

**II-168 - APLICAÇÃO DE BIOMASSA BACTERIANA PARA BIOTRATAMENTO DE REJEITOS RADIOATIVOS LÍQUIDOS CONTENDO AMERÍCIO-241****Tania Regina de Borba<sup>(1)</sup>**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Santo Amaro. Mestre em Ciência na Área da Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo. Doutoranda em Ciência na Área da Tecnologia Nuclear na Universidade de São Paulo.

**Solange K. Sakata**

Graduada em Química bacharelado e licenciatura pela Universidade de São Paulo. Doutorado na área de Química Orgânica, com ênfase em Eletrossíntese Orgânica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Pós-doutorado em Biotecnologia no Scripps Institution of Oceanography na University of California-San Diego -USA) e no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN- SP / CNEN)

**Marcos M. Goes**

Técnico em Química do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN- SP / CNEN).

**Rafael V. P. Ferreira**

Graduado em Biomedicina pela FMU (Faculdades Metropolitanas Unidas). Mestre em Ciência na Área de Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo. Doutorando em Ciência na Área da Tecnologia Nuclear na Universidade de São Paulo.

**Durvanei Augusto Maria**

Mestre em Imunologia pela Universidade de São Paulo, Doutor em Imunologia pela Universidade de São Paulo e possui Doutorado / Doutorado-Sandúich pela Universidade de Paris VII Denis Diderot. Atualmente é Pesquisador Científico VI do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

**Elisabete José Vicente**

Graduada em Química pela Universidade de São Paulo e Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo. Atualmente é pesquisadora da Universidade de São Paulo.

**Júlio T. Marumo**

Graduado em Química Bacharelado com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Presbiteriana Mackenzie. Mestre em Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo e Doutor em Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo. Atua no Centro de Rejeitos Radioativos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares desde 1987.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP BRASIL- Tel: (11) 3133.9751 - e-mail: [trborba@ipen.br](mailto:trborba@ipen.br)

**RESUMO**

A radioatividade é um fenômeno natural e fontes naturais de radiação são características do ambiente. Radiação e substâncias radioativas têm inúmeras aplicações benéficas, entre as quais destacam-se a geração de energia para usos na indústria, medicina e agricultura. Os riscos da radiação para os trabalhadores, público e meio ambiente surgem a partir destas aplicações e, necessitam ser avaliados e controlados. Segundo a Agência Internacional de Energia Nuclear, existe a expectativa de que, até 2030 haverá um crescimento significativo do uso da eletricidade e a energia nuclear terá de expandir-se. A produção de energia nuclear, no entanto, está inevitavelmente associada à geração de rejeitos radioativos dos vários estágios do ciclo nuclear. Dos diversos radionuclídeos presentes nestes rejeitos, está o Amerício-241, um elemento transurânico, de meia vida longa (433 anos), um dos contaminantes mais perigosos devido à sua toxicidade. O gerenciamento dos rejeitos radioativos inclui as etapas de coleta, segregação, tratamento, acondicionamento, transporte e disposição final. O tratamento de rejeitos radioativos líquidos merecem atenção especial pois as técnicas convencionais de tratamento disponíveis são, muitas vezes caras e operacionalmente difíceis. A pesquisa de novas tecnologias envolvendo a remoção de radionuclídeos dos rejeitos líquidos tem dirigido atenções para a biossorção e bioacumulação, ou seja, a utilização de biomassa para remoção de metais presentes em baixas concentrações de grandes volumes de rejeitos líquidos. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de biorremoção de Am-241 presente em rejeitos líquidos utilizando-se a bactéria *Cupriavidus metallidurans*. Os parâmetros estudados foram a concentração do Am-241 (75, 150 e 300 Bq/mL) e tempo de contato entre a bactéria e a solução (1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas). Os resultados obtidos revelaram alta capacidade de biorremoção de Am-241 pela bactéria

*Cupriavidus metallidurans*. Na primeira hora de contato, houve remoção média de 90% para todas as concentrações estudadas, chegando a 100% de remoção em 6 horas de contato.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cupriavidus metallidurans*, Amerício-241, biotratamento, rejeito radioativo.

## INTRODUÇÃO

A utilização da tecnologia nuclear é crescente, com avanços em diversos campos da atividade humana. Sabe-se, porém, que este e outros tipos de tecnologias ocasionam a geração de resíduos que necessitam de tratamento que garanta níveis seguros de descarte.

Buscar novas alternativas de tratamento dos rejeitos radioativos líquidos que aliem baixo custo e eficiência é uma tarefa importante e difícil, já que, nesse caso, cuidados adicionais devem ser considerados por se tratar de rejeitos radioativos, que estão em estado físico de fácil dispersão.

A pesquisa de novas tecnologias envolvendo a remoção de radionuclídeos de rejeitos tem dirigido atenções para biossorção e bioacumulação (TSEZOS, 2001).

É possível encontrar contradições na literatura quanto ao uso dos termos biossorção e bioacumulação. Entretanto, a bioacumulação pode ser entendida como um processo em que se utiliza biomassa viva, enquanto na biossorção, utiliza-se biomassa inativa. A bioacumulação pode ser definida como absorção de substâncias tóxicas por células vivas. As substâncias tóxicas podem ser transportadas dentro das células, através da membrana celular ou do ciclo metabólico das células (MALIK, 2004). Já o mecanismo de biossorção pode ser definido como a remoção do metal tóxico pela interação com o biossorbente, dentre eles estão as algas (FENG *et al.*, 2004), bactérias (MURALEEDHAAN *et al.*, 1991), fungos (KAPOOR *et al.*, 1999), leveduras (BAYAN *et al.*, 2001) e biopolímeros (TEIXEIRA *et al.*, 1996). A habilidade com que, em soluções diluídas, os micro-organismos concentram os íons metálicos em sua estrutura celular fez com que estes fossem os mais estudados na remoção de vários metais, como por exemplo: Cu, Cd, Pb, U, Am, Ce, Cs, Ni, entre outros (VOLESKY, 1994).

Entre os biossorbentes promissores, está a bactéria *Cupriavidus metallidurans* que é uma  $\beta$ -proteobactéria, Gram-negativa, não patogênica, capaz de crescer em elevadas concentrações de, pelo menos, treze diferentes íons de metais pesados (MONCHY *et al.*, 2006; MERGEAY *et al.*, 2003). *Cupriavidus* (ex. *Ralstonia*) *metallidurans* CH34 é uma bactéria hidrogenotrófica facultativa resistente a metais, bactéria isolada do lodo de um tanque de decantação de zinco na Bélgica, que foi contaminado com altas concentrações de vários metais pesados (MONCHY *et al.*, 2007).

Esta bactéria tem ganhado interesse crescente como um organismo modelo para detoxificação de metais pesados e para fins biotecnológicos. A resistência da bactéria aos cátions de metais de transição é predominantemente baseada na resistência devida aos genes para RND (resistência, a nodulação e a família de proteínas de células de divisão) proteínas (ROZYCKI e NIES, 2009).

Estão relatadas na literatura resistências da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34 a arsenito ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), bismuto ( $\text{Bi}^{+3}$ ), gadolínio ( $\text{Gd}^{+3}$ ), ouro ( $\text{Au}^+$ ), prata ( $\text{Ag}^+$ ), selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), tálio ( $\text{Tl}^+$ ) e urânio ( $\text{U}^{+2}$ ), entretanto, a maioria dos mecanismos ainda não está totalmente esclarecida (BIONDO, 2008).

Diante do exposto, a biossorção e a bioacumulação podem ser métodos viáveis e de baixo custo, de fácil aplicação e eficiente para tratamento de rejeitos radioativos líquidos armazenados no Laboratório de Rejeitos Radioativos do IPEN-CNEN/SP. Esses rejeitos contêm Cs-137, Am-241, U-235,238 e produtos de fissão e são provenientes, principalmente, de centros de pesquisa, e incluem óleos lubrificantes e solventes utilizados em experimentos em geral e operações de descontaminação.

A implantação deste tratamento para rejeitos radioativos requer um estudo detalhado dos parâmetros que envolvem este processo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de remoção de Am-241 de uma solução por *Cupriavidus metallidurans*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação do potencial de remoção de Am-241 por bioissorção e bioacumulação, foi realizada pelo método de batelada em condições estéreis, colocando-se uma solução de Am-241 de concentração conhecida em contato com os bioabsorventes e, estudados os seguintes parâmetros: pH, tempo de contato e concentração.

Previamente aos experimentos de bioacumulação com a bactéria, foram feitos os estudos de C.I.M. (Concentração Inibitória Mínima) com o objetivo de determinar a quantidade mínima de Am-241 capaz de inibir o crescimento da bactéria.

A determinação da viabilidade celular foi realizada em Citômetro de fluxo FACScalibur, Bencton-Dickinson.

### Cultura de *Cupriavidus metallidurans*

A bactéria foi fornecida pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A cepa de *Cupriavidus metallidurans* foi cultivada sob condições aeróbias em caldo nutriente (CN) a 28 °C, conforme especificado pela coleção de culturas, segundo Mergeay *et al.* (1985).

### C.I.M. – Concentração Inibitória Mínima

O estudo do C.I.M foi realizado seguindo a metodologia descrita em NCCLS.2003, utilizando o método de diluições sucessivas em meio de cultura cérebro-coração (BHI- Brain Heart Infusion). Todos os experimentos foram plaqueados em triplicata e observados após 24 horas de incubação em estufa a 37°C.

### Preparo da solução de Am-241 em meio TSM

O meio mínimo TSM-Tris Médium, foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Mergeay *et al.*, 1985.

### Preparo das soluções de Am-241 para o C.I.M.

Foram preparadas soluções de Am-241 em meio mínimo TSM, com atividades de 20, 40, 80, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 800, 1000, 1200, 1400 e 1800 e 2000 Bq/mL, a partir da solução padrão de 2450,50 Bq/mL. As faixas de tolerância estudadas foram de  $7 \times 10^{-4}$  (20) a  $6 \times 10^{-2}$  (2000)  $\mu\text{M}$  (Bq/mL) de  $\text{AmCl}_3$ .

### Experimentos de biorremoval

Para cada experimento, foi utilizado a cultura de bactérias em densidade óptica de 2,5 e soluções de Am-241 preparadas com meio TSM em pH 5, nas concentrações 600 Bq/mL, 300 Bq/mL e 150 Bq/mL, a partir da solução padrão com atividade de 23.229,4 Bq /mL, certificado pelo IRD – Instituto de Radioproteção e Dosimetria CNEN-RJ.

Os experimentos de biorremoval foram realizados adicionando-se a solução de TSM contendo bactérias em soluções de TSM contendo Am-241 nas concentrações desejadas. As soluções foram colocadas em frascos de quartzo e mantidas sob agitação constante a temperatura ambiente por 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas.

Após os tempos de contato, as soluções foram centrifugadas a 2500 giros/min. por 15 minutos e, 1 mL do sobrenadante foi separado para análise por cintilação.

## Preparo das amostras para análise

A quantificação do Am-241 residual, foi realizada por cintilação, com a utilização do aparelho Tri-carb 2100 TR – Liquid Scintillation Analyzer da Packard-Canberra.

## Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado por meio da técnica de citometria de fluxo. Utilizou-se rodamina 123 para detectar a viabilidade celular por meio da atividade respiratória com as bactérias que foram utilizadas nos experimentos de biorremediação. Este teste foi realizado para a confirmação do C.I.M. e avaliação do processo de remoção do amerício, uma vez que a bioacumulação só ocorre com células viáveis.

## RESULTADOS

Para o C.I.M, o crescimento de colônias bacterianas de *C. metallidurans* foi determinada 400 Bq de Am-241.

Nos experimentos de biorremediação de Am-241 com concentrações de 75, 150 e 300 Bq/mL foram obtidos resultados de aproximadamente 95% na primeira hora de contato e, em 6 horas de contato a remoção chega a cerca de 100% para todas as concentrações de Am-241 estudadas.

O gráfico 1 apresenta os resultados da biorremediação de por *Cupriavidus metallidurans*.

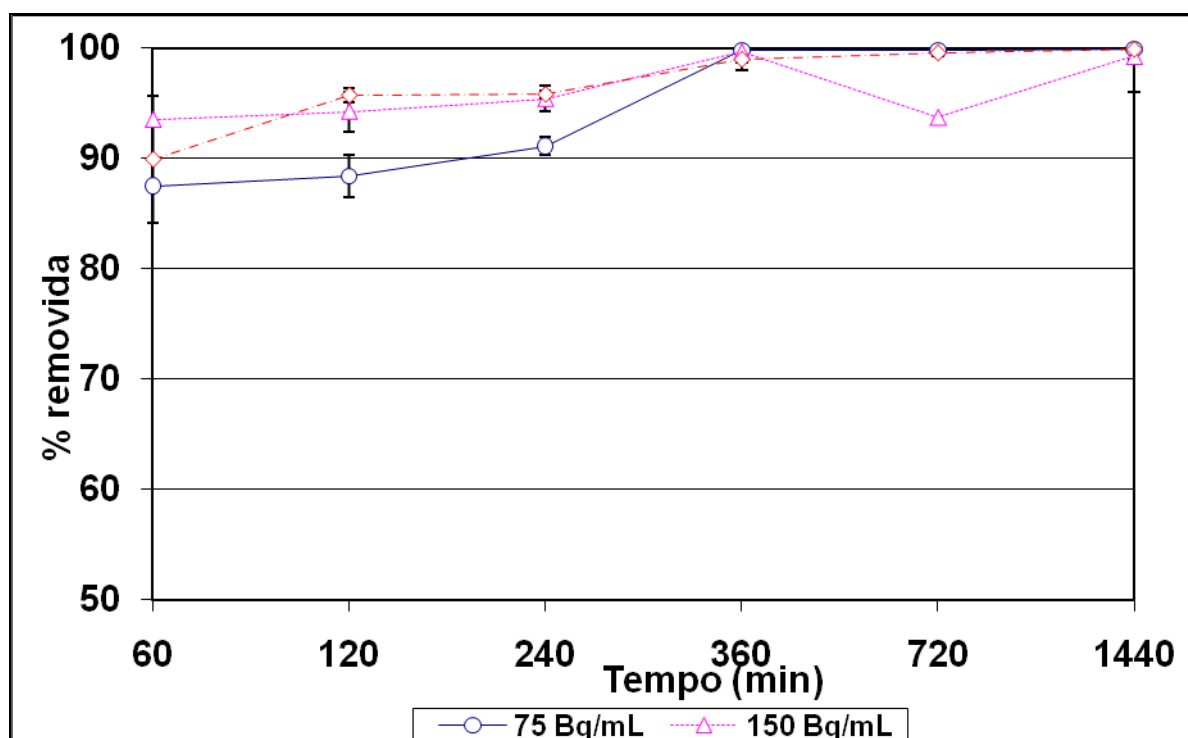


Gráfico 1 – Biorremediação de Am-241 por *Cupriavidus metallidurans* com concentrações iniciais de 75, 150 e 300 Bq/mL.

O gráfico 2 apresenta os resultados dos testes de viabilidade celular realizados a partir das bactérias que tiveram 5 horas de contato com DL-50 (dose letal para 50% da população) de amerício, analisados por da técnica de citometria de fluxo.

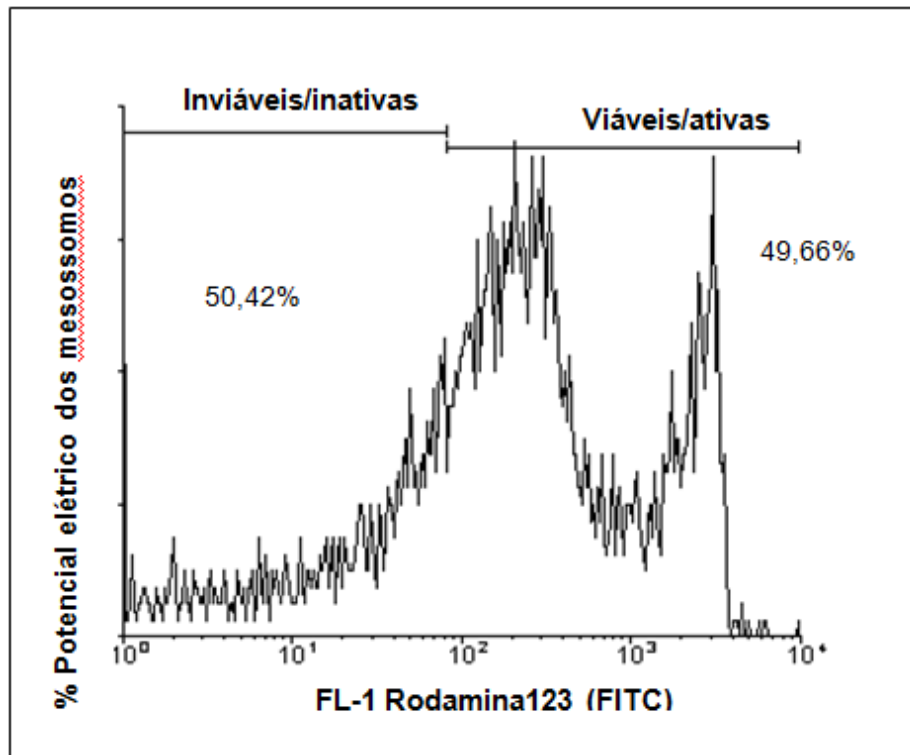


Gráfico 2 - Viabilidade da bactéria *Cupriavidus metallidurans* após 5 h em contato com Am-241 / DL-50.

O resultado da avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo utilizando-se rodamina-123, que determina o potencial respiratório das bactérias, demonstrou que após 5 horas de contato da *Cupriavidus metallidurans* com a DL-50 de Am-241 (200 Bq), 49,66% das bactérias são viáveis.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a bactéria *Cupriavidus metallidurans* tem alta capacidade de biorremocão de Amerício-241, tendo removido em média de 95% de Am-241 em solução nas concentrações de 75, 150 e 300 Bq/mL a partir de apenas 1 hora de contato e, em 6 horas de contato, a remoção média foi de 99,6%.

Os testes de citometria de fluxo confirmaram a Concentração Inibitória Mínima, visto que, 49,66% das bactérias permaneceram viáveis em DL-50, o que pode indicar que tenha ocorrido tanto bioacumulação quanto biossorção para a maior concentração estudada neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAYAN, Y.K.; KESKINLER, B.; CAKICE, A. LEVENT M.; AKAY, G. Removal of divalent heavy metal mixtures from water by *Saccharomyces cerevisiae* using crossflow microfiltration. **Water Resource** v. 35, p. 2191, 2001.
2. BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. Tese apresentada ao Programa de Pós graduação Interunidades em Biotecnologia EP/ FMVZ /IPT /IB /ICB / Butantan da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia., 2008.
3. FENG, D.; ALDRICH, C.; Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima*. **Hydrometallurgy**, v. 73, p. 1, 2004.
4. KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresour Technology**, v. 70, p. 95, 1999.
5. MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International** v. 30, p. 261-278, 2004.

6. MURALEEDHARAN, T.R.; LVENGAR, L. VENKOBACHAR. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. *Curr. Scien.*, v. 61, p. 379-381, 1991.
7. MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHLEGEL, H.G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; GIJGESEM, VAN. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. *Journal of Bacteriology*, v. 162, p 338-324, 1985.
8. MERGEAY, M.; MONCH, S.; VALLAEYS, T.; AUQUIER, V. BENOTMANE, A; BERTIN, P.; DUNN, J.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. V.D.; WATTIEZ, R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p385-410, 2003.
9. MONCHY, S.; VALLAEYS, T.; BOSSUS, A.; MERGEAY, M. Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 86, p. 677-692, 2006.
10. MONCHY, S. ; BEN OTMANE, M. A.; JANSSEN, P.; VALLAEYS, T.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. V. D; MERGEAY, M. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 7417-7425, 2007.
11. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS., . Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. 6 ed. Villanova: NCCLS, 2003. Disp. em:< [http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_publicacoes\\_bac\\_cresc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2009.
12. ROZYCKI, T. V.; NIES, D. H., *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 96, p.115-139, 2009.
13. TEIXEIRA, J. A.; ARAÚJO, M. M. Remoção de cromo de efluentes industriais utilizando géis de alginato. V CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 5, Aveiro, 1996. v.. 2. ISBN 972-569-088-5. Disponível em:< <http://hdl.handle.net/1822/3846> >, acesso em 20/02/2010.
14. TSEZOS, M.; Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 241-243, 2001.
15. VOLESKY, B. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. *FEMS Microbiol, Rev.*, v.14, p. 291-302, 1994.