados. As características básicas dessas curvas, são literalmente semelhantes àquelas obtidas nos ensaios em frascos agitados com o mesmo minério, com exceção do rendimento final de extração de urânio.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos "inoculado" e "não inoculado". Em ambos, o pH começa a apresentar uma queda aos 15 dias de teste e, concomitantemente, uma elevação no potencial de oxi-redução, devido a ação oxidativa das bactérias, no substrato sulfetado (pirita) presente na amostra mineral. Devido a granulometria do material utilizado (1/4"), essa ação parece menos intensa que aquela verificada nos experimentos em frascos, pois nestes, trabalhou-se com o minério em granulometria mais fina (inferior a 0,150 mm). Em colunas, o pH final dos tratamentos bacterianos (inoculado e natural) situou-se por volta de 1,8 e em frascos, esse caiu até 1,2, revelando uma maior utilização da pirita, pois na granulometria mais fina, provavelmente esse substrato apresentou-se mais exposto à ação bacteriana.

Como conseqüência, a extração de urânio foi menor nesse tipo de ensaio no período de sua realização (45 dias). Nos tratamentos contendo bactérias ativas, atingiu-se 49 e 45%, respectivamente no "inoculado" e no "não inoculado". Nos testes em frascos, esses rendimentos giraram ao redor de 60% em ambos os tratamentos, exceto no

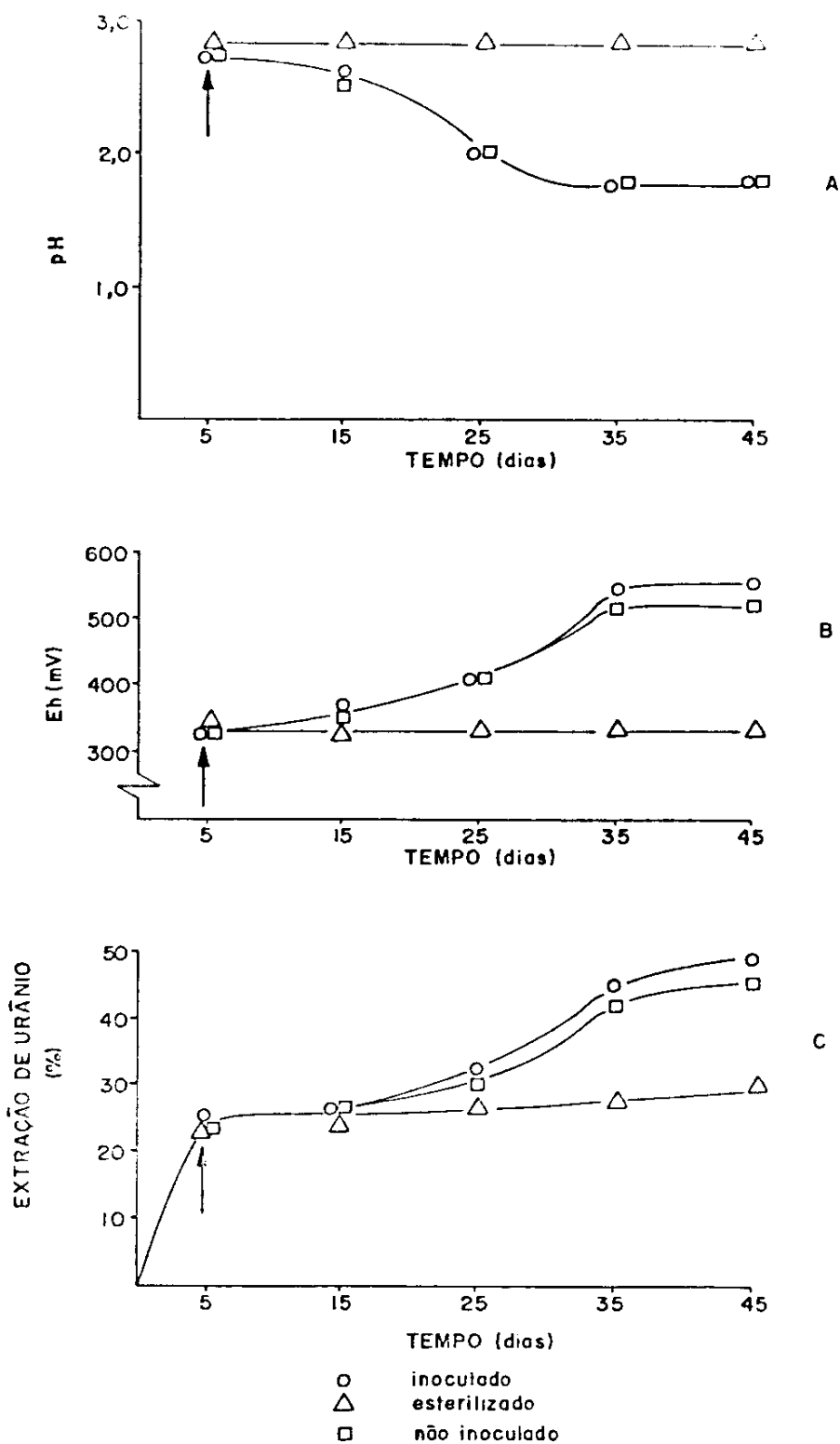


FIGURA 54 - Lixiviação bacteriana em colunas em escala de laboratório, do minério de Figueira - PR. A) pH; B) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio. A seta indica o início dos tratamentos, após a fase de correções ácidas.

"não inoculado" sem adição de meio de cultura. Interessante notar, que nesse caso não houve atividade bacteriana detectável, ao contrário do teste em colunas, que mesmo sem adição do meio de cultura 9K (sem Fe^{2+}), ocorreu atividade bacteriana natural. Talvez devido à granulometria mais grossa, não houve tanta liberação de ganga alcalina. Assim o ácido gerado pela oxidação da pirita pelas bactérias já presentes, não foi efetivamente neutralizado pela ganga alcalina, sobrando dessa forma um excedente que foi então detectado no período do ensaio.

Mais uma vez fica evidenciado pela figura 54, que na ausência de bactérias (tratamento "esterilizado"), não ocorre abaixamento de pH e elevação do Eh. Novamente foi necessária, adição extra de H_2SO_4 para se manter o pH estabilizado em 2,8. Conseqüentemente, a extração do urânio foi significativamente menor (~50%) e obtida praticamente na fase de correções ácidas.

Conforme apresentado em "Materiais e Métodos" (Secção IV 4.5), foi feito também um teste de lixiviação ácida a uma concentração constante de 15 g/l em H_2SO_4 , para se verificar a eficiência de um tratamento mais enérgico (pH < 1,0) na solubilização do urânio. Os resultados finais obtidos neste teste, estão apresentados na tabela 18, juntamente com os resultados finais dos outros tratamentos já discutidos.

Como parâmetros indicativos de atividade bacteriana, destaca-se nos tratamentos "inoculado" e "não inoculado" os valores de pH (1,8) conseguidos devido a essa atividade; os valores de Eh, mais altos nesses tratamentos (560 e 530 mV, respectivamente) em relação aos demais; e as concentrações de Fe^{3+} , também as mais altas nesses dois tratamentos (12,1 e 10,7 g/l, respectivamente).

TABELA 18 - Resultados finais do experimento de lixiviação em colunas de percolação, em escala de laboratório, do minério de Figueira - PR.

TRATAMENTO	TEMPO DO ENSAIO (dias)	pH	Eh	Fe ²⁺ (g/l)	Fe ³⁺ (g/l)	SU ¹ (%)	SM ² (%)	RAM ³ (kg/t)
INOCULADO	45	1,8	560	1,7	12,1	49,0	20,5	17,0 ⁴
NÃO INOCULADO	45	1,8	530	1,7	10,7	45,0	12,8	17,0 ⁴
ESTERILIZADO	45	2,8	330	2,1	0,3	30,3	0	25,3
ÁCIDO ⁵	50	0,9	440	2,7	4,5	63,7	41,2	66,2

1. Solubilização final do urânio.
2. Solubilização final do molibdênio.
3. Relação ácido/minério, em kg de H₂SO₄ consumido por t de minério tratado.
4. Consumo de ácido devido a fase de correção de acidez
5. Solução a 15 g/l em H₂SO₄, mantida constante durante todo o ensaio.

Por outro lado, a lixiviação ácida foi a mais eficiente, no que se refere às extrações de urânio e molibdênio. Conseguiu-se, respectivamente 63,7 e 41,2%, enquanto que o "inoculado" apresentou 49,0 e 20,5%. Entretanto é fundamental observar, que no ataque ácido foram consumidos 66,2 kg de H_2SO_4 /t de minério, enquanto que no bacteriano esse consumo foi de 17,0 kg/t, isto é, cerca de 4 vezes menor. Esse parâmetro (consumo de ácido) é de fundamental importância técnico-econômica, em um empreendimento hidrometalúrgico.

A título comparativo, foi realizado um teste (resultados não mostrados), procurando-se combinar o processo biológico com um ataque químico posterior. A intenção básica foi a de na primeira etapa (bacteriana), ser produzido ácido para consumir o excesso de ganga alcalina, e a de gerar altas concentrações de Fe^{3+} , íon necessário para a oxidação do metal ($U^{+4} \rightarrow U^{+6}$) e a sua conseqüente solubilização. Uma vez determinadas essas condições, o ataque ao minério "preparado", foi realizado com H_2SO_4 à 30 g/l, porém com uma massa menor que no ensaio puramente ácido.

O resultado obtido mostrou-se bastante promissor: os rendimentos de extração do urânio e do molibdênio foram de aproximadamente 60 e 36% respectivamente, porém com um consumo de H_2SO_4 de 32,6 kg/t. Isto é, com metade do consumo de H_2SO_4 , em relação ao teste "Ácido" (tabela 18) no qual foram consumidos 66,2 kg/t, conseguiu-se praticamente os mesmos níveis de extração dos referidos metais com esse processo combinado.

Em função desses resultados, esse procedimento foi adotado nos ensaios em escalas mais ampliadas, conforme será visto nas seções posteriores.

B. Minério de Poços de Caldas - MG

Os resultados do ensaio de lixiviação em colunas de percolação (escala de laboratório) são apresentados na figura 55-A, B e C, respectivamente de pH, Eh e de extração do urânio, nos três tratamentos realizados ("inoculado", "esterilizado" e "não inoculado").

Inicialmente deve-se destacar a característica de "não consumidor de ácido" do minério em discussão. Somente a acidez inicial (pH = 2,8) das soluções lixiviantes das três colunas, foi suficiente para manter o pH nesse valor. Dessa forma, em nenhum dos tratamentos mencionados, foi necessário a adição de H_2SO_4 ao longo do ensaio.

Sem a presença ativa de bactéria (tratamento "esterilizado"), o pH se mantém constante ao redor de 2,8 durante todo o ensaio (figura 55-A). Por outro lado, nota-se um rápida produção de ácido no tratamento "inoculado", pois após 15 dias de teste, o pH da solução decresceu de 2,8 a 1,5. No tratamento "não inoculado", também pode-se observar uma progressiva, porém mais lenta, atividade bacteriana de oxidação da pirita, conforme indicado pelo abaixamento do pH.

Em conseqüência dessa atividade oxidativa, o potencial de oxi-redução (figura 55-B) desses tratamentos começa a se elevar. Da mesma forma que na curva de pH, essa elevação é muito mais rápida no tratamento "inoculado" do que no "não inoculado". O Eh do tratamento "esterilizado", como era esperado, se mantém estável em torno de 340 mV. Nos outros, o Eh das soluções atinge cerca de 600 e 540 mV, respectivamente no "inoculado" e "não inoculado". Conforme foi discutido anteriormente, essa elevação decorre do aumento da conccentração de Fe^{3+} em solução, devido à oxidação bacteriana da pirit

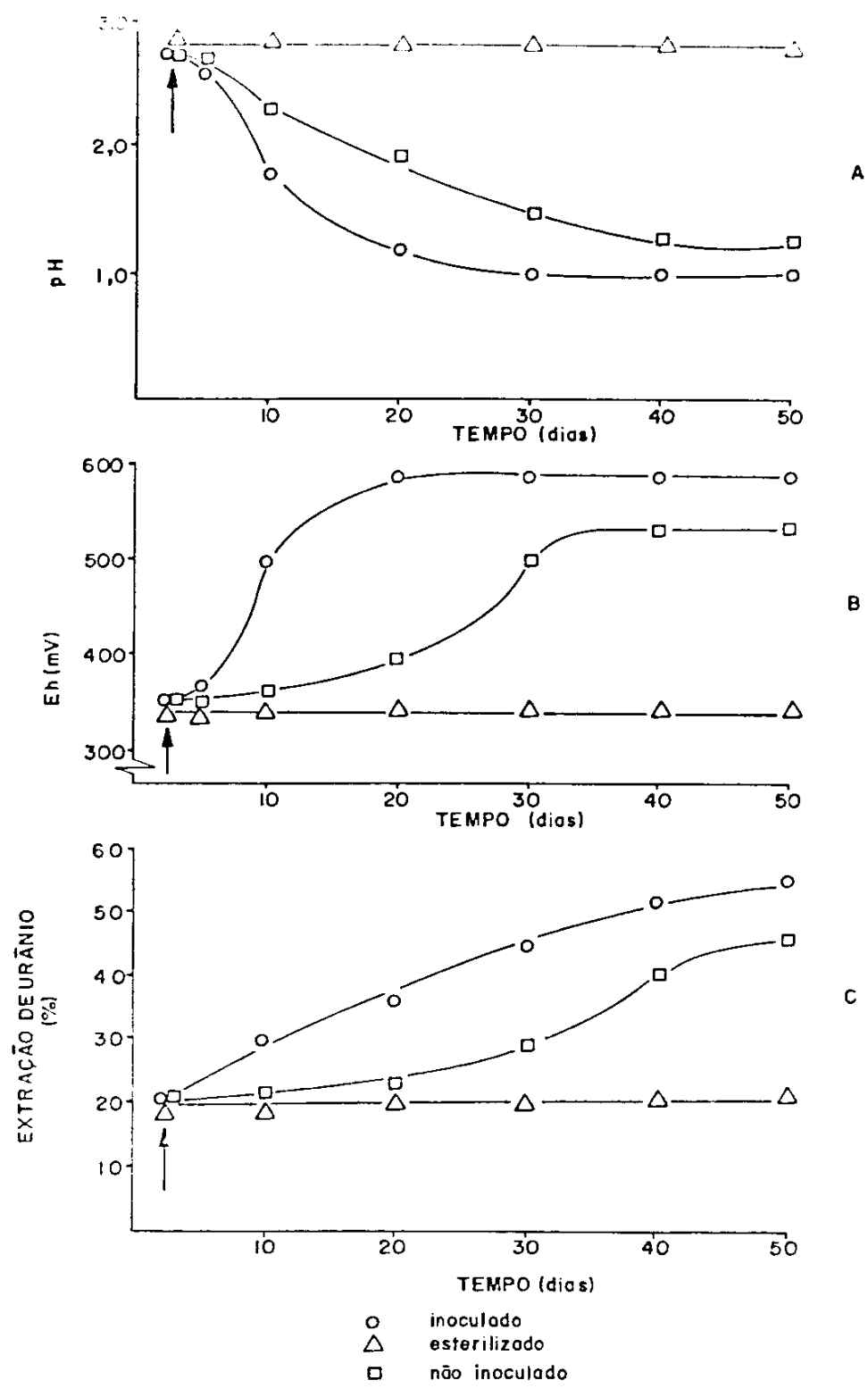


FIGURA 55 - Lixiviação em colunas de percolação do minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG. A) pH; B) potencial de oxi-redução; C) extração do urânio. A seta indica o início dos tratamentos.

ta (FeS_2). No tratamento "inoculado", a concentração de Fe^{3+} no final do ensaio foi de cerca de 20 g/l, enquanto que no "não inoculado" foi de 12 g/l. Mais uma vez, praticamente não se detectou Fe^{3+} no tratamento "esterilizado".

Em função da produção biológica de ácido e Fe^{3+} , o urânio passa ser solubilizado de forma efetiva nos dois tratamentos bacterianos ("inoculado" e "natural"). Após uma solubilização inicial de 20%, obtida pela percolação das soluções ácidas dos três tratamentos, não mais se observa variação desse rendimento no "esterilizado" (figura 55-C). Por outro lado, nota-se pela mesma figura, uma vantagem do tratamento "inoculado" em relação ao "não inoculado", e de ambos em relação ao "esterilizado", pois após 50 dias de ensaio, atingiu-se 55 e 46% de extração, respectivamente.

A exemplo do ensaio com o minério uranífero de Figueira, também foi realizado um teste de lixiviação ácida, utilizando-se uma solução sulfúrica com uma concentração constante de H_2SO_4 de 15 g/l (pH < 1,0). Nesse ensaio conseguiu-se 41% de solubilização de urânio com um consumo de 6 kg/t. Como o rendimento situou-se bem abaixo da extração verificada no tratamento "inoculado" (55% sem consumo de ácido), realizou-se um novo teste utilizando-se uma solução ácida mais concentrada: 30 g/l. Paralelamente, realizou-se também um novo ataque na coluna "não inoculada", corrigindo-se a acidez da solução utilizada no teste para 30 g/l. Procurou-se aproveitar as características positivas dessa solução, no que se refere à concentração de Fe^{3+} (~ 12 g/l).

Os resultados finais de extração de urânio desses dois testes foram de aproximadamente 60% em ambos, porém com um consumo adicional de ácido ao redor de 20 kg/t. Obviamente, o teste "inoculado" foi aquele que apresentou os melhores resultados, pois sem nenhuma

adição de H_2SO_4 , obteve-se 55% de extração do urânio. Além disso, a extração de molibdênio foi de 32% nesse teste, enquanto que nos outros dois após os ataques ácidos complementares, o rendimento foi de 20% no tratamento químico e 28% na coluna "não inoculada".

De qualquer forma, os resultados revelam que dependendo dos rendimentos de extração de urânio (e molibdênio) numa fase preliminar bacteriana, o ataque ácido complementar pode ser um procedimento eficiente para elevar esses rendimentos para esse tipo de minério.

V.4.3. Ensaios em colunas de percolação (semipiloto)

Uma vez demonstrada em laboratório a potencialidade dos respectivos minérios frente a ação lixiviadora bacteriana, tanto nos ensaios em frascos agitados como também em colunas de percolação, e frente à técnica de lixiviação estática (ensaio em coluna), fundamental em termos de uma aplicação em condições de campo, iniciou-se a fase seguinte do desenvolvimento experimental do processo biometalúrgico: lixiviação estática ainda em colunas de percolação, porém em escala semipiloto.

Procurou-se nesses ensaios estudar e definir, fundamentalmente, condições operacionais de processo objetivando orientar, pelo menos de forma adequada, as operações em escala piloto realizadas posteriormente.

Para isso, além dos resultados obtidos sobretudo nos ensaios em colunas, também foram de fundamental importância as observações pessoais sobre o comportamento dos minérios estocados nos próprios locais das minas, no que se refere à suas características quan-

to a uma intemperização natural. No caso do minério de Figueira, por exemplo, observou-se que após um período não muito longo (3 - 4 meses), o mesmo começa a se fragmentar com certa facilidade em função de sua exposição ao tempo, à própria ação bacteriana e a sua composição mineralógica. Já o minério de Poços de Caldas, apresentou-se menos passível dessa ação, pois o mesmo tem uma característica mais "rochosa".

Além disso, considerou-se ainda as facilidades existentes nos locais das minas: enquanto que na unidade de Poços de Caldas existiam condições completas para uma eventual britagem do minério, visto que na época já estava em operação a unidade industrial de lixiviação convencional do urânio, em Figueira essa condição era inexistente. Assim, o planejamento dos ensaios nessa escala semipiloto, foi feito em função dessas observações.

A. Minério de Figueira - PR

Conforme apresentado na seção IV.4.4., utilizou-se uma amostra de minério (~2700 kg) com granulometria "run of mine", isto é, de tamanho natural após a lavra do minério, em função do acima exposto. A condição básica de processo, foi definida a partir dos resultados dos testes em colunas de laboratório, envolvendo uma fase de ajuste de acidez, uma fase de atividade bacteriana propriamente dita e uma fase final de ataque sulfúrico complementar, subdividida em várias etapas. Essas etapas foram estabelecidas, objetivando produzir "lixívias" adequadas a um processo posterior de extração do urânio das soluções, por solventes orgânicos: pH \leq 1,5 e concentração de urânio de 0,3 a 0,6 g/l.

A tabela 19 mostra os resultados obtidos nessa operação em escala semipiloto. Inicialmente deve-se destacar, que o período de trabalho foi muito mais longo que os experimentos em colunas em escala de laboratório. Além da granulometria do material, ser muito maior que aquela da amostra utilizada nos ensaios em colunas, o que inevitavelmente determina uma cinética de extração mais lenta, outros fatores que determinaram esse longo período de trabalho, foram as inúmeras paradas na operação para avaliação do processo e para as necessárias manutenções nos equipamentos e instalações utilizadas. Além disso, prolongou-se o término de uma fase ou etapa, no sentido de se obter uma segura estabilização dos parâmetros em avaliação. Assim, por exemplo, quando a concentração de urânio em solução se estabilizava em uma determinada fase, esperava-se 5 a 10 dias para se iniciar a próxima. Todos esses fatores contribuíram para um tempo de 255 dias, o qual em condições normais, poderia ser reduzido para menos da metade (~100 dias).

Analisando-se os resultados da tabela 19, nota-se algumas diferenças fundamentais entre essa escala e a escala de laboratório. Houve um baixo consumo de ácido para se ajustar o pH em torno de 3,0. Enquanto que em escala de laboratório (granulometria inferior a 1/4") gastou-se 17 kg/t nessa fase de ajuste (ver tabela 18), em escala semipiloto (granulometria "run of mine") gastou-se apenas 1,5 kg/t. Entretanto, na primeira obteve-se cerca de 25% de solubilização de urânio e nesta última nenhuma solubilização foi detectada. Seguramente, a granulometria dos materiais teve uma influência decisiva nos diferentes resultados observados.

Após a estabilização do pH em aproximadamente 3,0, iniciou-se a fase bacteriana no processo. Ainda pela tabela 19, pode-se observar que se inicia (ou se acentua), o processo oxidativo bacteriano sobre a pirita, pois gradativamente o pH decresce e o Eh da solu

TABELA 19 - Resultados do ensaio de lixiviação em coluna de percolação em escala semipiloto, do minério de Figueira - PR.

FASE OPERACIONAL	DIA ¹	pH ²	Eh ² (mV)	Fe ²⁺ (g/l)	Fe ³⁺ (g/l)	SU ³ (%)	SMo ⁴ (%)	RAM ⁵ (kg/t)
Correções Ácidas	10	6,8	160	ND	ND	-	-	-
	20	6,4	230	ND	ND	-	-	-
	30	4,2	460	ND	ND	-	-	-
	40	3,8	460	ND	ND	-	-	-
	50	3,5	490	ND	ND	-	-	-
	58	3,0	500	ND	ND	ND	ND	1,5
Bacteriana	64	3,0	630	ND	1,2	-	-	-
	74	2,5	640	ND	1,8	-	-	-
	84	2,8	670	ND	2,6	-	-	-
	94	1,8	670	ND	3,1	1,7	-	-
ETAPAS								
1	120	1,6	660	0,7	27,1	-	-	6,4
2	156	1,6	650	0,8	23,8	-	-	5,1
3	202	1,5	650	0,8	23,5	-	-	2,5
Ataque 4	217	0,9	640	0,9	20,0	-	-	7,4
Ácido 5	223	0,8	630	0,8	14,6	-	-	2,0
6	239	0,9	640	0,5	12,1	-	-	-
7	255	0,9	640	0,3	10,3	-	-	3,1
FINAL	-	-	-	-	-	48,8	26,3	28,0

1. Dias após o início
2. Valores de pH e Eh ao final de cada período
3. Solubilização do urânio
4. Solubilização do molibdênio
5. Relação ácido/minério, em kg de H₂SO₄ consumido por t de minério tratado.

ção lixiviante aumenta, em decorrência do aparecimento de Fe^{3+} em solução; após 30 dias o pH, o Eh e a concentração de Fe^{3+} (não se detecta Fe^{2+}), estabilizam-se em 1,8, 670 mV e 3,1 g/l respectivamente.

Mesmo detectando-se a atividade bacteriana pelos critérios citados, ou ainda por testes de viabilidade realizados paralelamente, a solubilização do urânio foi extremamente baixa (cerca de 2%) e a do molibdênio não foi detectada. Como já discutido, em uma granulometria mais reduzida, a solubilização do urânio atingiu 45% após essa fase bacteriana, no ensaio em escala de laboratório (tabela 18).

Os resultados obtidos na fase seguinte do processo (ataque ácido), mostrados também na tabela 19, evidenciam que essa sistemática adotada foi de fato, eficiente.

Iniciou-se essa fase de ataque ácido, corrigindo-se a acidez da solução obtida na fase bacteriana para cerca de 1 molar em H_2SO_4 (~96 g/l). Essa alta concentração de ácido sulfúrico (pH ~0) associada à "preparação" bacteriana do minério (notou-se claramente uma decomposição dos blocos de minério, conforme já destacado determinaram em poucos dias, uma rápida solubilização do metal: obteve-se em apenas 5 dias cerca de 10% de extração (resultado não mostrado).

Pela tabela 19, pode-se notar que ao término dessa primeira etapa de ataque ácido, o pH sobe até se estabilizar em 1,6, mostrando que houve efetivamente um consumo de ácido para "abrir" definitivamente o minério. A concentração de Fe^{3+} se eleva ao final dessa etapa à 27,1 g/l e o Fe^{2+} não foi detectado. Essa alta concentração de Fe^{3+} indica de forma clara a ação prévia do *T. ferrooxidans* na pirita presente no minério. Se não ocorresse a oxidação bacteriana

na da pirita, o máximo que poderia ser obtido com o ataque ácido, seria uma alta concentração de ferro, porém na forma de Fe^{2+} .

Após a estabilização do pH e da concentração de Fe^{3+} e urânio em solução, iniciou-se uma nova etapa de ataque ácido, utilizando-se uma nova solução sulfúrica a 35 g/l (ver a tabela 5 na seção IV.4.4.). Novamente obteve-se resultados semelhantes aos da etapa anterior. A solubilização acumulada do urânio passou a aproximadamente 20% e a do molibdênio atingiu cerca de 10%. Nota-se que a concentração de Fe^{3+} ainda é alta, porém apresentando tendência a diminuir; o consumo de ácido começou a diminuir, pois com uma concentração cerca de 3 vezes menor em relação a etapa anterior (96 g/l e 35 g/l, na 1ª e na 2ª respectivamente), o pH ao final da etapa estabilizou-se em 1,6, o mesmo da 1ª etapa.

Na 3ª etapa de ataque, utilizou-se a mesma solução da etapa nº 2, após a extração do urânio e do molibdênio da solução. Essa reciclagem da solução lixiviante foi feita, objetivando-se avaliar a eficiência desse procedimento em termos de presença ativa das bactérias: no processo de extração, são usados agentes orgânicos (querosene + tridecanol + aminaterciária) que a princípio poderiam inativizar as bactérias presentes. Entretanto, testes positivos de viabilidade bacteriana após esse processo, revelaram que não houve problemas significativos com a exposição dos microorganismos a esses agentes extratantes.

TORMA & ITZKOVITCH (1977), obtiveram alguma inibição da atividade do *T. ferrooxidans* com o mesmo tipo de solvente orgânico: entretanto esse estudo foi feito em experimentos respirométricos, onde a suspensão celular foi exposta constantemente ao solvente, no meio de reação da oxidação da pirita, que não é o caso do teste apresentado. Nesse, após a contactação da lixívia (contendo o urânio e as

bactérias) com o solvente orgânico por um curto período (alguns minutos), ocorre a separação das fases; o urânio passa à fase orgânica (é extraído) e as bactérias, em sua maioria (observação microscópica), permanecem na fase aquosa (lixívia sem urânio). Dessa fase aquosa, retirou-se uma alíquota e realizou-se o teste de viabilidade: como já salientado o resultado foi positivo, isto é, houve oxidação completa do meio de cultura "9K", em período semelhante a um controle realizado com inóculo não exposto ao solvente orgânico.

Voltando à 3ª etapa de ataque (tabela 19), a solução reciclada da etapa 2, após o ajuste de acidez também para 35 g/l, apresentou uma eficiência semelhante às soluções das etapas anteriores. Atingiu-se cerca de 30% de extração de urânio e 14% do molibdênio. A concentração de Fe^{3+} permaneceu praticamente no mesmo nível da 2ª etapa (~ 23 g/l) e o pH estabilizou-se na mesma faixa (1,5).

A partir da 4ª etapa, nota-se ainda pela tabela 19, que o consumo de ácido diminui consideravelmente, pois o pH dessas etapas finais manteve-se sempre abaixo de 1,0. A concentração de Fe^{3+} diminuiu progressivamente até 10,3 g/l (etapa 7) e os rendimentos finais de extração do urânio e do molibdênio foram de 48,8 e 26,3%, respectivamente. Tais rendimentos foram obtidos com um consumo total de ácido sulfúrico de 28 kg/t.

Como se recorda, no experimento de lixiviação em colunas em escala de laboratório, obteve-se cerca de 60% e 36% de extração de urânio e molibdênio respectivamente, na coluna "inoculada", após um ataque ácido posterior que consumiu cerca de 33 kg de H_2SO_4 /t de minério. Assim, pode-se considerar que os resultados obtidos em escala semipiloto, com uma diferença de consumo de ácido de 6 kg/t, são próximos aos da escala de laboratório. Salienta-se ainda, que na 7ª etapa de ataque, o rendimento de extração de urânio foi de 6%,

indicando que se novos ataques fossem realizados, a extração total poderia se elevar acima dos 50%. Objetivando-se avaliar essa tendência, realizou-se na coluna semipiloto, após seu encerramento operacional, o seguinte teste: percolou-se uma solução ácida (pH 2,0) pelo minério ainda mantido na coluna (≈3 meses após a paralisação do ensaio operacional) sem reciclagem do efluente. Essa simples "lavagem" do minério após esse período de estocagem, extraiu novamente cerca de 6% de urânio. Assim, a tendência de se atingir os mesmos níveis de extração de urânio e molibdênio, nessa granulometria bem mais elevada que aquela dos ensaios de laboratório, foi confirmada.

B. Minério de Poços de Caldas - MG

Em função do que foi mencionado, no início da discussão sobre os ensaios em colunas em escala semipiloto (características mineralógicas das amostras minerais, facilidades para britagem dos minérios, etc...) e, também, de um teste preliminar semipiloto com 2,5 t de minério com granulometria "run of mine" no qual obteve-se uma extração de urânio de 17% (bem abaixo dos valores alcançados em laboratório), objetivou-se fundamentalmente nesse ensaio com o minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas, avaliar o efeito da granulometria na solubilização do urânio e do molibdênio, bem como a eficiência do ataque ácido complementar (após a etapa bacteriana), em concentrações crescentes de H_2SO_4 : 10, 30, 50 e 100 g/l.

A tabela 20 mostra de forma resumida, os resultados obtidos no teste realizado. Da mesma forma que nos ensaios em escala de laboratório, não houve necessidade de adição de ácido para ajustar o pH em torno de 3,0. Nas três granulometrias testadas (<5", <2" e

TABELA 20 - Resultados do ensaio de lixiviação em colunas de percolação em escala semipiloto, do minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG

COLUNA	FASE OPERACIONAL	DIA ¹	pH ²	Eh ² (mV)	SU ³ (%)	SMo ⁴ (%)	RAM ⁵ (kg/t)
1 (<5")	bacteriana	50	1,4	620	31,2	10,6	0
	ataque ácido ⁶ - 1	55	-	-	31,2	12,9	1,8
	ataque ácido - 2	58	-	-	31,2	14,6	7,1
	ataque ácido - 3	68	-	-	34,9	21,1	12,0
	ataque ácido - 4	73	-	-	39,6	21,2	24,3
2 (<2")	bacteriana	50	1,2	640	41,9	17,0	0
	ataque ácido - 1	55	-	-	41,9	21,4	1,8
	ataque ácido - 2	58	-	-	41,9	21,9	7,1
	ataque ácido - 3	68	-	-	45,0	28,8	12,0
	ataque ácido - 4	73	-	-	54,9	28,8	24,3
3 (<1/2")	bacteriana	50	1,2	590	37,3	11,1	0
	ataque ácido - 1	55	-	-	37,3	13,6	1,8
	ataque ácido - 2	58	-	-	37,3	14,7	7,1
	ataque ácido - 3	68	-	-	40,0	23,4	12,0
	ataque ácido - 4	73	-	-	50,0	26,9	24,3

1. Dias após o início

2. Valores de pH e Eh ao final da fase bacteriana

3. Solubilização do urânio acumulada

4. Solubilização do molibdênio acumulada

5. Relação ácido/minério acumulada, em kg de H₂SO₄ consumido por t de minério tratado.

6. Etapas da fase de ataque ácido: 1) 10 g/l; 2) 30 g/l; 3) 50 g/l; 4) 100 g/l.

<1/2"), somente a atividade oxidativa bacteriana, foi suficiente para produzir ácido e determinar um abaixamento do pH para 1,4, 1,2 e 1,2 respectivamente.

Paralelamente, e em decorrência da oxidação da pirita, as concentrações de Fe^{3+} ao final dessa fase do ensaio, atingiram aproximadamente 12 g/l nas granulometrias <2" e <1/2" e 8 g/l na de <5". Nessa fase bacteriana, obteve-se rendimentos de extração de urânio de 31,2%, 41,9% e 37,3% nas colunas 1 (<5"), 2 (<2") e 3 (<1/2") e de molibdênio de 10,6%, 17,0% e 11,1% respectivamente. Nota-se que na coluna 2 (<2"), ocorreram as melhores extrações, tanto de urânio como de molibdênio. Em relação a coluna 1 (<5"), pode-se relacionar esse melhor resultado à menor granulometria do teste, em comparação ao teste preliminar, com minério de granulometria "run of mine".

Entretanto, em relação à coluna 3 (<1/2") os resultados inferiores desta, se comparados com as da coluna 2 (<2"), parecem contradizer o efeito da granulometria. Uma possível explicação para o fato, seria um exagerado "empacotamento" do minério numa coluna de diâmetro de 0,4 m (ver tabela 6 na seção IV.4.4), fenômeno menos provável de ocorrer com uma granulometria maior. Em escala de laboratório, utilizando-se minério de granulometria <1/4" (menor ainda que o da coluna 2), esse possível efeito não foi observado (as extrações foram altas), pois as colunas utilizadas tinham diâmetro de 7,5 cm, isto é, muito mais reduzido que o da coluna em discussão. Esse possível "empacotamento", pode bloquear o acesso mais efetivo da solução lixiviante às partículas minerais contendo os metais, determinando assim, um menor rendimento.

De qualquer forma, novamente a ação bacteriana na produção de ácido e de Fe^{3+} foi constatada nas três granulometrias avaliadas. Após a fase bacteriana, iniciou-se as quatro etapas de ataque

ácido, as quais foram encerradas sempre quando o teor dos metais em solução se estabilizavam. Não houve utilização de soluções novas, sendo que acidez de cada etapa foi corrigida na própria solução da etapa anterior. Na tabela 20 não são apresentados os valores de pH e Eh ao final de cada etapa, pois no caso do pH, este manteve-se abaixo de 1,0 e o Eh acima de 600 mV, em todas as etapas de ataque ácido.

Com relação a eficiência das concentrações de ácido utilizadas, pode-se observar (tabela 20) que 10 g/l e 30 g/l, pouco ou nenhum significado tiveram, em termos de aumento na solubilização de urânio e molibdênio nessa escala de trabalho. Entretanto, a partir de 50 g/l, todas as granulometrias mostram respostas positivas, sendo que a 100 g/l esse efeito é mais acentuado.

Na coluna 1 (<5"), a solubilização do urânio e do molibdênio passa de 31,2 e 10,6% respectivamente, para 39,6 e 21,2%. Na coluna 2 (<2") esses valores saltam de 41,9 e 17,0% para 54,9 e 28,8% e na coluna 3 (<1/2") de 37,3 e 11,1% para 50,0 e 26,9%. Pode-se observar, que os resultados finais das colunas 2 e 3 estão bem próximos e significativamente maiores que os da coluna 1.

Os consumos de ácido sulfúrico indicados na tabela 20, mostram que é necessário um gasto bem significativo (~25 kg/t), para um aumento relativamente pequeno nas extrações de urânio. No caso do molibdênio essa elevação é mais acentuada.

Comparando-se os resultados dos ensaios em escala semipiloto do minério de Poços de Caldas com o de Figueira, pode-se constatar comportamentos bem distintos em relação à metodologia empregada. Enquanto que no primeiro, a fase bacteriana promove a solubilização do urânio de forma significativa (~30% na coluna 1, por exemplo), no segundo essa solubilização é insignificante (~2%). Por outro lado, enquanto que no segundo o ataque ácido é muito eficien-

te (~50% de solubilização do urânio), no primeiro essa eficiência é bem menos acentuada (de 30%, eleva-se a ~40%). Ignorando-se todas as considerações possíveis de se fazer sobre a viabilidade técnico-econômica de uma operação industrial, poder-se-ia dizer, que sob o ponto de vista biometalúrgico, o minério de Poços de Caldas apresentou-se nessa escala de trabalho, com uma potencialidade mais significativa, pois de fato, ocorre uma significativa solubilização do urânio somente devido a ação bacteriana.

V.4.4. Ensaios em pilhas de lixiviação (piloto)

Após a realização de todos os ensaios de laboratório e a obtenção de informações de processo operacional, através dos estudos em escala semipiloto, os quais evidenciaram a potencialidade da aplicação da biometalurgia para os dois tipos de minérios de urânio, decidiu-se pela realização dos testes em escala piloto.

Utilizou-se a técnica de lixiviação estática em pilhas, de tal forma a se aproximar definitivamente de uma possível operação industrial, pois tal metodologia com suas variantes ("dump" ou "heap", conforme discutido na parte introdutória desse trabalho), é ainda hoje a alternativa básica para a recuperação de metais de minérios de baixos teores, com ou sem participação bacteriana no processo.

A exemplo dos testes apresentados anteriormente, os resultados obtidos nessas operações, serão apresentados separadamente para cada minério estudado, pois conforme ficou demonstrado, cada um apresenta um comportamento específico frente ao processo biometalúrgico.

A. Minério de Figueira - PR

Conforme mencionado em "Materiais e Métodos" (IV.4.5), os resultados que aqui serão apresentados, referem-se ao terceiro teste realizado, uma vez que nos dois primeiros, objetivou-se fundamentalmente estudar e compreender de forma adequada, a sistemática operacional com seus problemas inerentes a uma operação nessa escala.

Enquanto nesses dois primeiros foi utilizado material proveniente da abertura das galerias da mina, os quais estavam estocados por um longo período (3-4 anos), e por isso mesmo, altamente intemperizados, no terceiro teste utilizou-se o minério de urânio propriamente dito.

Algumas diferenças fundamentais, em relação ao comportamento do minério nessa escala e aquele verificado no teste em escala semipiloto puderam ser constatadas, lembrando que a amostra de minério estudada, foi exatamente a mesma nos dois tipos de teste.

Pode-se observar tais diferenças, sobretudo em relação à primeira fase da operação, examinando-se os resultados que estão sumariados na tabela 21.

A solução inicial de percolação pela pilha, foi obtida nos dois testes pré-operacionais anteriores. Dessa forma, a mesma já apresentava características de um "inóculo" bacteriano, conforme comprovado em testes de viabilidade realizados previamente. Durante os primeiros 10 dias de operação, quando se esperava uma elevação no pH para se realizar as correções ácidas, conforme ocorrido no teste semipiloto, ocorreu, ao contrário, uma atividade bacteriana detectável. O pH decresceu e o teor de Fe^{3+} em solução elevou-se de 0,3 g/l para 2,2 g/l. Essa tendência foi mantida durante os 35 dias dessa fase, a qual foi considerada encerrada quando o pH se estabi-

TABELA 21 - Resultados do ensaio de lixiviação estática em pilha em escala piloto, do minério de Figueira - PR.

FASE OPERACIONAL	DIA ¹	pH ²	Eh ² (mV)	Fe ²⁺ (g/l)	Fe ³⁺ (g/l)	SU ³ (%)	SMo ⁴ (%)	RAM ⁵ (kg/t)
Bacteriana	0	2,5	540	ND	0,3	-	-	-
	10	2,3	560	0,2	2,2	-	-	-
	20	2,2	580	0,1	2,3	-	-	-
	30	2,0	720	ND	5,1	-	-	-
	35	1,8	730	ND	5,2	7,7	ND	0
ETAPAS ⁶								
Ataque Ácido	1	42	1,5	540	0,7	14,1	-	-
	2	50	1,3	510	1,1	10,2	-	-
	3	65	1,2	510	1,2	9,8	-	-
	4	75	0,9	510	1,0	6,5	-	-
	5	83	0,8	510	0,9	6,3	-	-
Final	-	-	-	-	-	51,5	23,9	32,4

1. Dias após o início do teste
 2. Valores de pH e Eh ao final de cada período
 3. Solubilização do urânio
 4. Solubilização do molibdênio
 5. Relação ácido/minério em kg de H₂SO₄ consumido por t de minério tratado.
 6. As características de cada solução de ataque ácido estão mostradas na tabela 7.
- ND. Não detectado

lizou em 1,8 e o teor de urânio em solução não mais variou durante 3 a 4 dias. O teor de Fe^{3+} ao final dessa fase atingiu 5,2 g/l, resultado esse superior ao obtido na fase bacteriana do ensaio semipiloto ($\sim 3,0$ g/l). Destaca-se ainda, que sem a necessidade de uma fase de correção de acidez, atingiu-se uma solubilização de urânio de cerca de 8%, enquanto que, no ensaio semipiloto esse valor situou-se em 1,7%.

Uma possível explicação para essas diferenças, foi o tempo necessário para a montagem da pilha no pátio de lixiviação e a exposição constante do minério, no ambiente já contendo bactérias das operações anteriores. Nos ensaios de laboratório e escala semipiloto, as amostras de minério foram utilizadas logo após a retirada das mesmas da mina. Por outro lado, para a retirada do minério, sua deposição no pátio e montagem em uma pilha e a preparação do sistema operacional para a realização do ensaio piloto, foram necessários cerca de 90 dias, devido às limitações inerentes ao local da operação. Esse tempo de exposição nesse local já "contaminado" com *T. ferrooxidans*, propiciou a atividade oxidativa da espécie sobre o minério.

A fase seguinte do processo, obedeceu ao objetivo inicial preestabelecido, de alimentar a unidade de extração do urânio por solventes orgânicos, com soluções contendo concentrações adequadas do elemento (0,3 a 0,6 g/l) e em um $\text{pH} \leq 1,5$.

Em linhas gerais, essa fase de ataque ácido apresentou resultados bem semelhantes aos obtidos em escala semipiloto, porém em tempo mais reduzido (~ 40 dias). No ensaio piloto, também ocorreram paradas operacionais para manutenção do sistema. Entretanto, tais paradas não prejudicaram o processo contínuo de extração do urânio, pois as soluções produzidas dentro dos parâmetros citados (pH e con

centração de urânio), foram sendo estocadas nos tanques disponíveis (ver seção IV.5.1).

Pela tabela 21 pode-se constatar que ao final do ensaio, obteve-se 51,3% de extração de urânio e 23,9% de extração de molibdênio, com um consumo total de ácido sulfúrico de 32,4 kg/t. Esses resultados estão extremamente coerentes com os resultados alcançados na escala semipiloto.

Deve-se ressaltar, que mesmo após a paralisação do processo operacional, continuou ocorrendo atividade bacteriana no minério. A pilha já processada, permaneceu estocada no pátio de lixiviação por um longo período após o término dos trabalhos (~2 anos). Durante esse período, as águas de chuvas que percolaram pelo minério, foram recolhidas nas bacias de captação, como medida preventiva de controle ambiental. As análises periódicas desses efluentes, sempre revelaram um pH inferior a 2,0 e sempre apresentaram uma concentração de urânio significativa.

Isso indica que, de fato, o rendimento de extração de urânio desse minério é potencialmente maior que aquele obtido durante a operação. Assim, imaginando-se uma escala de produção, os lotes de minérios já processados em pilhas operacionais de lixiviação, seriam estocados em condições adequadas, de tal forma a continuarem produzindo soluções contendo bactérias, acidez e urânio e molibdênio solubilizados. Essas soluções naturalmente produzidas (por chuvas), ou ainda por irrigações periódicas com os efluentes provenientes do processo de extração, seriam estocadas em bacias, não só para iniciarem o processo em outra pilha nova e aumentarem os rendimentos do processo, mas também como uma sistemática de controle ambiental.

B. Minério de Poços de Caldas - MG.

Devido às características desse tipo de minério, já discutidas, e da mesma forma que nos testes em escala semipiloto, a fase de correções ácidas, foi também desnecessária no teste de lixiação em pilha.

Como pode ser visto pela tabela 22, ocorreu uma rápida atividade bacteriana, pois em apenas 16 dias o pH atingiu 1,7 e o Eh 580 mV. Nessa fase, a concentração de Fe^{3+} alcançou 7 g/l e a de Fe^{2+} 0,35 g/l (resultados não mostrados). Em função dessa atividade bacteriana, a solubilização de urânio foi de 5% e a de molibdênio de 4%.

Esses resultados obtidos com uma granulometria "run of mine", em comparação com aqueles obtidos nos testes em escala semipiloto, já demonstram claramente o efeito da granulometria nos rendimentos de extração dos metais. Tomando como exemplo os resultados obtidos na coluna com o minério abaixo de 2" (coluna 2, tabela 20), onde na mesma fase obteve-se 41,9% e 17,0% de solubilização de urânio e molibdênio, respectivamente, esse efeito fica bem caracterizado.

Durante a 1ª etapa de ataque ácido, (solução a 18 g/l), pode-se notar ainda pela tabela 22, que nenhuma elevação nos rendimentos de extração dos metais foi constatada. O pH permaneceu baixo ($\sim 0,7$), indicando mais uma vez que ocorre pouco consumo de ácido por esse minério. Foi detectada uma elevação na concentração do Fe^{3+} (9,0 g/l), sem entretanto alterar significativamente o Eh da solução lixiviante. Essa ineficiência de soluções de concentrações mais baixas em H_2SO_4 , foi também constatada no ensaio semipiloto, onde um ataque com solução a 30 g/l também não promoveu aumentos de extração de urânio (tabela 20).

TABELA 22 - Resultados do ensaio de lixiviação estática em pilha em escala piloto, do minério de baixo teor de urânio de Poços de Caldas - MG.

FASE OPERACIONAL	DIA ¹	pH ²	Eh ² (mV)	SU ³ (%)	SMO ⁴ (%)	RAM ⁵ (kg/t)	
Bacteriana	16	1,7	580	15,0	4,0	0	
	ETAPAS ⁶						
	1	26	0,7	560	15,0	4,0	3,2
Ataque	2	38	0,3	480	18,0	9,0	8,7
Ácido	3	48	0,3	460	27,0	13,0	16,5
	4	58	0	450	27,0	13,0	12,3
	FINAL	-	-	-	27,0	13,0	33,3

1. Dias após o início do teste
2. Valores de pH e Eh ao final de cada período
3. Solubilização do urânio acumulada
4. Solubilização do molibdênio acumulada
5. Relação ácido/minério de cada etapa, em kg de H₂SO₄ consumido por t de minério tratado.
6. As características de cada solução de ataque ácido estão mostradas na tabela 8.

A solução ácida a ~ 50 g/l utilizada na 2^a etapa de ataque ácido, apresentou uma pequena eficiência em termos de elevar as extrações dos metais, pois a solubilização do urânio passou de 15 a 18% e a de molibdênio de 4,0 a 9%. Entretanto foi na 3^a etapa (~ 100 g/l em H_2SO_4) que se observou a maior eficiência, sobretudo em relação ao rendimento de extração de urânio, pois esse passou dos 18% observados nas etapas anteriores para 27% (tabela 22).

Um fato interessante constatado nessas duas etapas (2^a e 3^a), foi a queda no Eh da solução lixiviante. Enquanto que na fase bacteriana e na 1^a etapa de ataque ácido o potencial de oxi-redução permaneceu acima de 550 mV, nas etapas subseqüentes o Eh caiu para 480 e 460 mV, respectivamente na 2^a e 3^a etapa, como pode ser observado pela tabela 22.

Nessas duas etapas, o pH das soluções permaneceu extremamente baixo ($\sim 0,3$). Constatou-se uma elevação significativa na concentração de Fe^{2+} em solução e uma diminuição na concentração de Fe^{3+} (resultados não mostrados). Na fase bacteriana, por exemplo, esses valores foram ao final da fase de 0,35 e 7,0 g/l respectivamente. Na 3^a etapa de ataque (solução a ~ 100 g/l) essas concentrações finais de Fe^{2+} e Fe^{3+} situaram-se em 3,3 e 4,6 g/l, respectivamente.

Independente do fato de ter ocorrido uma elevação na extração do urânio, provavelmente devido a uma abertura enérgica dos minerais contendo o urânio, essa elevação na concentração de Fe^{2+} , revela que houve uma paralisação na atividade oxidativa bacteriana. Seguramente essa inativação foi causada pela excessiva acidez da solução (pH $\sim 0,3$). Como já discutido e também mostrado nos experimentos de respirometria, a faixa ideal de pH ótimo para a oxidação do Fe^{2+} pelo *T. ferrooxidans*, situa-se entre 1,5 a 3,0.

O tratamento efetuado na 4^a etapa de ataque ácido (solução a 300 g/l) não apresentou nenhum efeito positivo na extração do urânio. De qualquer forma, esse ataque foi realizado objetivando-se verificar se essa alta concentração de ácido promoveria uma abertura mais drástica que aquela com 100 g/l, causando uma nova liberação de urânio em solução. Mesmo sem atividade bacteriana e mesmo com a elevação de Fe^{2+} em solução (prejudicial à solubilização do urânio), ainda havia Fe^{3+} suficiente para solubilizar urânio, caso esse fosse liberado. Entretanto essa solubilização não foi verificada.

Assim, os rendimentos finais de extração de urânio e molibdênio foram respectivamente de 27,0 e 13,0%, obtidos até a 3^a etapa de ataque ácido. O consumo total de H_2SO_4 , mostrado também na tabela 22, foi de 33,3 kg/t. Entretanto deve-se ressaltar que na realidade, esses rendimentos foram obtidos na 3^a etapa, o que determinou um consumo de 16,5 kg/t, pois a 4^a etapa foi totalmente desnecessária.

Novamente deve-se destacar que, comparando-se esses resultados com aqueles obtidos nos ensaios em escala semipiloto, ficou bem evidenciado o efeito da granulometria do minério, na solubilização dos metais de interesse.

Mesmo já se conhecendo esse tipo de efeito, pelos resultados dos testes anteriores, essa primeira operação piloto com o minério de Poços de Caldas, foi realizada em granulometria "run of mine" por dois fatores básicos: primeiro, para se conhecer efetivamente o comportamento do minério, em termos da metodologia operacional de lixiviação estática em pilhas, até então só realizada no minério de Figueira (3 pilhas) e, segundo, para se obter dados de processo (ciclo operacional, rendimentos, etc.) inicialmente sem nenhuma atividade de britagem do minério, pois nessa, sem dúvida alguma, estão envolvidos custos adicionais.

Assim, com os dados obtidos nas duas escalas de trabalho, pode-se então, realizar um estudo técnico-econômico para se avaliar a melhor alternativa para uma eventual aplicação do método em escala de produção.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lixiviação bacteriana de metais, ou mais genericamente biometalurgia, tornou-se nas últimas décadas um processo biotecnológico de grande interesse na indústria de metalurgia extrativa. Esse crescente interesse, decorre do fato da biometalurgia ser um processo alternativo de baixo custo, para a recuperação de metais contidos em minérios de baixos teores, ou mesmo de pequenos depósitos minerais.

Em função do progressivo aumento na demanda mundial de metais, verificado nesse século e sobretudo nos últimos decênios, vem ocorrendo uma exaustão de grandes jazidas contendo teores elevados de metais. Assim, torna-se imperioso o desenvolvimento de tecnologias alternativas, pois pelos métodos clássicos, o aproveitamento de minérios de baixos teores vem se tornando inviável sob o ponto de vista econômico.

Como foi discutido, atualmente a metodologia básica da aplicação da biometalurgia se caracteriza pela sua simplicidade quase rudimentar, através da lixiviação praticamente natural de grandes montes (pilhas) de minérios considerados rejeitos. Entretanto, pode-se notar como uma tendência a médio prazo, a aplicação da técnica em condições muito mais controladas. Quando se considera, por exemplo, o tratamento de concentrados minerais contendo metais valiosos como o ouro, o processo bacteriano passa a ser conduzido em reatores e em sistema operacional contínuo.

Tanto em sua forma "tradicional" (lixiviação estática em pilhas), como também no caso de um processo em bioreatores, um conhecimento mais aprofundado sobre o *T. ferrooxidans* é fundamental

para que ambos apresentem resultados positivos. No primeiro caso, para que se possa estimular o aparecimento e a manutenção da atividade bacteriana em níveis adequados, para que o processo se realize. No segundo, para que se possa atingir otimizações de processo, utilizando-se por exemplo, linhagens bacterianas mais eficientes. Nesse caso, acena-se com a possibilidade de se obter cepas melhoradas geneticamente, sobretudo em termos de altas atividades oxidativas e de resistência a condições mais extremas: pH, concentração de metais potencialmente tóxicos, etc..

Assim, o objetivo central deste trabalho, foi o de tentar caracterizar essa importância, pela apresentação dos resultados obtidos em um programa de trabalho que vem sendo realizado já há alguns anos.

Dentro desse objetivo, os resultados aqui apresentados devem ser considerados sobre três enfoques básicos:

1. A obtenção de isolados de *T. ferrooxidans* (e também de *T. thiooxidans*) de diferentes tipos de ambientes minerais. Durante essa fase, todo o procedimento de identificação e coleta de materiais apropriados, bem como as atividades laboratoriais de isolamento e purificação, puderam ser adaptadas e/ou estabelecidas, em função das características próprias de cada material. De qualquer forma, um conhecimento adequado sobre essa etapa básica, pôde ser adquirido e consolidado.

2. Os estudos fisiológicos de crescimento dos isolados bacterianos, permitiram compreender as condições adequadas de cultivo do *T. ferrooxidans* nos meios de culturas apropriados, bem como, identificar de forma segura as espécies isoladas, pela utilização dos diferentes substratos oxidáveis (Fe^{2+} , S^0 e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e pelas características de

crescimento colonial. Além disso, o desenvolvimento dos estudos cinéticos através da técnica manométrica (respirometria), foi de grande valia. Em experimentos de execução rápida e segura, diferenças fisiológicas significativas puderam ser constatadas entre quatro diferentes isolados de *T. ferrooxidans*, em relação à atividade de oxidação do Fe^{2+} , sob influência da concentração deste, do pH e de alguns metais pesados. Essa variabilidade genética natural, permite estabelecer as bases para um eventual desenvolvimento de um programa de melhoramento genético da espécie, para as características mencionadas.

3. O desenvolvimento experimental da lixiviação bacteriana de dois tipos de minérios uraníferos, propiciou a aquisição de conhecimentos fundamentais da metodologia operacional do processo em três níveis de escala: laboratório, semipiloto e piloto. Em relação a esta última, salienta-se o caráter pioneiro desse tipo de operação em nosso país e mesmo na América Latina, para minérios de urânio. Além da aquisição da experiência dessa metodologia de processo, sobretudo em lixiviação estática em pilhas pelo processo bacteriano, deve-se ressaltar os próprios resultados de processo obtidos. Os dois minérios estudados (Figueira - PR e Poços de Caldas - MG), mostraram-se susceptíveis à técnica de lixiviação bacteriana, com algumas variações da metodologia de processo entre os mesmos. Conseguiu-se índices de extração de urânio (e também do molibdênio, outro metal associado aos dois minérios), compatíveis com uma possível previsão de aplicação da técnica em escala de produção. As citadas e discutidas variações na metodologia de processo entre os dois tipos de minérios, reforçaram ainda mais a colocação feita de início, de que "cada minério é um minério". Assim, o desenvolvimento experimental da biometalurgia

deve ser feito localmente sem "importar" tecnologia, como afirmou DAGNINO (1985).

Finalmente, considerando esses enfoques apresentados, este trabalho não objetivou descobrir ou demonstrar algo não conhecido ou inovador em biometalurgia em seus vários aspectos, mas sim, tentar consolidar essa linha biotecnológica, que vinha sendo pioneiramente implantada em nosso país, por outros poucos pesquisadores.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ALEEM, M.I.H & LEES, H. 1963. Adenosine triphosphate-dependent reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by ferro-cytochrome c in chemoautotrophic bacteria. Nature, 200: 759-761.
- ANDRADE, T.R. 1984. Lixiviação bacteriana de minério de cobre de baixo teor. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 82 pp.
- ANDREWS, G.F. & MACZUGA, J. 1984. Bacterial removal of pyrite from coal. Fuel, 63: 297-302.
- ANDREWS, G.; DARROCH, M. & HANSSON, T. 1988. Bacterial removal of pyrite from concentrated coal slurries. Biotechnology and Bioengineering, 32: 813-820.
- APEL, W.A. & DUGAN, P.R. 1978. Hydrogen ion utilization by iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. In: L.E. Murr, A.E. Torma e J. A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and related Microbiological Phenomena. Academic Press. N. York, p. 45-59.
- ARGALL, Jr, G.O. 1963. How leaching recovers copper from waste and leach dumps in the southwest. Mineral World, 25: 20-24.
- ATTIA, Y.A.; LITCHFIELD, J.H. & VAALER, L. 1984. Biotechnology in the processing of gold ores and concentrates. In: Proceedings of the First International Symposium on Precious Metals Recovery, Nevada, U.S.A., Sec. XXV, 8 pp.

- ATKINS, A.S. 1978. Studies on the oxidation of sulfide minerals (pyrite) in the presence of bacteria. In: L.E. Murr, A.E. Torma e J. A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press. N. York, p. 403-426.
- BALASHOVA, V.V.; VEDENINA, I. Ya.; MARROSYAN, E.E. & ZAVARZIN, G.A. 1979. The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. Mikrobiology, 43: 491-494.
- BARBIC, F.F.; BRACILOVIC, D.M.; KRAJINCANIC, B.V. & LUCIC, J.L. 1976. Bacterial leaching of waste uranium materials. Z. Allg. Mikrobiologie, 16 (3): 179-1986.
- BARROS, M.E.C.; RAWLINGS, D.E. & WOODS, D.R. 1984. Mixotrophic growth of a *Thiobacillus ferrooxidans* strain. Applied and Environmental Microbiology, 47(3): 593-595.
- BECK, J.V. 1960. A ferrous-ion oxidizing bacterium. I. Isolation and some general physiological characteristics. Journal of Bacteriology, 79: 502-509.
- BECK, J.V. & ELSDEN, S.R. 1958. Isolation and some characteristics of an iron-oxidizing bacterium. Journal of General Microbiology, 19(I). Communications.
- BECK, J.V. & SHAFIA, F.M. 1964. Effect of phosphate ion and 2,4-Dinitrophenol on the activity of intact cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 88: 850-857.

- BERRY, V.K. & MURR, L.E. 1978. Direct observations of bacteria and quantitative studies of their catalytic role in the leaching of low-grade, copper-bearing waste. In: L.E. Murr, A.E. Torma e J. A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Academic Press, N. York, p. 103-136.
- BHURAT, M.C.; DWIVEDY, K.K.; JAYARAM, K.M.V. & DAR, K.K. 1973. Some results of microbial leaching of uranium ore samples from Narwapaahar, Bhatin and Keruadungri, Singhbhum district, Bihar. NML Technical Journal, 15: 47-51.
- BOOTH, J.E. & WILLIAMS, J.W. 1984. The isolation of a mercuric ion-reducing flavo protein from *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of General Microbiology, 130: 725-730.
- BRIERLEY, C.L. 1977. Thermophilic microorganisms in extraction of metals from ores. Developments in Industrial Microbiology, 18: 273-284.
- BRIERLEY, C.L. 1978. Bacterial Leaching. Critical Review of Microbiology, 6: 207-262.
- BRIERLEY, C.L. 1982. Microbiological Mining. Scientific American, 247(2): 44-53.
- BRIERLEY, J.A. & BRIERLEY, C.L. 1978. Microbial leaching of copper at ambient and elevated temperatures. In: L.E. Murr, A.E. Torma e J.A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 477-490.

- BRIERLEY, J.A. & Le ROUX, N.W. 1977. A facultative thermophilic *Thiobacillus*-like bacterium: oxidation of iron and pyrite. In: W. Schwartz (Ed.). Conference Bacterial Leaching, GBF Monograph Series n° 4, Verlag-Chemic, Weinheim, N. York, p. 55-66.
- BRIERLEY, J.A. & LOCKHOODS, S.J. 1977. The occurrence of thermophilic iron-oxidizing bacteria in a copper leaching system. FEMS Microbiology Letters, 2: 163-165.
- BROCK, T.D.; BROCK, K.M.; BELLY, R.T. & WEISS, R.L. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Archives of Mikrobiology, 84: 54-68.
- BRUYNESTEYN, A. 1985. Biotechnology: Its potential impact on the mining industry. Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 343-350.
- BRUYNESTEYN, A. & COOPER, J.R. 1974. Leaching of Cananea ore in test dumps. In: F.F. Aplan (Ed.). Solution Mining Symposium (AIME), N. York, p. 268-293.
- BRUYNESTEYN, A. & DUNCAN, D.W. 1977. The practical aspects of laboratory leaching studies. In: W. Schwartz (Ed.). Conference Bacterial Leaching, GBF Monograph Series n° 4, Verlag-Chemie, Weinheim, N. York, p. 129-137.

- BRUYNESTEYN, A. & HACKL, R.P. 1985. Evaluation of acid production potential of mining waste materials. In: G.I. Karavaiko e S.N. Groudev (Eds.). Biogeotechnology of metals. Proceedings of International Seminar and Training Course. (Moscow - Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP). Centre of International Projects, GKNT, Moscow, p. 335-343.
- BRYNER, I.C. & JAMESON, A.K. 1958. Microorganisms in leaching sulfide minerals. Applied Microbiology, 6: 281-287.
- BURTON, C.; COWMAN, S.; HEFFERMAN, J. and THORNE, B. 1983. In-situ bioleaching of sulphide ores at Avoca, Ireland - Parte I - Development, characterization and operation of a medium scale (6000t) experimental leach site. In: G. Rossi e A.E. Torma (Eds.). Recent Progress in Biohydrometallurgy (International Symposium on Biohydrometallurgy, Cagliari, Italy). F. & F. Parretti Grafiche - Firenze, p. 245-265.
- CAMPBELL, M.C. 1985. Canadian government activities in biotechnology as applied to the mineral industry. Biotechnology and Bioengineering, Symposium nº 16 ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 377-382.
- CARL, A.F. 1958. Rapid spectrophotometric determination of submilligram quantities of uranium. Analytical Chemistry, 30(1): 50-54.
- CASSA, J.C.S. & ANDRADE, T.R. 1985. Lixiviação bacteriana de minérios de ouro. Em: Anais do XI Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Hidrometalurgia, Natal, RN, p. 159-171.

- CHAKRABARTY, A.M. 1978. Genetic mechanisms in metal-microbe interactions. In: L.E. Murr, A.E. Torma, J.A. Brierley (Eds.), Metalurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena: Academic Press, N. York, p. 137-149.
- CLANCY, B.E. & RITCHIE, A.I.M. 1975. Modelling of heap behaviour. In: D.R. Davy (Ed.). Rum Jungle Environmental Studies. Australian Atomic Energy Commission Research Establishment, 10, 6 pp.
- COBLEY, J.G. & COX, J.C. 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. Microbiological Reviews, 47(4): 579-595.
- COBLEY, J.G. & HADDOCK, B.A. 1975. The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe^{2+} and the preliminary characterization of rusticyanin, a novel "blue" copper protein. FEBS Letters, 60, 29-33.
- COLMER, A.R. & HINKLE, M.E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. Science, 106: 253-256.
- COLMER, A.R.; TEMPLE, K.L. & HINCKLE, M.E. 1950. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. Journal of Bacteriology, 59: 317-328.
- COOK, T.M. & UMBREIT, W.W. 1963. The occurrence of cytochrome and coenzyme in *Thiobacillus thiooxidans*. Biochemistry, 2: 194-196.
- CORRICK, J.D. & SUTTON, J.A. 1961. Three chemosynthetic autotrophic bacteria important to leaching operations at Arizona copper mines. U.S. Bureau of Mines, Report n° 5718, 8 pp.

- COX, J.C. & BOXER, D.H. 1978. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochemical Journal, 174: 497-502.
- CRAMPTON, C.A. 1979. Processo de lixiviação bacteriana de minérios. P.I. nº 7901755 (INPI-MIC).
- CRIPPS, R.E. 1980. The recovery of metals by microbial leaching. In: A. Verbraeck (Ed.). Proceedings of 13th International TNO Conference ("Biotechnology, a Hidden past a Shining future") - Rotterdam, Holanda. Netherlands Central Organization - TNO, p. 102-115.
- CZEGLEDI, B. 1978. Utilization of low grade and wastes uranium ores by bacterial leaching. Report IAEA nº 1144/RB, 56 pp.
- DAGNINO, R. 1985. As perspectivas da biometalurgia na América Latina. Revista Brasileira de Tecnologia, 16: 40-49.
- DAVIDSON, M.S. & SUMMERS, A.O. 1983. Wide-host-range plasmids function in the genus *Thiobacillus*. Applied and Environmental Microbiology, 46: 565-572.
- DIN, G.A.; SUZUKI, I. & LEES, H. 1967. Carbon dioxide fixation and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Ferrobacillus ferrooxidans*. Canadian Journal of Microbiology, 13: 1413-1419.
- DISPIRITO, A.A. & TUOVINEN, O.H. 1981. Oxygen uptake coupled with uranous sulfate oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*, Geomicrobiology Journal, 2: 275-291.

- DISPIRITO, A.A. & TUOVINEN, O.H. 1982 a. Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Archives of Microbiology, 133: 28-32.
- DISPIRITO, A.A. & TUOVINEN, O.H. 1982 b. Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Archives of Microbiology, 133: 33-37.
- DISPIRITO, A.A.; SILVER, M.; VOSS, L. & TUOVINEN, O.H. 1982. Flagella and pili of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from a uranium mine in northern Ontario, Canada. Applied and Environmental Microbiology, 43(5): 1196-1200.
- DOLAN, K.M. & TUOVINEN, O.H. 1985. Characterization and mapping of plasmid DNA of *Thiobacillus ferrooxidans* by restriction endonuclease digestion. Paper presented at International Symposium on Biohydrometallurgy, Vancouver, Canada, 13 pp.
- DWIVEDY, K.K.; BHURAT, M.C. & JAYARAM, K.M.V. 1972. Heap and bacterial leaching tests on samples of low grade uranium ore from keruadungri, Singhbhum district, Bihar. NML Technical Journal, 14: 72-75.
- EHRlich, H.L. 1981. Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc., N. York, Capítulo 1, p. 2.
- EHRlich, H.L. 1986. What types of microorganisms are effective in bioleaching bioaccumulation of metals, ore beneficiation, and dessulfurization of fossil fuels? Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal-refining and fossil fuel processing industries"), p. 227-238.

- EHRlich, H.L. and FOX, S.I. 1967. Environmental effects on bacterial copper extraction from low-grade copper sulphides ores. Biotchnology and Bioengineering, 9: 471-485.
- FISHER, J.R. 1966. Bacterial leaching of Elliot Lake uranium ores. CIM Bulletin, 59: 588-592.
- GAIDARJIEV, S.; GROUDEV, S. & GENCHEV, F. 1975. Direct mechanism of bacterial oxidation of sulphide minerals. XI Internation Mineral Processing Congress, Cagliari, Italy (1975), p. 945-958
- GALE, N.L. & BECK, J.V. 1967. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 94: 1052-1059.
- GARCIA, Jr., O. 1984. Processo combinado bacteriano/químico de lixiviação estática de minério contendo sulfetos e valores recuperáveis de elementos metálicos. P.I. nº 8402983 (INPI-MIC).
- GARCIA, Jr., O. 1985a. Influência do urânio no crescimento de linhagens de *Thiobacillus ferrooxidans*. Em: Anais da XII Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 4-8/02, Ouro Preto, p. 18.
- GARCIA, Jr., O. 1985b. Isolamento de linhagens de *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans*. Em: Anais da XII Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 4-8/02, Ouro Preto, p. 26.
- GARCIA, Jr., O. & BRITO, J. 1984. Utilização de microorganismos no tratamento de minérios de urânio. Em: Anais do III Congresso Brasileiro de Energia, 8 -11 de outubro, Rio de Janeiro, V. 5: 2043-2048.

- GENTINA, J.C. & ACEVEDO, F. 1985. Microbial ore leaching in developing countries. Trends in Biotechnology, 3(4): 86-89.
- GILBERT, S.R.; BOUNDS, C.O. & ICE, P.R. 1988. Comparative economics of bacterial oxidation and roasting as a pre-treatment step for gold recovery from an auriferous pyrite concentrate. CIM Bulletin, 81: 89-94.
- GOLOMZIK, A.I. & IVANOV, V.I. 1965. Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* increased hydrogen ion and iron concentrations. Mikrobiologiya, 34: 465-468.
- GOODMAN, A., KHALID, A.M. & RALPH, B.J. 1980. A scanning electron microscopy study of the colony morphology of *Thiobacillus ferrooxidans*. In: P.A. Trudinger, M.R. Walter e B.J. Ralph (Eds.). Biogeochemistry of ancient and modern environments. (Proceedings of the Fourth International Symposium on Environmental Biogeochemistry - Canberra). Springer-Verlag GmbH & CO KG, Berlin, p. 459-468.
- GORMELY, L.S.; DUNCAN, D.W.; BRANION, R.M.R. & PINDER, K.L. 1975. Continuous culture of *Thiobacillus ferrooxidans* on a zinc sulfide concentrate. Biotechnology and Bioengineering, 17: 31-49.
- GROUDEV, S.N. 1979. Mechanism of bacterial oxidation of pyrite. Mikrobiologiya, 16(1): 75-87.

- GROUDEV, S.N. 1980a. Differences between *Thiobacillus ferrooxidans* strains with respect to their ability to oxidize covellite. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 33(5): 659-662.
- GROUDEV, S.N. 1980b. Leaching of sphalerite with different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 33(8): 1119-1122.
- GROUDEV, S.N. 1981a. Leaching of cobalt from synthetic cobalt sulphide by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 34(2): 217-220.
- GROUDEV, S.N. 1981b. Oxidation of arsenopyrite by pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 34(8): 1139-1142.
- GROUDEV, S.N. 1982. Leaching of nickel from sulfide mineral by pure and mixed cultures of chemolithotrophic bacteria. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 35: 1113-1116.
- GROUDEV, S.N. & GENCHEV, F. 1978. Mechanisms of bacterial oxidation of chalcopyrite. Acta Biologica Iugoslavica, 15(2): 139-152.
- GROUDEV, S.N.; GENCHEV, F.N. & GAIDARJIEV, S.S. - 1978. Observations on the microflora in an industrial copper dump leaching operation. In: L.E. Murr, A.E. Torma & J.A. Brierley (Eds.), Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 253-274.

- GROUDEVA, V.I. and GROUDEV, S.N. 1980a. Strain improvement of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. In: Proceedings of 12th Meeting of Miners and Metallurgists, Technical Faculty - Bor, Yugoslavia, II, p. 354-364.
- GROUDEVA, V.I. & GROUDEV, S.N. 1980b. Mutation selection of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. Mikrobiologiya, 17(1): 33-47.
- GROUDEVA, V.I., GROUDEV, S.N. & MARKOV, K.I. 1980a. Nitrosoguanidine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the levels of its oxidizing activity. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 33(10): 1401-1404.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N. & MARKOV, K.I. 1980b. Selection of *Thiobacillus ferrooxidans* mutants tolerant to high concentrations of copper ion. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare Sciences, 34(3): 375-378.
- GROUDEVA, V.I.; MARKOV, K.I. & GENTCHEV, G.J. 1978a. Survival of *Thiobacillus ferrooxidans* after UV Irradiation. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 31(5): 599-602.
- GROUDEVA, V.I.; MARKOV, K.I. & GENTCHEV, G.J. 1978b. UV induced mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* possessing high oxidizing activity. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 31(9): 1197-1200.
- GROUDEVA, V.I.; MARKOV, K.I. & GENTCHEV, G.J. 1978c. Ethylenimine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans*. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 31(11): 1477-1479.

- GUAY, R. & SILVER, M. 1977. Ferrous iron oxidation and uranium extraction by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Bioengineering, 19: 727-740.
- GUAY, R. & SILVER, M. 1981. Uranium biohydrometallurgy. Process Biochemistry, 15: 8-11,44.
- GUEDES, P.M. 1978. Aperfeiçoamento introduzido no sistema de recuperação de minérios por lixiviação bacteriana. P.I. nº 7700261 (INPI-MIC).
- HARRISON, Jr., A.P. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. International Journal of Systematic Bacteriology, 31(3): 327-332.
- HARRISON, Jr., A.P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. Archives of Microbiology, 131: 68-76.
- HARRISON, Jr., A.P. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Annual Review of Microbiology, 38: 265-292.
- HARRISON, Jr., A.P.; JARVIS, B.W. & JOHNSON, J.L. 1980. Heterotrophic bacteria from cultures of autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*: relationships as studied by means of deoxyribonucleic acid homology. Journal of Bacteriology, 143(1): 448-454.
- HARRISON, V.F.; GOW, W.A. & HUGHSON, M-R. 1966. Factors influencing the application of bacterial leaching to a Canadian uranium ore. Journal of Metals, 18: 1189-1194.

- HEDGES, R.W. & BAUMBER, S. 1973. Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 115: 459-460.
- HILTUNEN, P., VUORINEN, A.; REHTIJÄRVI, P. & TUOVINEN, O.H. 1981. Bacterial pyrite oxidation: release of iron and scanning electron microscopic observations, Hydrometallurgy, 7: 147-157.
- HOFFMAN, L.E. & HENDRIX, J.L. 1976. Inhibition of *Thiobacillus ferrooxidans* by soluble silver. Biotechnology and Bioengineering, 18: 1161-1165.
- HOLMES, D.S.; LOBOS, J.H.; BOPP, L.H. & WELCH, G.C. 1983. Setting up a genetic system "de novo" for studying the acidophilic *Thiobacillus ferrooxidans*. In: G. Rossi & A.E. Torma (Eds.). Recent Progress in Biohydrometallurgy (International Symposium on Biohydrometallurgy, Cagliari, Italy), F. & F. Parretti-Firenze, p. 541-554.
- HOLMES, D.S.; LOBOS, J.H.; BOPP, L.H. & WELCH, G.C. 1984. Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 157(1): 324-326.
- HOWARD, A. & LUNDGREN, D.G. 1970. Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Canadian Journal of Biochemistry, 48: 1302-1307.
- HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M.S.; BRIERLEY, J.A. & BRIERLEY, C.L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. Annual Review of Microbiology, 40: 311-336.

- HUTCHINSON, M.; JOHNSTONE, K.I. & WHITE, D. 1969. Taxonomy of the genus *Thiobacillus*: the outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. Journal of General Microbiology, 57: 397-410.
- INGLEDEW, W.J. 1986. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 23-34.
- INGLEDEW, W.J. & COBLEY, J.G. 1980. A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochimica et Biophysica Acta, 590: 141-158.
- INGLEDEW, W.J.; COX, J.C. & HALLING, P.J. 1977. A proposed mechanism for energy conservation during Fe^{2+} oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: chemiosmotic coupling to net H^+ influx. FEMS Microbiology Letters, 2: 193-197.
- JONES, C.A. & KELLY, D.P. 1983. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 33(8): 241-261.
- KARAVAIKO, G.I. & GROUDEV, S.N. 1985. Biogeotechnology of metals, its history, tasks and trends of development. In: G.I. Karavaiko & S.N. Groudev (Eds.). Biogeotechnology of Metals. Proceedings of International Seminar and Training course (Moscow - Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects, GKNT, Moscou, p. 6-24.

- KARGI, F. 1982. Enhancement of microbial removal of pyritic sulfur from coal using concentrated cell suspension of *T. ferrooxidans* and an external carbon dioxide supply. Biotechnology and Bioengineering, 24: 749-752.
- KELLY, D.P. 1982. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur. Philosophical Transactions of Royal Society London, 298: 499-528.
- KELLY, D.P. 1985. Physiology of the *Thiobacilli*: elucidating the sulphur oxidation pathway. Microbiological Sciences, 2: 105-109.
- KELLY, D.P. & JONES, C.A. 1978. Factors affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: relevance to ferric iron leach solution regeneration. In: L.E. Murr, A.E. Torma & J.A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 19-44.
- KELLY, D.P. & TUOVINEN, O.H. 1972. Recommendation that the names *Ferrobacillus ferrooxidans*-Leather and Braley and *Ferrobacillus sulfuroxidans*-Kinsel be recognized as synonyms of *Thiobacillus ferrooxidans*-Temple and Colmer. International Journal of Systematic Bacteriology, 22: 170-172.
- KELLY, D.P. & TUOVINEN, O.H. 1975. Metabolism of inorganic sulphur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* and some comparative studies on *Thiobacillus*-A2 and *T. neapolitanus*. Plant and Soil, 43: 77-93.

- KELLY, D.P.; NORRIS, P.R. & BRIERLEY, C.L. 1979. Microbiological methods for the extraction and recovery of metals. In: A.T. Bull, D.C. Ellwood & C. Ratledge (Eds.). Microbial Technology. Current State, Future Prospects, Cambridge University Press, London, p. 263-306.
- KINGMA, Jr., J.G.; PINET, J. & SILVER, M. 1980. A cinematographic study of iron-oxidizing *Thiobacilli* on mineral sulfide ores. Revue Canadienne de Biologie, 39(4): 283-286.
- KINGSBURY, J.M. & BARGHOORN, E.S. 1954. Silica gel as a microbiological medium: potentialities and a new method of preparations. Applied Microbiology, 2: 5-8.
- KINSEL, N.A. 1960. New sulfur oxidizing iron bacterium: *Ferrobacillus sulfoxidans* Sp.N. Journal of Bacteriology, 80: 628-632.
- KULSHRESTHA, S.C.; JAYARAM, K.M.V. & DAR, K.K. 1975. A study of the physiology of sulfur-oxidizing bacteria and its effect on uranium mobilization and leaching at Udaisagar, Udaipur district, Rajasthan. NML Technical Journal, 15: 42-46.
- LAKSHMANAN, V.I. 1985. Industrial views and applications: advantages and limitation of biotechnology. Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 351-361.
- LANDESMAN, J.; DUNGAN, D.W. & WALDEN, C.C. 1966. Iron oxidation by washed cell suspensions of the chemoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. Canadian Journal of Microbiology, 12: 957-964.

- LAWRENCE, R.W. & BRUYNESTEYN, A. 1983. Biological pre-oxidation to enhance gold and silver recovery from refractory pyritic ores and concentrates. CIM Bulletin, 76: 107-110.
- LEATHEN, W.W.; KINSEL, N.A. & BRALEY, Jr., S.A. 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: chemosynthetic autotrophic bacterium. Journal of Bacteriology, 72: 700-704.
- LIVESEY-GOLDBLATT, E.; NORMAN, P. & LIVESEY-GOLDBLATT, D.R. 1983. Gold recovery from arsenopyrite/pyrite ore by bacterial leaching and cyanidation. In: G. Rossi & A.E. Torma (Eds.). Recent Progress in Biohydrometallurgy (International Symposium on Biohydro metallurgy, Cagliari, Italy), F. & F. Parretti Grafiche-Firenze, p. 627-641.
- LONDON, J. 1963. Cytochrome in *Thiobacillus thiooxidans*. Science, 140: 409-410.
- LOWSON, R.T. 1975. Bacterial leaching of uranium ores - a review. Australian Atomic Energy Commission, "International Atomic Energy Agency" Vienna, 24 pp.
- LU, W-P. & KELLY, D.P. 1983. Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulphate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus* A2. Journal of General Microbiology, 129: 3549-3564.
- LU, W-P. & KELLY, D.P. 1984a. Purification and characterization of two essential cytochromes of the thiosulphate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus* A2 (*Thiobacillus versutus*). Biochimica et Biophysica Acta, 765: 106-117.

- LU, W-P. & KELLY, D.P. 1984b. Properties and role of sulphite: cytochrome c oxidoreductase purified from *Thiobacillus versutus* (A2). Journal of General Microbiology, 130: 1683-1692.
- LU, W-P.; SWOBODA, B.E. & KELLY, D.P. 1985. Properties of the Thio-sulphate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. Biochimica et Biophysica Acta, 828: 116-122.
- LUNDGREN, D.G. & SILVER, M. 1980. Ore leaching by bacteria. Annual Review of Microbiology, 34: 263-283.
- LUNDGREN, D.G. & TANO, T. 1980. Structure-function relationships of *Thiobacillus* relative to ferrous iron and sulfide oxidations. In: L.E. Murr, A.E. Torma & J.A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 151-166.
- LUNDGREN, D.G.; ANDERSEN, K.J.; REMSEN, C.C. & MAHONEY, R.P. 1964. Culture, structure and physiology of chemoautotrophic *Ferrobacillus ferrooxidans*. Development in Industrial Microbiology, 6: 250-259.
- LUNDGREN, D.G.; VALCHANOVA, M.V. & REED, R. - 1986. Chemical reactions important in bioleaching and bioaccumulation. Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal retining and fossil fuel processing industries"), p. 7-22.
- MacDONALD, D.G. & CLARK, R.H. 1970. The oxidation of aqueous ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*. Canadian Journal of Chemical Engineering, 48: 669-676.

- MacGREGOR, R.A. 1966. Recovery of U_3O_8 by underground leaching. CIM Bulletin, 59: 583-587.
- MacINTOSH, M.E. 1971. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans* species. Journal General Microbiology, 66: i-ii.
- MAHAPATRA, S.S.R.; MISHRA, A.K.; CHANDRA, D.; PANDALAI, H.A.; GOSH, P.K. & BANERJEE, P.K. 1985. Oxidation of pyrite from pyritiferous shales using *Thiobacillus ferrooxidans*. Indian Journal of Experimental Biology, 23: 42-47.
- MANNING, H.L. 1975. New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidiphilic bacteria from acid mine drainage. Applied Microbiology, 30: 1010-1016.
- MAO, M.W.H.; DUGAN, P.R.; MARTIN, P.A.W. & TUOVINEN, O.H. 1980. Plasmid DNA in chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*. FEMS Microbiology Letters, 8: 121-125.
- MANDL, M. 1984. Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO_2 and O_2 . Biología (Bratislava) 39(4): 429-434.
- MARJANOVIC, D. 1975. Bacterial leaching of uranium ores. Report IAEA n° 1145/RB, 43 pp.
- MARQUES, M.S. 1988. Lixiviação bacteriana uma alternativa para recuperação de metais. Em: Anais do XIII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Hidrometalurgia, 26 a 29 de setembro, São Paulo, 17 pp.

- MARSH, R.M. & NORRIS, P.R. 1983. The isolation of some thermophilic, autotrophic, iron and sulphur-oxidizing bacteria. FEMS Microbiology Letters, 17: 311-315.
- MARTIN, P.A.W.; DUGAN, P.R. & TUOVINEN, O.H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic chemolithotrophic *Thiobacilli*. Canadian Journal of Microbiology, 27(8): 850-853.
- MARTIN, P.A.W.; DUGAN, P.R. & TUOVINEN, O.H. 1983. Uranium resistance of *Thiobacillus ferrooxidans*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 18: 392-395.
- MARTINS, A.H. & EL-NAGAR, M.M.A. 1982. Lixiviação bacteriana de cobre sulfetado de baixo teor. Em: Anais do 1º Encontro do Hemisfério Sul em Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, 1, 633-644.
- MASHBIR, D.S. 1964. Heapleaching of low grade uranium ore. Mining Congress Journal, 50-54.
- MATIN, A. 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. Annual Review of Microbiology, 32: 433-468.
- MCCREADY, R.G.L. 1986. Underground bioleaching: extracting from low grade ore. Geos, 15(3): 9-10.
- MCGORAN, C.J.M.; DUNCAN, D.W. & WALDEN, C.C. 1969. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on various substrates. Canadian Journal of Microbiology, 15: 135-138.

- McKELLAR, I.R.C.; CHALES, A.M. & BUTLER, B.J. 1980. Some properties of adenylyate kinase from chemolithotrophically grown *Thiobacillus novellus*. Archives of Microbiology, 124: 275-284.
- MISHRA, A.K.; ROY, P. & MAHAPATRA, S.S.R. 1983. Isolations of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium. Current Microbiology, 8: 147-152.
- MURR, L.E. 1980. Theory and practice of copper sulphide leaching in dumps and *in situ*. Mineral Science Engineering, 12(3): 121-189.
- MURR, L.E. & BRIERLEY, J.A. 1978. The use of large-scale test facilities in studies of the role of microorganisms in commercial leaching operations. In: L.E. Murr, A.E. Torma & J.A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p.491-520.
- MURR, L.E. & MEHTA, A.P. 1982. Characterization of leaching reactions involving metal sulfides in wastes and concentrates utilizing electron microscopy and microanalysis techniques. Resources and Conservation, 9: 45-57.
- MYERSON, A.S. & KLINE, P.C. 1984. Continuous bacterial coal desulfurization employing *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Bioengineering, 26: 092-099.
- NAPIER, E.; WOOD, R.G. & CHAMBERS, L.A. 1968. Bacterial oxidation of pyrite and production of solution for ore leaching. Advances in Extractive Metallurgy, Institute of Mining and Metallurgy, London, paper 39, 947-957.

- NAVARRA, C.T. 1973. Lixiviação química e bacteriológica de minérios brasileiros de cobre. Apresentado no 1º Encontro Nacional de Tratamento de Minérios, 24-25 de maio, COPPE, Rio de Janeiro, 5 pp.
- NOIKE, T.; NAKAMURA, K. & MATSUMOTO, J. 1983. Oxidation of ferrous iron by acidophilic iron-oxidizing bacteria from a stream receiving acid mine drainage. Water Research, 17: 21-27.
- NOVO, M.T.M. & GARCIA, Jr., O. 1988. Lixiviação de cobre por *Thiobacillus ferrooxidans*. Em: Anais da XV Reunião Anual de Genética Microorganismos, 1 a 5 de fevereiro, Piracicaba, SP., p. 84.
- OLSON, G.J.; IVERSON, W.P. & BRINCKMAN, F.E. 1981. Volatilization of mercury by *Thiobacillus ferrooxidans*. Current Microbiology, 5: 115-118.
- OLSON, G.J.; PORTER, F.D.; RUBISTEIN, J. & SILVER, S. 1982. Mercuric reductase enzyme from a mercury-volatilizing strain of *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 151: 1230-1236.
- PARAB, S.V.; GHARAT, S.S.; RAMAKRISHNAM, P. & MURTHY, T.K.S. 1972. Bacterial leaching of metals from ores. In: Proceedings of Indian Institute of Metals - Silver Jubilee Symposium, Process Metallurgy, New Delhi, p. 303-334.
- PECK, H.D. 1968. Energy coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. Annual Review of Microbiology, 22: 489-518.
- PENG, S.L. & CARVALHO, P.C.T. 1980. Processo de reativação de fosfato natural pela atividade de microorganismos. PI. nº 7807887 (INPI-MIC).

- PIATNICKIS, S. 1973. Lixiviação de oxidados e sulfetos de baixo teor na província cuprífera do Rio Grande do Sul. Apresentado no 1º Encontro Nacional de Tratamento de Minérios, 24-25 de maio, COPPE, Rio de Janeiro, 3 pp.
- PIVOVAROVA, T.A. & GOLOVACHEVA, R.S. 1985. Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. In: G.I. Karavaiko & S.N. Groudev (Eds.). Biogeotechnology of metals. Proceedings of International Seminar and Training Course (Moscow e Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects - GKNT, Moscow, p. 27-55.
- POTTER, G.M. 1981. Design factor for heap leaching operations. Mining Engineering, 277-281.
- PUGH, C.E.; HOSSNER, L.R. & DIXON, J.B. Oxidation rate of iron sulfides as affected by surface area, morphology, oxygen concentration, and autotrophic bacteria. Soil Science, 137: 309-314.
- RAWLINGS, D.E. 1981. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. Journal of Applied Bacteriology, 51: 267-275.
- RAWLINGS, D.E.; GAWITH, C.; PETERSEN, A. & WOODS, P.R. 1983. Characterization of plasmids and potential genetic markers in *Thiobacillus ferrooxidans*. In: G. Rossi & A.E. Torma (Eds.). Recent Progress in Biohydrometallurgy (International Symposium on Biohydrometallurgy, Cagliari, Italy), F. & F. Parretti Grafiche-Firenze, p. 555-570.

- RAWLINGS, D.E.; PRETORIUS, I. & WOODS, D.R. 1984a. Expression of a *Thiobacillus ferrooxidans* origin of replication in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 158(2): 737-738.
- RAWLINGS, D.E.; PRETORIUS, I. & WOODS, D.R. 1984b. Construction of arsenic-resistant *Thiobacillus ferrooxidans* recombinant plasmids and the expression of autotrophic plasmid gene in a heterotrophic cell free system. Journal of Biotechnology, 1: 129-133.
- RAZZELL, W.E. & TRUSSEL, P.C. 1963. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. Journal of Bacteriology, 85: 595-603.
- RIBEIRO, M.R.; MARTELLI, H.L. & SANTOS, A.M. Solubilização de molibdenita em cultura de *Thiobacillus ferrooxidans* no processo de alteração. Em: Anais da 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo, p. 391-392.
- RIBEIRO, M.R.; SANTOS, A.M. & MARTELLI, H.L. 1976. Alterações microbianas em rochas: solubilização de ferro por ação de fungos em diabásicos. Revista Brasileira de Geociência, 6: 146-155.
- ROBINSON, J.B. & TUOVINEN, O.H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organic mercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. Microbiological Reviews, 48: 95-124.
- RODRIGUEZ-LEIVA, M. & TRIBUTSCH, H. 1988. Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite. Archives of Microbiology, 149: 401-405.

- ROSLYCKY, E.B. 1972. Reliable procedure for silica gel preparation. Applied Microbiology, 24: 944-945.
- ROY, P. & MISHRA, A.K. 1981a. Iron oxidation not coupled to growth in *Thiobacillus ferrooxidans* in presence of toxic metals. Journal of Applied Bacteriology, 51: 387-392.
- ROY, P. & MISHRA, A.K. 1981b. Factors affecting oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Indian Journal of Experimental Biology, 19: 728-732.
- RUDOLFS, W. & HELBRONNER, A. 1922. Oxidation of zinc sulfides by microorganism. Soil Science, 14: 459-464.
- SAKAGUCHI, H. & SILVER, M. 1976. Microbiological leaching of a chalcop₂pyrite concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Bioengineering, 18: 1091-1101.
- SAKAGUCHI, H.: TORMA, A.E. & SILVER, M. 1976. Microbiological oxidation of synthetic chalcocite and covellite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology, 31(1): 7-10.
- SANDELL, E.B. 1959. Colorimetric determination of traces of metals. 13th Edition, Interscience Publishers Incorporation, New York, pp. 650-653.
- SANMUGASUNDERAM, V. 1985. Bacterially assisted column leaching. Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16 ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 73-81.

- SCHRADER, J.A. & HOLMES, D.S. 1988. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 170(9): 3915-3923.
- SHAFIA, F. & WILKINSON, Jr., R.D. 1969. Growth of *Ferrobacillus ferrooxidans* on organic matter. Journal of Bacteriology, 93: 256-260.
- SILVER, M. 1978. Metabolic mechanisms of iron-oxidizing *Thiobacilli*. In: L.E. Murr, A.E. Torma e J.A. Brierley (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 3-17.
- SILVERMAN, M.P. & LUNDGREN, D.G. 1959a. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. Journal of Bacteriology, 77: 642-647.
- SILVERMAN, M.P. & LUNDGREN, D.G. 1959b. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. II. Manometric Studies. Journal of Bacteriology, 78: 326-331.
- SILVERMAN, M.P.; ROGOFF, M.H. & WENDER, I. 1961. Bacterial oxidation of pyritic materials in coal. Applied Microbiology, 9: 491-496.
- SOLJANTO, P. & TUOVINEN, O.H. 1980. A microcalorimetric study of U(IV)-oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and ferric iron. In: P.A. Trudinger, M.R. Walter e B.J. Ralph (Eds.). Biogeochemistry of Ancient and Modern environments. Springer Verlag, N. York, p. 3-17.

- STEVENS, C.J.; DUGAN, P.R. & TUOVINEN, O.H. 1986. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 8: 351-359.
- STEVENS, C.J. & TUOVINEN, O.H. 1986. Ferrous ion oxidation, nitrogen fixation (acetylene reduction) and nitrate reductase activity by *Thiobacillus ferrooxidans*. In: R.G.L. McCready (Ed.). Proceedings of the Second Annual General Meeting of BIOMINIT, CANMET, Special Report SP85-6, Ottawa, Canada, p. 37-45.
- SUGIO, T.; DOMATSU, C.; TANO, T. & IMAI, K. 1984. Role of ferrous ions in synthetic cobalt sulfide leaching of *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology, 48(3): 461-467.
- SUGIO, T.; TANO, T. & IMAI, K. 1981. Isolation and some properties of two kinds of cytochrome c oxidase from iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. Agricultural Biological Chemistry, 45: 1791-1799.
- SUMMERS, A.O. & JACOBY, G.A. 1977. Plasmid-determined resistance to tellurium compounds. Journal of Bacteriology, 129: 276-281.
- SUMMERS, A.O. & SILVER, S. 1978. Microbial transformations of Metals. Annual Review of Microbiology, 32: 637-672.
- TABITA, R. & LUNDGREN, D.G. 1971. Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 108: 328-333.

- TAKAGI, M. & GARCIA, Jr., O. 1988. Oxidação do Fe^{2+} por linhagens de *Thiobacillus ferrooxidans*. Em: Anais da XV Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 1 a 5 de fevereiro, Piracicaba-SP. p. 83.
- TANO, T. & LUNDGREN, D.G. 1978. Sulfide oxidation by spheroplasts of *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology, 35: 1198-1205.
- TAYLOR, J.H. & WHELAN, P.F. 1942. The leaching of cupreous pyrites and the precipitation of copper at Rio Tinto, Spain. Transacions of Institute of Mining and Metallurgy, 52: 35-71.
- TEMPLE, K.L. & COLMER, A.R. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 62: 605-611.
- TETAZ, T.J. & LUKE, R.K.J. 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 154: 1263-1268.
- THATCHER, R.C. & WEAVER, T.L. 1974. Simplified method for the preparation of silica gel media. Applied Microbiology, 28: 887-888.
- TORMA, A.E. 1971. Microbiological oxidation of synthetic cobalt, nickel and zinc sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans*. Revue Canadienne Biologie, 30: 209-216.
- TORMA, A.E. & ITZKOVITCH, I.J. 1977. Influence of uranium extractants on pyrite oxidation ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. In: W. Schwartz (Ed.). Conference Bacterial Leaching. GBF Monograph Séries n° 4, Verlag-Chemie, Weinhen, N. York, p. 157-164.

- TORMA, A.E. & SAKAGUCHI, H. 1978. Relation between the solubility product and the rate of metal sulfide oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Fermentation Technology, 56(3): 173-178.
- TORMA, A.E. & SUBRAMANIAN, K.N. 1974. Selective bacterial leaching of a lead sulphide concentrate. International Journal of Mineral Processing, 1: 125-134.
- TORMA, A.E.; WALDEN, C.C.; DUNCAN, D.W. & BRANION, R.M.R. 1972. The effect of carbon dioxide and particle surface area on the microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate. Biotechnology and Bioengineering, 14: 777-786.
- TUOVINEN, O.H. 1972. Microbiological aspects in the leaching of uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*. Atomic Energy Reviews, 10(2): 251-258.
- TUOVINEN, O.H. 1974. Development of cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* for the microbiological leaching of sulphide and uranium ores. Report IAEA n° 1328/RB, 4 pp.
- TUOVINEN, O.H. 1977. Pathways of the utilization of inorganic sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*. In: W. Schwartz. Conference Bacterial Leaching, GBF Monograph Series n° 4, Verlag-Chemie, Weinheim, N. York, p. 9-20.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. Z. Allg. Mikrobiologie, 12(4): 311-346.

- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1973a. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ - fixation and iron oxidation as measures of growth. Archives of Microbiology, 88: 285-298.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1973b. Toxicity and tolerance of uranium in *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of General Microbiology, 75: XXI.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1974a. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. Archives of Microbiology, 95: 153-164.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1974b. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. III. Influence of uranium, other metal ions and 2,4-Dinitrophenol on ferrous iron oxidation and carbon dioxide fixation by cell suspension. Archives of Microbiology, 95: 165-180.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1974c. Use of microorganisms for the recovery of metals. International Metallurgical Reviews, 19: 21-31.
- TUOVINEN, O.H. & KELLY, D.P. 1978. Metabolic transitions in culture of acidophilic *Thiobacilli*. In: L.E. Murr, A.E. Torma & J.A. Briery (Eds.). Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York. p. 61-81.

- TUOVINEN, O.H. & NICHOLAS, D.J.D. 1975. Patent protection of microorganisms with special reference to ferrous iron and sulfur oxidizing bacterial. Biotechnology and Bioengineering, 17: 1853-1956.
- TUOVINEN, O.H. & NICHOLAS, D.J.D. 1977. Transition of *Thiobacillus ferrooxidans* KG-4 from heterotrophic growth on glucose to autotrophic growth on ferrous iron. Archives of Microbiology, 114: 193-195.
- TUOVINEN, O.H.; HILTUNEN, P. & VUORINEN, A. 1983. Solubilization of phosphate, uranium, and iron from apatite and uranium-containing rock samples in synthetic and microbiologically produced acid leach solutions. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 17: 327-333.
- TUOVINEN, O.H.; KELLY, B.C. & NICHOLAS, D.J.D. 1976. Enzymic comparisons of the inorganic sulfur metabolism in autotrophic and heterotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. Canadian Journal of Microbiology, 22: 109-113.
- TUOVINEN, O.H.; PANDA, F.A. & TSUCHIYA, H.M. 1979. Nitrogen requirement of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. Applied and Environmental Microbiology, 37: 954-958.
- TUOVINEN, O.H.; SILVER, M.; MARTIN, P.A.W. & DUGAN, P.R. 1981. The Agnew Lake mine leach liquors: chemical examinations, bacterial enumeration and composition of plasmid DNA of iron oxidizing *Thiobacilli*. In: Proceedings of the International Conference on the use of Microorganisms in Hydrometallurgy, Hungarian Academy of Sciences, PICS, p. 59-69.

- UNZ, F.U. & LUNDGREN, D.G. 1961. A comparative nutritional study of three chemoautotrophic bacteria: *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Soil Science, 92: 302-313.
- VAISBICH, S. 1984. Estudo da lixiviação bacteriana de esteril de mineração de cobre de Camaquã, em fermentadores. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 116pp.
- VAISBICH, S.; PINTO, M.L.M. & BORZANI, W. 1979. Lixiviação bacteriana de rejeito de minério de cobre de Camaquã pela ação de bactéria isolada do próprio rejeito. Revista Brasileira de Tecnologia, 10: 289-302.
- VISHINIAC, W.V. 1974. *Thiobacillus*. In: R.E. Buchanan e N.E. Gibbons (Eds.). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". The Williams & Wilkins Co., 8^a Edição, Baltimore, p. 456-471.
- VISHNIAC, W. & SANTER, M. 1957. The *Thiobacilli*. Bacteriology Reviews, 21: 195-215.
- VOGEL, A.I. 1978. Textbook of quantitative inorganic analysis, including elementary instrumental analysis. 4th Edition, Longman Group. LTD, London, 925p.
- VUORINEN, A.; HILTUNEN, P.; HSU, J.C. & TUOVINEN, O.H. 1983. Solubilization and speciation of iron during pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Geomicrobiology Journal, 3(2): 95-119.

- WAKAO, N.; MISHINA, M.; SAKURAI, Y. & SHIOTA, H. 1982. Bacterial pyrite oxidation. I. The effect of pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* on release of iron. Journal of General and Applied Microbiology, 28: 331-343.
- WAKSMAN, S.A. & JOFFE, J.S. 1922. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. III. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. Journal of Bacteriology, 7(2): 239-256.
- WOODCOCK, J.T. 1967. Copper waste dump leaching. In: Proceedings of Australian Institute of Mining and Metallurgy (Symposium of Formation and leaching of sulphide minerals: biological, chemical and physical factors), 224: 47-66.
- WOODS, D.R. & RAWLINGS, D.E. 1985. Molecular genetic studies on the *Thiobacilli* and the development of improved biomining bacteria. Bio Essays, 2(1): 8-10.
- WONG, C.H.; SCHARER, J.M. & REILLY, P.M. 1974. A discrimination among microbial iron oxidation mechanisms. Canadian Journal of Chemical Engineering, 52: 645-653.
- YAKHONTOVA, L.K.; NESTEROVICH, L.G. & GRUDEV, A.P. 1980. The bacterial oxidation of pyrite. Moscow University Geology Bulletin, 35 (1): 51-57.
- YATES, J.R. & HOLMES, D.S. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology, 169(5): 1861-1870.

- YATES, J.R.; CUNNINGHAM, R.P. & HOLMES, D.S. 1988. IST2: An insertion sequence from *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Proceedings of National Academy of Sciences - USA, 85: 7284-7287.
- YUKAWA, T.; VANSELOW, D.; RALPH, B.J. & ROGERS, P.L. 1978. A kinetic model for the bacterial leaching of chalcopyrite (CuFeS_2). Journal of Fermentation Technology, 56(1): 45-52.
- ZAJIC, J.E. 1969. Uranium Biogeochemistry. In: Microbial Biogeochemistry, Academic Press, N. York, p. 179-196.