

## BACTÉRIAS SOBREVIVEM NA PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO DA USINA NUCLEAR DE ANGRA 1 – RIO DE JANEIRO

Darcy Muniz Almeida\*, Bianca C. A. Cabral \*\*, Victor H. Dias\*\*, Rosane Silva\*\*, Cristina A.G. Nassar\*

\* Programa de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, darcymuniz@poli.ufrj.br

\*\*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro

### RESUMO

As usinas nucleares no mundo estão em processo de extensão da sua vida útil de 40 para 60 anos de operação. A Usina Nuclear de Angra 1, com esta finalidade, vem realizando uma reavaliação de engenharia em todo seu projeto. A Piscina de Combustível Usado (PCU) é uma das áreas a serem estudadas visando demonstrar sua integridade e capacidade de armazenamento dos elementos combustíveis de forma segura e possibilitar o prolongamento da vida útil da usina. Microrganismos que se desenvolvem no *liner* do Canal de Transferência de Combustível (CTC) e na PCU de uma usina podem formar filmes bacteriológicos resistentes à alta radiação. Ocorrências desse tipo já foram observadas em unidades de outros países, no entanto, até o momento nenhum estudo desse tipo foi realizado no Brasil. Este trabalho pretende obter o inventário de microrganismos presentes e direcionar as ações preventivas para mitigar o crescimento das possíveis bactérias que venham a prejudicar a qualidade da água e/ou integridade do *liner*. Foram coletadas 14 amostras na superfície do revestimento do CTC, da PCU e nos drenos do Edifício de Combustível (ECB) de Angra 1. Parte das amostras foram utilizadas para o crescimento e isolamento de bactéria em meio de cultura e posterior identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA por método de Sanger. A bactéria *A. xylosoxidans* isolada nas culturas é comum no ambiente. As bactérias resistiram e sobreviveram a uma exposição à radiação de 416000  $\mu\text{Sv/h}$  (alta radiação). A ação corrosiva de bactérias em superfícies do *liner* deve ser vista com cuidado, no entanto, não foi encontrado na literatura que a espécie identificada ofereça esse tipo de risco. Uma vez que a água da piscina já é tratada e a bactéria presente é comum no ambiente, não há o que ser recomendado para evitar a sua existência de *A. xylosoxidans* nesse local e suas adjacências. No entanto, recomenda-se a monitoração periódica, para avaliar sua evolução e analisar medidas preventivas, visando não comprometer a integridade da piscina.

**PALAVRAS-CHAVE:** Usina de Combustível Nuclear, Piscina de Combustível, Bactérias.

### INTRODUÇÃO

A energia nuclear vem, nos últimos anos, se tornando uma opção importante na geração de energia elétrica no mundo. A vida útil de uma usina nuclear é de 40 anos, no entanto, muitas usinas estão estendendo a sua vida útil para 60 anos.

A Central Nuclear Almirantes Alvaro Alberto na Usina Nuclear de Angra 1, cuja a Piscina de Combustível Usado (PCU) está localizada no Edifício de Combustível (ECB), e sua capacidade armazenamento nos *racks* supercompactos é de 1252 elementos combustíveis, possui uma profundidade de 12 metros e é projetada para armazenar com segurança os elementos combustíveis irradiados (ALMEIDA, 1999). A PCU é permanentemente preenchida com água enriquecida com Boro e purificada em um sistema de *loop* fechado, que inclui filtragem e desmineralização de processos que garantem a alta pureza da água. A temperatura é mantida estável pela permanente circulação da água. Os parâmetros físico-químicos e radioquímicos da dessa água são analisados semanalmente (ELETRONUCLEAR, 2016). O projeto da PCU assegura que qualquer vazamento, através de micro trincas no revestimento de aço inoxidável (*liner*), seja direcionado para os drenos através de canaletas e, posteriormente, e a água conduzida através de tubulação para os tanques de rejeitos de forma segura.

A formação na água por biofilme de microrganismos (SARRO et al., 2005) já causou preocupação em usinas na República Eslováquia, Canada e Espanha (IAEA, 1997, SARRO et. al. 2005 e CHICOTE et. al. 2004). Nenhum estudo nesse sentido já foi realizado no Brasil.

### OBJETIVO

Detectar e identificar a ocorrência de microrganismos na superfície do *liner* e drenos da PCU da Usina Nuclear de Angra 1.

## METODOLOGIA

### Parâmetros físico – químicos, radioquímicos e radiométricos da água

Em 26 de fevereiro de 2014, foi realizada uma avaliação radiométrica no interior da PCU e CTC. A medição foi realizada com o auxílio do equipamento FH 40 GL Radiometer Série 22676, que foi posicionado em 10 diferentes pontos e profundidades.

### Coleta das amostras

Inicialmente foi realizada uma amostragem piloto para a avaliação radiológica preliminar de uma amostra foi realizada pelos Laboratório de Química e de Proteção Radiológica na Usina Nuclear de Angra 1. Apenas após a constatação de que o material não oferecia risco ambiental e a saúde dos envolvidos foi realizada a coleta das amostras. O transporte foi liberado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear de Angra 1 para o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Laboratório de Metabolismo Macromolecular “Firmino Torres de Castro” da Universidade Federal do rio de Janeiro.

### Coleta das Amostras

Foram coletadas 14 amostras em quatro áreas distintas, ou seja, nas superfícies do “liner” (dentro d’água) do CTC e da PCU e no interior dos drenos (secos e úmidos). Cada amostra foi coletada com o auxílio de um SWAB estéril com haste de plástico em tubo sem meio de cultura. As amostras foram coletadas em diferentes pontos a 15 cm abaixo da linha d’água, no CTC (4 amostras) e da PCU (4 amostras). Nos drenos secos (DS) foram coletadas 3 grupos de amostras: DS1 – amostra coletada nos drenos 1, 3 e 4; DS2 - amostra coletada nos drenos 6, 7 e 8 e DS3 - amostra coletada nos drenos 2, 15, 18 e 19. Também nos drenos úmidos (DU) foram coletadas 3 grupos de amostras: DU4 - amostra coletada nos drenos 2, 5 e 9; DU5 - amostra coletada nos drenos 10, 11 e 13 e DU6 - amostra coletada nos drenos 14, 16 e 17. Após a amostragem os suabes foram imediatamente inseridos no tubo estéril, etiquetados e armazenados em caixa de isopor, sem gelo.

### Crescimento, isolamento e sequenciamento de colônias de microorganismos

Para o crescimento dos microorganismos foi realizado um esfregão com os cotonetes em meio de cultura LB agar fresco em placas de Petri. As placas foram mantidas a 37°C ou a 55°C por 16 h. Após esse período foi inspecionada a formação de colônias de bactérias nas respectivas placas. Em uma amostra colhida em dreno úmido (DU5) foi observado o crescimento de bactérias em placa mantida a 37°C por 16 horas. O isolamento das colônias foi realizado através da sequencia de três replaqueamentos no mesmo meio de cultura. Para a identificação da bactéria foi utilizado o gene do 16S rRNA como alvo para o sequenciamento e posterior comparação e busca de similaridade com o banco de dados de sequencias bacterianas. Para tal, uma colônia isolada da bactéria foi crescida em meio LB líquido por 16 hrs a 37°C com agitação. A cultura em meio líquido foi centrifugada a 5000 rpm a 4°C em rotor SSA na centrífuga Sorvall. O precipitado de células foi submetido a extração de DNA total pelo método orgânico utilizando fenol:clorofórmio modificado de BLIN & STAFFORD, 1976. Após a extração foi realizada a quantificação do DNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Uma alíquota do DNA (10 ng) foi submetida a reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene 16S rRNA envolvendo as regiões hipervariáveis V1 a V8 do gene 16S rRNA. Os iniciadores utilizados foram a sequencia sendo: 5'-TWACACATGCAAGTCGARCG-3'; e a sequencia antisense 5'-CGAGTTGCAGACTVCAATCCG-3'. A reação continha 0,2 mmol de cada iniciador, 0,1mM de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (ThermoFisher Scientific®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific®), 2,5 unidades de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) com o respectivo tampão 10X (Invitrogen®) e quantidade necessária de H<sub>2</sub>O Milli-Q autoclavada para 50 µl. A reação foi amplificada em termociclador Veritis (Thermofisher) utilizando o protocolo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 26 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto do gene 16s rRNA amplificado foi sequenciado utilizando o BigDyeTerminator Cycling Sequencing Kit v3.1 (Life Technologies). As amostras prontas para o sequenciamento foram aplicadas numa placa de 96 poços e inseridas no Analisador Genético 3500 (Applied Biosystems). A sequencia obtida para o gene 16S rRNA foi de 1045 pares de bases. Após o sequenciamento, os resultados foram analisados no programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems) e Geneious™ 8.1.3 (Biomatters) para, através dos eletroferogramas, ser feita a análise da qualidade das sequencias. Em seguida, a sequencia consenso foi submetida a ferramenta de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados nr de bactérias. As sequencias homologas encontradas pela busca do BLASTn foram baixadas e o alinhamento foi realizado usando o software CLC *genomics workbench*. O algoritmo utilizado foi o Neighbour Joining, medida de distância de Jukes Cantor com *bootstrap* de 1000 replicatas.

## Licença para análise das Amostras

As amostras foram coletadas, através da Licença de Trabalho Radiológico N° 543 no dia 09/12/15 entre 9:45 h e 11:35 h, com a temperatura da água da PCU em 35°C e EL. 17,45 da lamina d'água, após a coleta na PCU e nos drenos foram levadas ao Laboratório Químico na Área Controlada para realização da espectrometria das 14 amostras. Tendo sido liberadas radiologicamente dentro dos limites permitidos para transporte, pela CNEN, no dia 10/12/15. No dia 16/12/15 as amostras nos respectivos suabes foram acondicionadas dentro de uma caixa de isopor na Divisão de Proteção Radiológica no Edifício de Administração de Angra 1, e transportadas de Angra 1 para o IBCCF, de acordo com o Plano de Transporte PF 06-15, sem nenhuma anormalidade e recebidas no IBCCF. No laboratório as amostras foram mantidas por cinco dias em geladeira a temperatura ambiente do laboratório 25° C para posterior análise.

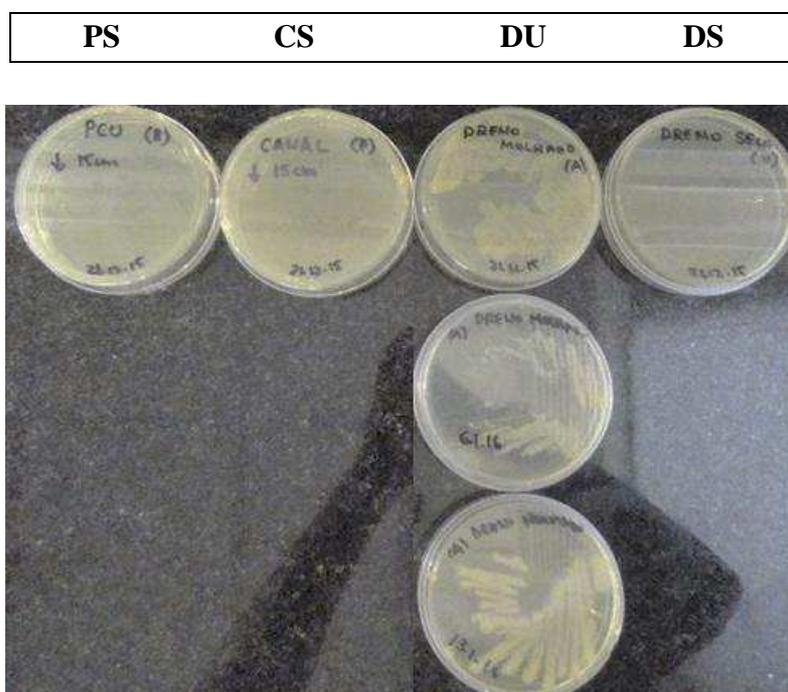
## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Levantamento Radiométrico da PCU

O levantamento radiométrico indicou um valor máximo de 416000  $\mu\text{Sv/h}$  a cerca de 8 metros de profundidade na PCU. Os parâmetros físico-químicos e radioquímicos da qualidade da água, são analisados semanalmente estando todos os valores dentro dos limites esperados, são eles: Condutividade Específica < 20  $\mu\text{S/cm}$ , Gama total, pH entre 4 ~ 4,7, Fator de descontaminação I-131 > 10, Boro total entre 2.500 mg/L ~ 3.000 mg/L, Cloreto < 150  $\mu\text{g/L}$ , Fluoreto < 150  $\mu\text{g/L}$ , Sílica Total, Sólidos em Suspensão < 50  $\mu\text{g/L}$ , Sulfato < 150  $\mu\text{g/L}$  (ELETRONUCLEAR, 2016).

### Isolamento de bactéria

Dentre as placas incubadas, apenas uma originada do SWAB da amostra do dreno úmido (DU5) foi observado o crescimento de bactérias em método de cultura padrão a 37°C por 16 horas. Nas outras 3 amostras PS, CS e DS visualmente não houve crescimento de bactérias (Figura 1).



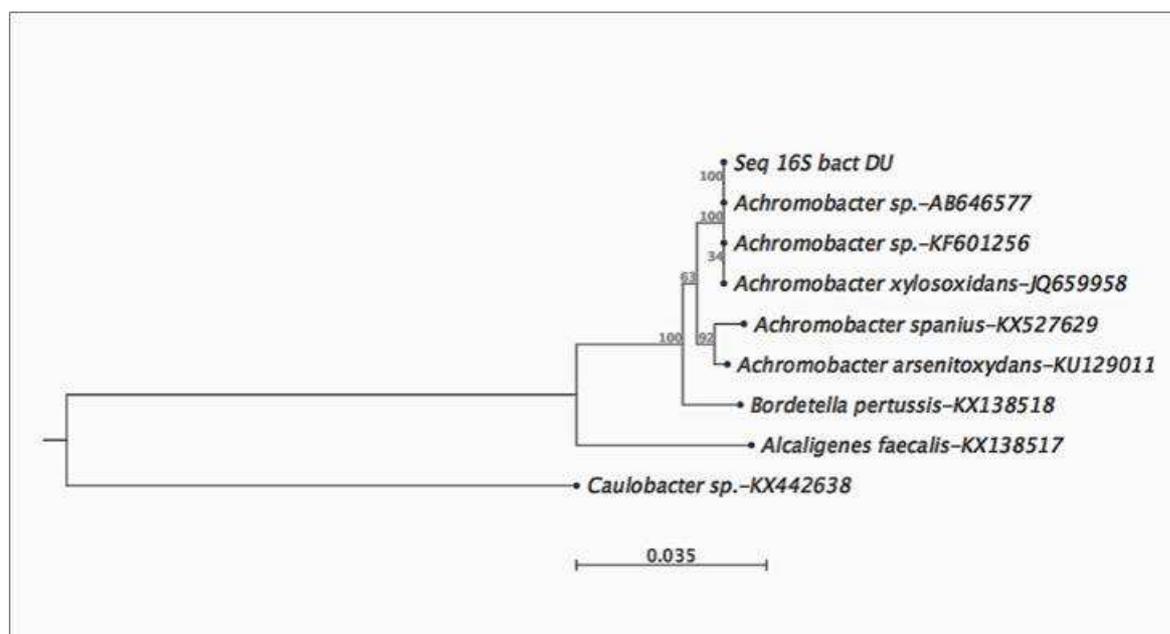
**Figura 1:** Ilustração das Placas de Petri contendo meio LB ágar, cujo ensaio para o crescimento de bactérias dos suabes recolhidos na PS (piscina submerso); CS (canal de transferência); DU-5 (dreno úmido) e DS (dreno seco) foram testados por esfregação por 16 horas a 37°C. A foto foi registrada após terem sido mantidas a 4°C por 10 dias. Fonte: Autor (2016).

A bactéria isolada da colônia proveniente da amostra DU5 apresentou a sequência do gene 16S rRNA, conforme apresentada na Figura 2. Esta sequência consenso de 1045 pares de bases foi submetida a análise filogenética produzindo a árvore NJ bootstrap de 1000 replicatas (Figura 3).

```

LOCUS Seq_16S_bact_DU 1045 bp DNA linear UNA 04-Jun-2016
  1  GCTAATACCG CATAACGCCCT ACGGGGGAAA GCAGGGGATC TTCGGACCTT GCACTATTGG
 61  AGCGGCCGAT ATCGGATTAG CTAGTTGGTG GGGTAACGGC CTACCAAGGC GACGATCCGT
121  AGCTGGTTTG AGAGGACGAC CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
181  GAGGCAGCAG TGGGGAATTT TGGACAATGG GGGAAACCCT GATCCAGCCA TCCCGCGTGT
241  GCGATGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTTGGCAGGA AAGAAACGTC GCGGGCTAAT
301  ACCCCGCGAA ACTGACGGTA CCTGCAGAA AAGCACCAGG TAACTACGTG CCAGCAGCCG
361  CGGTAATACG TAGGGTGCAA GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG TCGCAGGGCG
421  GTTCGGAAAG AAAGATGTGA AATCCCAGAG CTTAACTTTG GAACTGCATT TTAACTACC
481  GGGCTAGAGT GTGTCAGAGG GAGGTGGAAT TCCGCGTGTA GCAGTAAAT GCGTAGATAT
541  GCGGAGGAAC ACCGATGGCG AAGGCAGCCT CCTGGGATAA CACTGACGCT CATGCACGAA
601  AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCCTAAAC GATGTCAACT
661  AGCTGTTGGG GCCTTCGGGC CTTGGTAGCG CAGCTAACGC GTGAAGTTGA CCGCCTGGGG
721  AGTACGGTCG CAAGATTTAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG ACCCGCACAA GCGGTGGATG
781  ATGTGGATTA ATTTCGATGCA ACGCGAAAAA CCTTACCTAC CCTTGACATG TCTGGAATGC
841  CGAAGAGATT TGGCAGTGCT CGCAAGAGAA CCGGAACACA GGTGCTGCAT GGCTGTCGTC
901  AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT GTCATTAGTT
961  GCTACGAAAG GGCACCTCTA TGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC
1021  GTCAGTCTCT CATGGCCCTT ATGGG
    
```

**Figura 2:** Sequência do gene 16S rRNA identificada para a colônia de bactéria isolada da amostra do dreno DU5. Fonte: Autor (2016).



**Figura 3:** Árvore filogenética de seqüências 16S rDNA do isolado bacteriano (*Seq 16S bact DU*) e de bactérias disponíveis em bases de dados públicas. A barra representa 0,035 divergência de seqüência. Os códigos indicados após o nome das espécies representam o acesso ao GenBank. Fonte: Autor (2016).

As análises levaram a identificação da bactéria como *Achromobacter sp.* e/ou *A. xylosoxidans* Yabuuchi and Yano 1981. Reino Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Betaproteobacteria; Ordem: Burkolderiales; Família: Alcaligeneaceae; Genero: *Achromobacter*; Espécie: *A. xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) Yabuuchi and Yano 1981. Essa espécie de bactéria gram-negativa ocorre no solo e na água e tem sido associada a infecções e bacteremias em pacientes imunocomprometidos (CDC, 2008).

A água da piscina é, a princípio, desfavorável a formação de microrganismos por possuir alta taxa de radioatividade. No momento da coleta existia 894 elementos irradiados, armazenados com atividade na ordem de 0,416 Gy, conforme "Levantamento Radiométrico da PCU em 26/02/14" (Fonte: Eletronuclear – Divisão de Proteção Radiológica). Sendo assim a bactéria *A. xylosoxidans* sobreviveu a uma alta exposição na PCU antes de ser captada pelo dreno. Apesar dessa bactéria ser patogênica ao homem, trabalhadores do entorno da piscina e os mergulhadores não

entram em contato com a água durante as atividades de rotina. Todos sem exceção devem utilizar, durante todo o tempo de serviço, equipamento de proteção individual apropriado à atividade em ambientes contaminados. O sistema de transferência de combustível e os *liners* são inspecionados e preventivamente são executadas manutenções preventivas, por mergulhadores especializados, que apesar permanecerem submersos, utilizam trajes que os isolam da água contaminada (ALMEIDA, 2002). O presente estudo não realizou amostras de bactérias presentes no ar, para a qual os trabalhadores do entorno, não possuem equipamento de proteção específico (ex. máscara).

A ação corrosiva de bactérias em superfícies deve ser vista com cuidado, no entanto, não foi encontrada na literatura que a espécie identificada ofereça esse tipo de risco. Outras usinas já detectaram em PCUs a formação de biofilmes compostos por microrganismos tais como: microalgas; bactérias gram-positivas e gram-negativas e até mesmo coliformes patogênicos (IAEA, 1997).

No presente estudo as amostras (suabe) não apresentaram níveis significativos de radionúclídeos, razão pela qual atenderam todos os critérios previstos a remoção e liberação do transporte para fora de Angra 1. Não termos evidência do aumento nos níveis de radiação na parede da piscina provenientes dos microrganismos através de formação de biofilmes, tampouco, problemas relacionados à bioincrustação ou biocorrosão dos materiais utilizados no sistema de água de arrefecimento que causem o aumento da radioatividade na água da piscina.

## CONCLUSÃO

As bactérias percorrem o trajeto a partir da borda da PCU até atingir os drenos, indicando que elas resistiram e sobreviveram a exposição à radiação de 416000  $\mu\text{Sv/h}$  (alta radiação).

A ação corrosiva de bactérias em superfície isolante “*liner*” deve ser vista com cuidado, no entanto, não foi encontrada na literatura que a espécie identificada ofereça esse tipo de risco.

A bactéria *A. xylosoxidans* isolada nas culturas é comum no ambiente, recomenda-se a monitoração periódica para avaliar sua evolução e analisar medidas preventivas, se necessário, visando não comprometer o ambiente nesse local e suas adjacências.

Os dados indicam que o método de análise e tratamento da água da piscina são adequados, uma vez que os microrganismos não apresentaram crescimento excessivo.

Recomenda-se o estabelecimento de um protocolo de análise microbiológica da água da PCU, CTC e dos drenos do ECB de caráter preventivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, D. M. Manutenção Subaquática do Sistema de Transferência de Combustível. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2002, Rio de Janeiro. XIII ENFIR - National Meeting of Reactor Physics and Thermal Hydraulics, 2002.
2. ALMEIDA, D. M. Racks Supercompactos de Angra 1. In: VII CGEN - CONGRESSO GERAL DE ENERGIA NUCLEAR, VII. 1999, Belo Horizonte. Anais... CGEN: Belo Horizonte. 1999.
3. BLIN, N and Stafford, W.D. 1976. A General Method for Isolation of High Molecular Weight DNA from Eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 3 (9): 2303-2308.
4. CDC, 2008. *Emerging Infectious Diseases*. 2008. Vol. 14, No. 7. Disponível em <http://www.cdc.gov/eid> . Acesso: 27 de junho de 2016.
5. CHICOTE, E.; MORENO, D.A.; GARCÍA, A.M.; SARRÓ, M.I.; LORENZO, P.I.; MONTEIRO, F. Biofouling on the walls of a spent nuclear fuel pool with radioactive ultrapure water. *Biofouling*, v.20, p.35-42, 2004.
6. ELETRONUCLEAR, 2016. ANGRA 1. Disponível em: <<http://www.eletronuclear.gov.br/AEmpresa/CentralNuclear/Angra1.aspx>>. Acesso em 14 jan. 2016.
7. IAEA. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Further analysis of extended storage of spent fuel. In: Final report of a co-ordinated research programme on the behaviour of spent fuel assemblies during extended storage (BEFAST-III) 1991-1996. Viena. 1997.
8. MØLLER, A.P, MOUSSEAU, T.A. The effects of natural variation in background radioactivity on humans, animals and other organisms. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* v.88, p.226–254, 2013.

9. RAGON, M.; RESTOUX, G.; MOREIRA, D.; MØLLER, A. P.; GARCIA, P. L.. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl Ionizing-radiation levels. *Unite´ d'Ecologie, Systematique et Evolution - CNRS UMR8079, Universite´ Paris-Sud, Orsay, France*. 2014.
10. RAINEY, F.A., RAY, K., FERREIRA .M, GATZ, B.Z., NOBRE, M.F., BAGALEY, D., RASH, B.A., PARK, M.J., EARL, A.M., SHANK, N.C., SMALL, A.M., HENK, M.C., BATTISTA, J.R., KÄMPFER, P., COSTA, M.S. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol*. v.71, n.9, p.5225-5235, 2005.
11. RUIZ-GONZÁLEZ, M., CZIRJÁK, G., GENEVAUX, P. Resistance of feather-associated bacteria to intermediate levels of ionizing radiation near Chernobyl. *Scientific Reports*, v.6, p.229-269, 2016.
12. SARRÓ, M. I.; García, A. M.; Moreno, D. A. Biofilm formation in spent nuclear fuel pools and bioremediation. *International Microbiology*, 8(3):223-230, 2005.
13. YABUUCHI, E., AND YANO, I. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol*. v.31, p.477-478, 1981.