

BR 2377

DIPCE -- 009/76.

LIXIVIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE MINÉRIOS DE
BAIXO TEOR DE URÂNIO A BAIXA TEMPERATURA
POR THIOBACILLUS FERROOXIDANS

CENTRO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS
Rua Camerino nº 9

**LIXIVIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE MINÉRIOS DE
BAIXO TEOR DE URÂNIO A BAIXA TEMPERATURA
POR THIOBACILLUS FERROXIDANS**

A. Sayão Lobato

Dezembro / 1976

Afonso de Negreiros Sayão Lobato Filho

NUCLEBRÁS DRM	RELATÓRIO TÉCNICO ESPECÍFICO Nº. DIPCE - 009/76	PÁGINA.
	UNIDADE: Centro de Pesquisas Biológicas	DATA: 20, 12, 76


TÍTULO: Lixiviação Bacteriológica de Minérios de Baixo Teor de Urânio a Baixa Temperatura.
AUTOR (es): Affonso de Negreiros Sayão Lobato Filho

OBJETIVO: Desenvolver a técnica de solubilização bacteriológica de urânio de minérios, com reduzido teor, visando a sua recuperação em frações abaixo do teor de corte, e de resíduos de abertura química convencional.

RESUMO E CONCLUSÃO: Os ensaios laboratoriais utilizando agentes seletivos e mutagênicos permitiram o isolamento de uma estirpe de *Thiobacillus ferrooxidans* capaz de se desenvolver a 80°C, conservando as características oxidantes. Os testes mostraram que a amostra isolada é capaz de solubilizar 95% do conteúdo original de Urânio, em amostras de teor abaixo de 1000 ppm de U₃O₈.

A seleção desta estirpe é de grande interesse prático, pois permite a sua utilização em regiões de temperatura reduzida, com a mesma eficiência de solubilização das espécies anteriormente utilizadas.

A aplicação desta técnica permitirá a recuperação de urânio de minérios, originalmente considerados como estereis, incrementando as taxas de utilização de jazidas uraníferas.

NÚMERO DE CÓPIAS: 4 DISTRIBUIÇÃO: CENDOC C.P.B DIPCE LABPC	VISTO DO CHEFE:	CLASSIFICAÇÃO:	CODIFICAÇÃO-CD
	DATA: 1/1/77	APROVAÇÃO: 	CONSERVAÇÃO:
	DATA: 21/12/76		

I N D I C E

1	INTRODUÇÃO	1
2	ENSAIOS LABORATORIAIS	2
	2.1 Microorganismo empregado	2
	2.2 Meio de Cultura	2
	2.3 Condições Experimentais	2
	2.4 Equipamento	2
	2.5 Reativos	2
	2.6 Procedimento	3
	2.7 Resultados Comparativos	5
3	LIXIVIAÇÃO A 8 ^o C	6
	3.1 Condições Operacionais	6
	3.2 Resultados Experimentais	6
4	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	7
5	BIBLIOGRAFIA	8
 <u>A N E X O</u>		
I	Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	19

1 INTRODUÇÃO

O método bacteriológico de lixiviação de minérios utilizando o microorganismo *thiobacillus ferrooxidans*, vem sendo utilizado em vários países, sendo motivo de algumas patentes. No ano de 1976, Torma, no Canadá (1,2) obteve patente para lixiviação de minérios de níquel e cobalto, por *thiobacillus ferrooxidans*. Existem também alguns trabalhos científicos de lixiviação de urânio por *thiobacillus ferrooxidans*. (29)

Em prosseguimento às nossas pesquisas de lixiviação de minérios de baixo teor de urânio, por *thiobacillus ferrooxidans*, procuramos obter uma estirpe daquele microorganismo, capaz de desenvolver em temperaturas abaixo de 30°C, uma vez que a temperatura consignada pelos trabalhos de pesquisa, para o seu bom desenvolvimento é em redor de 30 - 35°C.

Como nossa principal jazida, até então conhecida, se localiza em região fria necessitaria portanto de aquecimento, que onera o processo. Torna-se de interesse econômico obter uma estirpe que se desenvolva em temperaturas mais baixas, sem perder suas características lixiviantes.

Trabalhos realizados na União Soviética (3), na região do Sul dos Urais, os autores isolaram estirpes selvagens, que se desenvolvem bem a 8°C. Este trabalho veio demonstrar que na própria natureza existem mutantes de *thiobacillus ferrooxidans* tolerantes a baixa temperatura, conservando o seu poder oxidativo dos sulfetos.

Em nossas pesquisas procuramos obter estirpes de *thiobacillus ferrooxidans* de desenvolvimento a baixa temperatura, empregando fatores seletivos e mutogênicos dos raios ultravioleta.

A estirpe do *thiobacillus ferrooxidans* molibdeno tolerante do C.P.B., sem sofrer ação dos agentes dos raios ultravioleta, não se desenvolve a 8°C quando semeada nos meios de cultura empregados no tempo de observação estipulado.

2 ENSAIOS LABORATORIAIS

2.1 Microorganismo Empregado

Foi utilizado o *Thiobacillus ferrooxidans* Molibdeno tolerante da coleção do C.P.B. Este germem foi submetido a irradiação de Raios Ultravioleta, por técnica já anteriormente descrita (4,36).

2.2 Meio de Cultura

O meio de cultura tem a seguinte composição: Minério de Poços de Caldas 100 g, água potável 1000 ml, pH 2,5 ajustado com H_2SO_4 . Ferver por 15 minutos, filtrar; adicionar sulfato ferroso 10 g e solidificar com silicato de sódio, quando necessário (5).

2.3 Condições Experimentais

A temperatura das culturas foi mantida constante a $8^{\circ}C$, em recipientes de vidro de 18 x 180 mm, e fechados com papel metalizado.

2.4 Equipamento

Foi utilizada uma lâmpada germicida de Ultravioleta GE G8T5, uma câmara frigorífica regulada a $8^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ e o colorímetro fotoelétrico Lumetron.

2.5 Reativos

Todos os reativos empregados foram p.a. Merck.

2.6 Procedimento

Inicialmente, irradiamos cerca de 45.000 germens Thiobacillus ferrooxidans Molibdeno tolerante da coleção do C.P.B., em exposição de 15 segundos, 5 minutos e 10 minutos, segundo técnica já descrita (4). Estes germens foram cultivados em meio sólido a 8°C., e anotamos as colônias que desenvolveram (Tabela I). Todas as colônias que se desenvolveram (6.182), foram isoladas em meio líquido, cultivadas a 8°C e observada diariamente quanto ao seu desenvolvimento em números de germens, considerando a existência de 25 germens por campo microscópico (40 x 15), como o padrão desejado (relatório das pesquisas de 1975).

Na Tabela I, verificamos que nas culturas irradiadas por 5 minutos houve desenvolvimento de 2.053 colônias, nas irradiadas por 10 minutos desenvolveram 914 colônias e, finalmente, nas irradiadas por 15 segundos observamos 3.215 colônias desenvolvidas.

Na Tabela II, podemos ver o desenvolvimento dos germens, em meio líquido, provenientes das colônias irradiadas. Nas 2.053 culturas provenientes da irradiação de 5 minutos, somente 151 tubos apresentaram a taxa de 25 germens por campo microscópico (40 x 15) dentro de 8 dias. Nos 914 tubos de cultura e irradiação por 10 minutos, somente 85 atingiram a taxa de 25 germens, e nas 3.215 culturas provenientes das colônias irradiadas por 15 segundos, observamos 208 tubos de cultura, com os 25 germens por campo em 8 dias.

Na Tabela III, podemos acompanhar o desenvolvimento diário das bactérias, sempre tomando por padrão a existência de 25 germens por campo microscópico (40 x 15). O aparecimento desta taxa foi observado nos tubos de cultura anteriormente irradiados por 5 minutos, até o 4º dia em 0 tubos, no 5º dia em 50 tubos de cultura, no 6º dia em 60 tubos de cultura, no 7º dia em 25 tubos, no 8º dia em 10 tubos de cultura. Nas culturas anteriormente irradiadas por 10 minutos, observamos: até o 4º dia em 0 tubos, no 5º dia em 28 tubos, no 6º dia em 40 tubos, no 7º dia em 11 tubos, no 8º dia em 8 tubos de cultura. Nas culturas anteriormente irradiada por 15 segundos: até o 4º dia 0 tubos, no 5º dia em 75 tubos, no 6º

dia em 80 tubos, no 7^o dia em 50 tubos, no 8^o dia em 3 tubos de cultura.

Na Tabela IV observamos seu poder oxidante frente ao sulfato ferroso das culturas, desenvolvendo em 5 dias, quer as irradiadas anteriormente por 5 minutos, 10 minutos e 15 segundos (ver Tabela III), num total de 153. Foi tomado como índice a mudança de cor do meio de cultura, que passava do incolor para castanho claro, em observação microscópica e num tempo mínimo de 5 dias. Destes 153 tubos de cultura selecionamos 100 tubos, os que apresentavam maior intensidade de coloração, assim distribuídos: 30 tubos cultura dos germens anteriormente irradiados por 5 minutos, 10 tubos cultura irradiados por 10 minutos, e 60 tubos dos irradiados por 15 segundos.

Estas 100 culturas foram ressemeadas cada 5 dias, no mesmo meio de cultura líquido incubadas a 8^oC, perfazendo um total de 10 passagens. Esta operação teve por finalidade verificar a constância do fenótipo - desenvolvimento a 8^oC - e característica oxidativa do sulfato ferroso. Em todas estas 10 passagens era controlado o número de germens por campo microscópico, que sempre foi o mínimo de 25 germens por campo (40 x 15) em 5 dias, assim como a mudança e intensidade de coloração. Destas 100 culturas selecionamos as 2 melhores, que apresentavam uma melhor constância dos caracteres culturais e oxidativas, durante as 10 sucessivas repicagens de F₁ a F₁₀. Passamos a denominar estas estirpes de I e II. Estas 2 estirpes provieram das culturas irradiadas por 15 segundos.

Destas estirpes I e II, procuramos fazer a seleção na sua população microbiana, dos indivíduos que apresentassem maior e mais rápido poder oxidativo do sulfato ferroso, assim como mais rápido desenvolvimento quando cultivado a 8^oC.

Em meio de cultura solidificado com silicato de sódio, pH 2,5, foram semeadas separadamente as estirpes I e II e cultivado a 8^oC. Foram isoladas 50 colônias de cada estirpe I e II, as primeiras que se desenvolveram e alcançaram 0,25 mm de diâmetro. Isto acontecia no 10^o dia de cultivo. Estas 100 colônias foram isoladas em meio líquido e incubadas a 8^oC.

Na tabela V, podemos acompanhar o poder oxidativo dos germens isolados, em cada tubo cultura, medindo a coloração apresentada no meio de cultura, que passava do incolor ao castanho de várias tonalidades. A colorimetria era feita a partir do 5º dia até o 12º dia de cultivo. Verificamos que após o 12º dia não havia mais reação positiva para o sulfato ferroso pelo ferricianeto de potássio, no meio de cultura e a densidade ótica (D.O.) havia chegado a 1,0. A colorimetria era feita pelo fotocolorímetro Lumetro com filtro 530 nm.

Tivemos 20 tubos de cultura da estirpe I e 20 da estirpe II, que em 12 dias apresentaram crescimento de pelo menos 25 germens por campo microscópico e poder oxidativo máximo do sulfato ferroso. Tanto a estirpe I como a II, apresentaram os mesmos valores e características de cultura. Pelo resultado podemos deduzir que as 20 culturas de cada estirpe I e II, devem ser da mesma linhagem genética, podendo ser agrupadas num mesmo tubo de cultura. Os 40 tubos de cultura (20 da estirpe I e 20 da estirpe II) foram misturadas numa única amostra, passando a ser denominada Thiobacillus ferrooxidans 89C.

Na tabela VI, verificamos o poder oxidativo da amostra Thiobacillus ferrooxidans Molibdeno tolerante, antes de ser irradiada, quando cultivada a 30-35°C. Utilizamos o mesmo meio de cultura líquida, empregado nas pesquisas do Thiobacillus ferrooxidans 89C. A oxidação do sulfato ferroso do meio de cultura em 6 dias, alcançava a D.O. de 1,0.

2.7 Resultados Comparativos

A estirpe do Thiobacillus ferrooxidans a 89C, isolada em nossas pesquisas, quando cultivada a 89C, leva 12 dias para oxidar o sulfato ferroso, atingindo na colorimetria o índice D.O. 1,0, enquanto que a amostra de Thiobacillus ferrooxidans Molibdeno tolerante cultivada a 30-35°C, necessita somente de 6 dias para alcançar a mesma taxa colorimétrica.

3 LIXIVIAÇÃO A 8°C

Foi feita a verificação do poder lixiviante da amostra de *Thiobacillus ferrooxidans* 8°C, através de um ensaio de lixiviação estática à temperatura de 8°C.

3.1 Condições Operacionais

Foi utilizado o minério recebido originalmente em 1975, com granulometria de 1/8 de polegada e de teor em U_3O_8 de 0,085%, com os seguintes parâmetros operacionais:

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| - Tipo de lixiviação | - estática |
| - Relação minério/líquido | - 1:1 |
| - Temperatura | - 8°C |
| - Tempo de lixiviação | - 15 dias e 30 dias |

Para comparação foi efetuado também um teste de lixiviação estática a 30°C, com o mesmo minério, empregando outra amostra de *Thiobacillus ferrooxidans* molibdeno tolerante.

3.2 Resultados Experimentais

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela VII. Verifica-se que as lixiviações a 8°C e a 30°C conduziram ao mesmo resultado em 15 dias, correspondendo a um rendimento de solubilização de urânio de 95,3%.

4 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

4.1 Utilizando irradiações Ultravioleta com lâmpada GE G8T5, na dosagem de $1 \text{ erg. mm}^2 \times 10^4$ e exposição de 15 segundos, foi possível obter uma estirpe de *Thiobacillus ferrooxidans* que se desenvolve a 8°C , conservando o seu poder oxidativo do sulfato ferroso.

4.2 Comparativamente com a amostra padrão de *Thiobacillus ferrooxidans* cultivada a 30°C , foi constatado que a estirpe que se desenvolve a 8°C , leva o dobro do tempo para oxidar a mesma quantidade de sulfato ferroso.

4.3 A lixiviação de minérios de baixo teor de Urânio, quando feita com a amostra isolada de *Thiobacillus ferrooxidans* 8°C ., na temperatura de 8°C apresentou resultados idênticos a lixiviação feita com outra amostra padrão de *Thiobacillus ferrooxidans* na temperatura de $30 - 35^\circ\text{C}$.

4.4 Tanto na lixiviação feita a 8°C , como na de $30 - 35^\circ\text{C}$, utilizando amostras de *Thiobacillus ferrooxidans*, foi possível retirar 95,3% do Urânio existente no minério.

4.5 Recomendação: Será de grande interesse prático, em lixiviação bacteriológica por *Thiobacillus ferrooxidans*, em regiões onde ocorram baixas temperaturas, que esta lixiviação seja feita com uma mistura de estirpes de *Thiobacillus ferrooxidans*, ou seja, a estirpe de desenvolvimento a 8°C com a clássica de crescimento a $30 - 35^\circ\text{C}$, pois desta forma, acreditamos que o rendimento do processo será maior em termos de Urânio solúvel no licor.

4.6 A aplicação em instalações piloto, da técnica desenvolvida, permitirá uma melhor avaliação de suas possibilidades industriais, através do acompanhamento de seus diversos parâmetros operacionais.

5. BIBLIOGRAFIA CITADA E CONSULTADA

1. Torma, Arpad E. Patént nº 1382357. Canadā Microbiological Extraction of Cobalt and Nickel from sulphide ores concentrates (Thiobacillus ferrooxidans. 1975-1976).
2. O.H. Tuovinen and D.J.D.Nicholas. Patent Protection of Microorganisms with Special Reference to Ferrous-Iron and Sulfur Oxidizing Bacteria. Biotechnology and Bioengineering. v.XVII 1853-1857.
3. Ġ.I.Karavaike. P.A. Pivovarova.E.V.Shchetinina and A.F.Lazabny. Microbiological Studies on Copper-Pyrite Deposits of The Southern Urals. Microbiology T.XLIII 1974. Boletim 6. p. 1098-1104.
4. A.Sayāo Lobato Anais do Centro de Pesquisas Biolōgicas v.4 1974 p. 7.
5. Robert C. Thatcher and Terry L. Weaver. Simplified Method for the Preparation of Silica Gel Media. Applied Microbiology v.28 n.5 1974 p.887-888.
6. Hidromichi Saraguchi, A.E.Torma, and Marvin Silver. Microbiological Oxidation of Synthetic Chalcocite and Covellite by Thiobacillus ferrooxidans. Applied and Environmental Microbiology v.31 n.1 1976 p.7-10.
7. I.J.Itzkovitch and A.E.Torma. Influence of Organic Copper Extractants on Activity of Thiobacillus ferrooxidans. IRCS Medical Science: Biochemistry Environmental Biology and Medicine: Microbiology, Parasitology and Infections Diseases. 4 155 1976.
8. R.Guay, A.E.Torma et M.Silver. Oxydation de l'Ion Ferreux et Mise en Solution de l'Uranium d'un Minerai par Thiobacillus ferrooxidans. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1975, 126 B, p.209-219.
9. Īdem DNA Base Composition of Some Bacteria Oxidizing Ferrous Iron and Metal Sulphides. IRCS Medical Sciences: Biochemistry: Microbiology, Parasitology and Infectious Diseases, 3, 417 1975.

10. Arpad E.Torma and Irwin J. Itzkovitch. Influence of Organic Solvents on Chalcopyrite Oxidation Ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology v.32 n.1 1976 p. 102-107.
11. Arpad E. Torma and Roger Guay. Effect of Particle Size on The Biodegradation of a Sphalerite Concentrate. Le Naturaliste Canadien, vol. 103, 1976, p. 133-138.
12. Arpad E.Torma, G.G.Gabra, R.Guay and M.Silver. Effects of Surface Active Agents on the Oxidation of Chalcopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy, 1 1976, p. 301-309.
13. Olli H.Tuovinen, Bruce C.Kelley and D.J.Donald Nicholas. Enzymic Comparisons of the Inorganic Sulfur Metabolism in Autotrophic and Heterotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. Canadian Journal of Microbiology v.22, n.1, 1976, p. 109-113.
14. Oxidation of Elementary Sulphur by *Thiobacillus thiooxidans*. G. I.Karovaiko and T.A.Pivovarova. Microbiology T.XLII 1973, Bul. 3, URSS.
15. G.I.Karovaiko, T.A.Pivovarova, E.V.Shchetinina and A.F.Lazebny. Microbiological Studies on Copper-Pyrite Deposits of S.Urals. (baixas temperaturas cultivo *Thiobacillus*) Microbiologie. 1974 T. XLIII, p. 1103-1104, URSS.
16. G.I.Karavaiko and S.A.Moshniakova. A Study on Chemosynthesis and Rate of Bacterial and Chemical Oxidative Processes Under Conditions of Copper-Nickel Ore Deposits of Kolsky Peninsula. 1971. Microbiologie. T.XL Bul.3, p. 551-557.
17. Idem The Role of Thione Bacteria in the Oxidation of Sulphide Ores of Copper-Nickel Deposits of the Kolski Peninsula. 1972, Bul.3, p.314-325, URSS.
18. T.A.Pivovarova and G.I.Karavaiko. Submicroscopical Organization of *Thiobacillus thiooxydans*. 1973, T.XLII, Bul.6, p.1078 - 1080, URSS.

19. A.M.Charles and B.White Ribulose Bisphosphate Carboxylase from Thiobacillus A2. Its Purification and Properties. Archives of Microbiology 108, 195-202, 1976.
20. Idem Physical Properties and Metabolite Regulation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase from Thiobacillus A2. Archives of Microbiology 108, 203-209, 1976.
21. William A.Apel, Patrick R.Dugan, Joy A.Filppi and Melvin S.Rheins. Detection of Thiobacillus ferrooxidans in Acid Mine Environments by Indirect Fluorescent Antibody Staining. Applied and Environmental Microbiology v.32, n.1, 1976, p. 159-165.
22. John G.Cobley and Bruce A.Haddock. 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, v.60, n.1, Dec.1975, p.29-33.
23. H.M.Tsuchiya, N.C.Trivedi and M.L.Schuler. Microbial Mutualism in Ore Leaching. Biotechnology and Bioengineering. v.XVI, 1974, p.991-995.
24. N.C.Trivedi and H.M.Tsuchiya. Microbial Mutualism in Leaching of Cu-Ni Sulphide Concentrate. International Journal of Mineral Processing. 2-1975 1-14.
25. Seppo Sivala and Veronica Sundman. Demonstration of Thiobacillus Type Bacteria, Which Utilize Methyl Sulphides. Arch. Microbiology 103, 1975, p. 303-304.
26. Ernest S.Gladney, James W.Owens and John W.Starner. Determination of Uranium in Natural Water by Neutron Activation Analysis. Analytical Chemistry v.48, n.7, 1976, pg.973-975.
27. C.A.Shnaitman, M.S.Korozynski, and D.G.Lundgren. Kinetic Studies of Iron Oxidation by Whole Cells of Ferrobacillus ferrooxidans. Journal of Bacteriology v.99, n.2, 1969.p.552-557.
28. Kazutami Imai and Haruyoshi Konno. Mechanism of Iron Oxidation by Thiobacillus ferrooxidans. University Okayama. Fac.Agriculture Japan 1975, v.49, n.11, p.591-596.

29. Noboru Tomizuka, Mitsuo Yagisawa, Junichiro Someya and Yoshimasa Takahara. Continuous Leaching of Uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agr. Biol.Chem.* 40, 1976, p.1019-1025.
30. H.Tributsch. The Oxidative Desintegration of Sulphide Crystals by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Die Naturwissenschaften.* 63, 1976.
31. Karin Feldmann and D.Goroll. Abbau von Schwefelverbindungen durch *Thiobacillus*-Reinkulturen. *Zeitschrift fur Allg.Mikrobiologie.* 16.4.1976, 255-258.
32. D.Goroll. Konservierung und Rekultierung vakuumgetrockneter Zellen von *Thiobacillus ferrooxidans*. *Zeitschrift fur Allg.Mikrobiologie* 15, 5 1975, p.377-378.
33. D.Goroll. Okologie von *Thiobacillus neapolitanus* und seine mogliche Mitwirkung im Leaching-Proze B. *Zeitschrift fur Allg.Mikrobiologie.* 16, 1 1976, p.3-7.
34. M.Schedel, J.Legal, and J.Baldensperger. Sulfur Metabolism in *Thiobacillus denitrificans*. Evidence for the Presence of a Sulfite Reductase Activity. *Arch. Microbiology.* 105 1975, p.339-341.
35. G.Dubinina and A.V.Zhdanov. Recognition of the Iron Bacteria "Siderocapsa" as Arthrobacters and Description of *Arthrobacter siderocapsulatus* sp.nov. *International Jour. of Systematic Bacteriology* v.25, n.4, 1975, p.340-350.
36. E.L.Powers, Marian Cross and C.J.Varga. A Dose-Rate Effect in the Ultraviolet Inactivation of Bacterial Spores. *Photochemistry and Photobiology* v.19 1974, p.273.
37. K.Purohit, B.A.Mc Fadden, and A.L.Cohen. Purification, Quaternary Structure, Composition, and Properties of D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase from *Thiobacillus intermedius*. *Journal of Bacteriology* v.127, n.1, 1976, p.505-515.
38. K.Purohit, B.A. McFadden, and M.M.Shaykh. D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and Polyhedral Inclusion Bodies in *Thiobacillus Intermedius*. *Journal of Bacteriology* v.127, n.1, 1976, p.516-522.

39. A.V.Zhdanov and G.A.Dubinina. *Arthrobacter siderocapsulatus* Iso Isolated from Lake Water. *Microbiologie T. XLIV* Bol.4, 1975, p. p.714-719. URSS.
40. H.Schulze and R.Schweisfurth. Eizenoxydierende stabchenformige Bakterien.I.Untersuchungen unter Verwendung von Fe (II) oxalat im Medium. *Zeitschrift fur Allg.Mikrobiologie* 15.8.1975, p.605-614.
41. Robert Che-An Yang, André Van De Vooede, and Walter Fiers. Specific Cleavage and Physical Mapping of Simian-Virus - 40 DNA by the Restriction Endonuclease of *Arthrobacter luteus*. *Eur.J.Biochem.* 61. 1976, p.119-138.
42. Teruo Sawai, Yukihiro Ukigai and Akira Nawa. Identification of an Isomalto-dextranase Producing Bacterium *Arthrobacter globiformis*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 40, n.6, 1976, p. .. p.1249-1250.
43. J.Korkisch and A.Sorio. Determination of Seven Trace Elements in Natural Waters after Separation by Solvent Extraction and Anion-Exchange Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 79 1975 207-218.
44. J.Korkisch and I.Steffan. Determination of Uranium in Sea Water After Anion-Exchange separation. *Analytica Chimica Acta* 77 1975, p.312-314.
45. J.Mac Cordick, J.M.Hornsperger. B.Wurtz. Action d'un complexe de Beryllium sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* (types R et S). I.Influence sur le temps de latence. II Compétition avec le magnésium. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie.* Tome 169, n.2, 1975, p.417 et p.421.
46. K.C.Marshall. Clay Mineralogy in Relation to Survival of Soil Bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* v.13, 1975 p.357-373.
47. F.Kunc and G.Stotzky. Effect of Clay Minerals on Heterotrophic Microbial Activity in soil. *Soil Science* v.118 n.3 1974 p.186-195.

48. Charles Hagedorn and John G.Holt. Differentiation of Arthrobac
ter Soil Isolates and named strains from other Bacteria by
reactions on Dye-Containing media. Canadian Journal of Microbio
logy v.21, n.5, 1975, p.688-693.
49. Charles Hagedorn and John G.Holt. A nutritional and Taxonomic
Survey of Arthrobacter soil isolates. Canadian Journal of Micro
biology. v.21, n.3, 1975, p.353-361.
50. Arne Jernelov and Ann-Louise Martin. Ecological Implications of
Metal Metabolism by Microorganisms. IVL. Swedish Water and Air
Pollution Research Laboratory. Bol.233, Mars 1975, Stockholm.
51. J.Ennever and F.E.Summers. Calcification by Candida albicans
(Apatite) Journal of Bacteriology v.122, n.3, 1975, p.1391-1393.
52. Paloma Liras and W.W.Umbreit. Transformation of Morphine by Res-
ting Cell-Free Systems of Arthrobacter Sp. Applied Microbiology
v.30, n.2, 1975, p.262-266.
53. Toshiro Shida, Zazuo Komagata, and Koji Mitsugi. Reduction of
Lag Time in Bacterial Growth. I. Effect of Inoculum size and
Nutrients. J.Gen. Appl. Microbiology v.21, 1975, p.75-86.
54. Idem. Reduction of Lag Time in Bacterial Growth. II.
Effects of Inoculum Size, and Glucose and Sodium Chloride Sup-
plemented in Culture Media, Initial pH of Media and Cultural Tem
perature. J.Gen.Appl. Microbiology, 21.1975, p.293-303.
55. L.H.Boncyk, C.H.Millstein and S.S.Kalter. Use of CO₂ for More
Rapid Growth of the Nocardia species. Journal of Clinical Micro
biology v.3, 1976, p.463-464.
56. P.Monk, and I.Wads . The Use of Microcalorimetry for Bacterial
Classification. J.Appl. Bacteriology v.38, 1975, p.71-74.
57. L.F.Elliott and J.W.Blaylock. Effects of Wheat Straw and Alfalfa
Amendments on Solubilization of Manganese and Iron in Soil. Soil
Science v.120, n.3, 1975, p.205-211.

58. Evidence for the Occurrence of Specific Iron III-Binding Compounds in Near-Shore Marine Ecosystems. *Applied Microbiology* v.30 n.2, 1975, p.186-188.
59. Cécile Billy. Géomicrobiologie. Isolement des Constituants d'une association bactérienne productrice de Calcite. *C.R.Acad.Sc. Paris. t.281, Série D*, 1975, p.621-623.
60. Norman C.Dondero. The Sphaerotillus-Leptothrix Group. *Annual Review of Microbiology* v.29, 1975, p.407-427.
61. Edward P.Previc and Nancy Lowell. Peptidoglycan Compositions of a New Strain of *Arthrobacter crystallopoietes* During Sphere-Rod Morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 411 1975 377-385.
62. Donald S.Lucas and J.B.Clark. Induction of Morphogenesis in the Genus *Arthrobacter* *Journal of Bacteriology* v.124, 1975, p.1034-1036.
63. Dennis G.Searcy and Elaine Kubota Doyle. Characterization of *Thermoplasma acidophilum* Deoxyribonucleic Acid. *International Journal of Systematic Bacteriology* v.25 n.3, 1975 p.286-289.
64. Ragnar Fänge and Ulf Lidman. Secretion of Sulfuric Acid in *Cassidaria echinophora* Lamarck (Mollusca: Mesogastropoda, Marine Carnivorous Snail). *Comp.Biochem Physiol.* v.53A 1976 p.101-103.
65. M.L.Kremer. The Reaction of Bacterial Catalase with H_2O_2 . *Israel Journal of Chemistry* v.13 n.2 1975 p.91-98.
66. J.S.Alford Jr., Measurement of Dissolved Carbon Dioxide. *Canadian Journal of Microbiology* v.22 1976 p.52-56.
67. K.Hoene und W.Schwartz. Nachweis von Siderocapsaceen am natürlichen Standort. *Zeitschrift für Allg.Mikrobiologie* v.15 n.8 1975 p.639-643.
68. P.J.Murphy, A.M.Posner, and J.P.Quirk. Chemistry of Iron in Soils. Ferric Hydrolysis Products. *Aust.J. Soil.Res.* v.13 1975 p.189-201.

69. M.K.Hamdy and O.R.Noyes. Formation of Methyl Mercury by Bacteria. *Applied Microbiology* v.30, n.3, 1975, p.424-432.
70. C.N.Huhtanen and A.E.Wasserman. Effect of Added Iron on the Formation of Clostridial Inhibitors. *Applied Microbiology* v.30, n.5, 1975, p.768-770.
71. G.Dubinina and A.V.Zhdanov Recognition of the Iron Bacteria "*Siderocapsa*" as Arthrobacters and Description of *Arthrobacter siderocapsulatus* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* v.25 n.4 1975 p.340-350.
72. Hidekazu Iwasaki, Sumihare Noji, and Sohsuke Shidara. *Achromobacter cycloclastes* Nitrite Reductase. The Function of Copper, Amino Acid Composition, and ESR Spectra. *Journal of Biochem.* v.78 1975, p.355-361.
73. Irmelin Probst and Hans G.Schlegel. Respiratory Components and Oxidase Activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.440 1976 p.412-428.
74. A.Davis G.H.W.Deane. Possible Dosimeter for Ultraviolet radiation. *Nature* v.261 n.5556,1976,p.169-170.
75. C.S.Wong and P.Berrang Contamination of Tap Water by Lead Pipe and Solder. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology.* v.15, n.5, 1976, p.530-534.
76. Pierre Dupuy, François Grossin et Gérard Trotet. Méthode de Culture des Cyanophycées sur support minéral solide. *Comptes rendus des Séances de la Société de Biologie.* T.170, n.1, 1976, p.44-46.
77. H.L.Drake and J.M.Akagi. Product Analysis of Bisulfite Reductase Activity Isolated from *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Bacteriology.* v.126, 1976, p.733-738.
78. Dietrich Gleisberg, Joachim Kandler, Hansjörg Ulrich, and Peter Hartz. Eutrophication and Wastewater Purification. *Angewandte Chemie - International Edition in English.* v.15 n.6 1976 p.354-365.

79. Ry Young and Hans Bremer. Analysis of Enzyme Induction in Bacteria. *Biochem Journal*. v.152 1975 p.243-254.
80. Walter E. Phillips, Jr. and Jerome J. Perry. *Thermomicrobium fosteri* sp. nov. a Hydrocarbon-Utilizing Obligate Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology* v.26 n.2 1976 p.220-225.
81. H. Laudelout, R. Lambert et M.L. Pham. Influence de pH et de la Pression Partielle d'Oxygène sur la Nitrification. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1976 v.127A p.367-382.
82. J.G. Zeikus and M.R. Winfrey. Temperature Limitation of Methanogenesis in Aquatic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* v.31 n.1 1976 pg.99-107.
83. Richard L. Moore and Robert R. Brubaker. Effect of cis-Platinum (II) diamminodichloride on Cell Division of *Hyphomicrobium* and *Caulobacter*. *Journal of Bacteriology* v.125 n.1 1976 p.317-323.
84. J.A.M. Bont and Renée A.J.M. Albers. Microbial metabolism of ethylene. *Journal of microbiology and Serology*. v.42 1976 p. 73-80.
85. J.A.M. de Bont. Bacterial degradation of ethylene and the acetylene reduction test. *Canadian Journal of Microbiology*, v.22 n.7 1976 p.1060-1062.
86. J.A.M. de Bont and M.W.M. Leijten. Nitrogen Fixation by Hydrogen Utilizing Bacteria. *Arch. Microbiology* v.107 1976 p.235-240.
87. Florian Domka and Jan Gasiorek. Effect of the Concentration of Nitrogen Compounds on Microbial Reduction of Sulphates. *Acta Microbiologica Polonica* v.7 (27) n.4 1975 p.259-262.
88. J.W. de Kwaadsteniet, J.C. Jager and A.H. Stouthamer. A Quantative Description of Heterotrophic Growth in Micro-organisms. *Journal Theor. Biology* v.57, 1976, p.103-120.

89. E.C.Hatchikian. Purification and Properties of Thiosulfate Reductase from *Desulfovibrio gigas*. *Arch. Microbiology* v.105 1975, p.249-256.
90. J.D.Walker and R.R.Colwell. Enumeration of Petroleum-Degrading Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. v.31, n.2, 1976, p.198-207.
91. Idem. Measuring the Potential Activity of Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* v.31, n.2, 1976, p.189-197.
92. B.A.Silverberg, P.T.S.Wong, and Y.K.Chau. Localization of Selenium in Bacterial Cells Using TEM and Energy Dispersive X-Ray Analysis. *Archive of Microbiology* v.107, 1976, p.1-6.
93. J.D.Nelson, W.Blair, F.E.Brinckman, R.R.Colwell, and W.P.Iversen. Biodegradation of Phenylmercuric Acetate by mercury-Resistant Bacteria. *Applied Microbiology* v.26, n.3, 1973, p.321-326.
94. Phenotypic Characterization of *Beneckea parahaemolytica*: A Preliminary Report. Paul Baumann and Linda Baumann. *Journal of Milk and Food Technology* v.36, n.4, 1973, p.214-219.
95. Michael T.Madigan and Thomas D. Brock. Photosynthetic Sulfide Oxidation by *Chloroflexus aurantiacus* a Filamentous, Photosynthetic, Gliding Bacterium. *Journal of Bacteriology* v.122, n.2, 1975, p.782-784.
96. Colette Berger. Louis Laydevant et Renée Bernard. Utilization de l'Objectif de Lohansson pour l'Obtention de Diagrammes de Diffraction d'Electrons Lents. *Journal de Microscopie*. v.22, n.1, 1975, p.1-14.
97. F.M. Harold Chemiosmotic Interpretation of Active Transport in Bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.227, 1974, p.297-311.

98. Julius Adler. Chemotaxis in Bacteria. Annual Review of Biochemistry v.44, 1975, p.342-355.
99. L.A.Chambers and P.A.Trudinger. Are Thiosulfate and Trithionate Intermediates in Dissimilatory Sulfate Reduction. Journal of Bacteriology v.123 n.1 1975 p.36-40.
100. D.P.Labeda, Kang-Chien Liu, and L.E.Casida Jr. Colonization of Soil by Arthrobacter and Pseudomonas Under Varying Conditions of Water and Nutrient Availability as Studied by Plate Counts and Transmission Electron Microscopy. Applied and Environmental Microbiology. v.31, n.4, 1976, p.551-561.
101. L.E.Casida Jr. Continuously Variable Amplitude Contrast Microscopy for the Detection and Study of Microorganisms in Soil. Applied and Environmental Microbiology v.31, n.4, 1976, p.605-608.
102. J.A.Wohlhieter, P.Gemski Jr., and L.S.Baron. Extensive Segments of the Escherichia coli K12 Chromosome in Proteus mirabilis diploids. Molec.gen.Genet. v.139, 1975, p.93-101.
103. M.L.Fields and P.P.Chen Lee. Epores of Thermophilic Bacteria in Soil. Journal of Food Science v.40, 1975, p.384-385.
104. Karl Z.Morgan. Suggested Reduction of Permissible Exposure to Plutonium and Other Transuranium Elements. American Industrial Hygiene Association Journal August 1975, p.567-575.
105. J.G.Jones. Some Observations on the Occurrence of the Iron Bacterium Leptothrix ochracea in Fresh Water, Including Reference to Large Experimental Enclosures. Journal Applied Bacteriology v.39, 1975, p.63-72.

ANEXO I

Tabela I

Influência da Radiação Ultravioleta em
Colonias de Thiobacillus Ferrooxidans *

Número presumível de germens semeados em cada placa 15.000			
Tempo de irradiação	15 seg.	5 min.	10 min.
Nº de colônias que desenvolveram após a irradiação	3.215	2.053	914
Temperatura do cultivo	8°C	8°C	8°C

Tempo de desenvolvimento = 8 dias

Dose de Ultravioleta fonte 237,5 nm $1 \text{ erg.} \times \text{mm}^2 \times 10^4$

* O Thiobacillus ferrooxidans sem receber irradiação não se desenvolveu quando cultivado a 8°C, no mesmo meio de cultura sólida.

Tabela II

Desenvolvimento dos germens em colonias irradiadas

Irradiação anterior	15 seg.	5 min.	10 min.
Nº de tubos cultura	3.215	2.053	914
Nº de tubos cultura que em 8 dias tiveram 25 germens por campo	208	151	85
Temperatura cultivo	8°C	8°C	8°C

Campo microscópico 40 x 15

Tabela III

Desenvolvimento Bacteriano a 8°C

TEMPO DE IRRADIAÇÃO ANTERIOR	15 seg.					5 min.					10 min.				
DIAS	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8	4	5	6	7	8
Aparecimento de 25 germens/campo. nº de tubos	0	75	80	50	3	0	50	60	25	16	0	28	40	11	8
Nº total de tubos de cultura	208					151					85				

Tabela IV

Seleção de culturas

Tempo de irradiação anterior	15 seg.	5 min.	10 min.
Nº de tubos de cultura	75	50	28
Nº de tubos de cultura selecionados	60	30	10

Tempo de desenvolvimento = 5 dias

Número mínimo de germens por campo = 25

Temperatura de cultura = 8°C

Tabela V

Influência do tempo na capacidade oxidante das Estirpes I e II a 8°C

Dias de Cultura \ D.O.	0,2	0,50	0,75	1,0
5	6 tubos	0	0	0
6		8 tubos	0	0
7			8 tubos	0
8			12 tubos	0
9			19 tubos	0
10			25 tubos	0
11			28 tubos	0
12			30	20 tubos

D.O. = Densidade Ótica em filtro 530 nm.

Tabela VI

Influência do tempo na capacidade oxidante do *Thiobacillus ferrooxidans* Mo. tolerante cultivado a 30 - 35°C

Dias \ D.O.	0,20	0,50	0,75	1,0
2	+			
3		+		
4			+	
5			+	
6				+

Temperatura de cultivo - 30° - 35°C

Filtro 530 nm

Tabela VII
Lixiviação estática a 8°C e a 30-35°C

Tipo de Thiobacillus	CONDIÇÕES OPERACIONAIS			RESULTADOS OBTIDOS	
	Relação M/L	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Concentração de U ₃ O ₈ no licor (g/l)	Solubilização de U ₃ O ₈ (%)
8°C	1:1	8	15	0,81	95,3
	1:1	8	30	0,74	87,1
Mo tolerante	1:1	30 - 35	15	0,81	95,3

Teor inicial do minério - 0,085% de U₃O₈

Granulometria - 1/8"