

II-074 – BIODEGRADAÇÃO DE TRIBUTILFOSFATO EM REJEITO RADIOATIVO LÍQUIDO ORGÂNICO POR COMUNIDADES BACTERIANAS

Rafael Vicente de Pádua Ferreira

Biomédico, Mestre em Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo, Doutorando do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP).

Solange Kazumi Sakata

Química pela Universidade de São Paulo. Doutora em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo. Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN- SP/CNEN) onde desenvolve metodologias de caracterização e tratamento de rejeitos radioativos líquidos.

Fernando Dutra

Químico pela Universidade de São Paulo. Mestre e Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo. Professor e Pesquisador da Universidade Cruzeiro do Sul em São Paulo onde atua na área de Química ambiental.

Maria Helena Bellini

Médica Veterinária, Mestre e Doutora em Ciências pela Unifesp-EPM, trabalha desde 1988 no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) e atua na área de genética molecular.

Júlio Takehiro Marumo⁽¹⁾

Químico, Mestre e Doutor em Tecnologia Nuclear pela Universidade de São Paulo, trabalha desde 1987 no Laboratório de Rejeitos Radioativos e atua na pesquisa e desenvolvimento de métodos de tratamento e caracterização de rejeitos radioativos.

Endereço⁽¹⁾: Av Professor Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária – Butantã - São Paulo - SP - CEP - 05508 - 900 – Fone:(11) 3133-9751 - e-mail: jtmarumo@ipen.br

RESUMO

O tributilfosfato (TBP) possui um grande número de aplicações, em aviões, fluidos hidráulicos, herbicidas, plastificante, e na indústria nuclear. Após o seu uso na área nuclear, o TBP se torna contaminado com radionuclídeos e deve ser tratado como rejeito radioativo. Dentre os vários tipos de rejeitos radioativos existentes, o líquido orgânico representa um grande problema para a sua gestão, porque não pode ser solidificado diretamente com cimento ou tratado com técnicas, como a evaporação ou incineração, que são métodos caros e não estão disponíveis no país. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma metodologia de pré-tratamento para degradar o TBP presente no rejeito líquido orgânico utilizando comunidades bacterianas de modo que este possa ser posteriormente imobilizado em cimento. Este trabalho foi dividido em três etapas: i) Avaliação da presença de micro-organismos pre-éxistentes no rejeito. ii) seleção de duas comunidades bacterianas. iii) experimentos de degradação do TBP. A biodegradação do TBP foi determinada por cromatografia gasosa. Para este trabalho, duas comunidades foram isoladas de áreas impactadas: a mina de urânio de Poços de Caldas (Minas Gerais, Brasil) e de sedimentos do canal de São Sebastião (São Paulo, Brasil). Os resultados obtidos mostraram que a comunidade de bactérias isoladas de sedimentos do canal de São Sebastião têm a maior capacidade de biodegradação de TBP, sendo observado um nível de degradação de 84% em 480h. A capacidade de biodegradação de TBP pela comunidade de bactérias isoladas da mina de urânio foi de 80% em 480h. Estes resultados sugerem que a aplicação da comunidade bacteriana isoladas do sedimentos do canal de São Sebastião pode ser um processo de pré-tratamento viável para rejeitos radiativos líquidos orgânicos contendo TBP.

PALAVRAS-CHAVE: Rejeito Radioativo, Tributilfosfato, Biodegradação.

INTRODUÇÃO

O tributilfosfato (TBP) é um líquido não inflamável, não explosivo, incolor e inodoro. É fabricado em larga escala por meio da esterificação do ácido ortofosfórico com o álcool butílico, com uma produção mundial estimada em 3000 e 5000 toneladas anuais. Sua fórmula química é $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{PO}$ (NAKAMURA, 1991; JETOC, 2008). Utilizado como solvente para ésteres de celulose, vernizes, plastificador primário em manufaturas de plásticos, resinas vinílicas, fluido hidráulico, solvente para extração e purificação de metais de terras raras. Como é inodoro, é aplicado como agente anti-espumante, detergente, e em várias emulsões, tintas e adesivos. Na indústria nuclear o TBP é utilizado, geralmente, diluído em dodecano ou n-parafinas e aplicado

no processo de extração por solvente de urânio, plutônio e tório do combustível nuclear irradiado (NAKAMURA,1991; FORBICINI, 1994).

Após o seu uso na área nuclear, o TBP contaminado com radionuclídeos deve ser tratado como rejeito radioativo. Dentre os vários tipos de rejeitos radioativos gerados, o líquido orgânico representa um grande problema porque não pode ser diretamente solidificado com cimento devido à incompatibilidade química entre o rejeito e esta matriz de imobilização, necessitando para isso, de tratamento prévio. A incineração é uma técnica que poderia ser utilizada, mas seu uso nem sempre é justificado devido ao seu alto investimento (HIROMOTO et al, 1999, IAEA, 2004).

Diante deste problema o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia de pré-tratamento para degradar o TBP presentes no rejeito líquido orgânico utilizando comunidades bacterianas, de modo que este possa ser posteriormente imobilizado em cimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em três etapas: i) Avaliação da presença de micro-organismos pre-éxistentes no rejeito. ii) seleção das comunidades bacterianas. iii) Avaliação da capacidade das comunidades bacterianas em degradar o TBP.

I) AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS PRE-ÉXISTENTES NO REJEITO

O rejeito, utilizado neste estudo, é proveniente das atividades de pesquisa e desenvolvimento na área de reprocessamento do combustível nuclear, a qual teve sua operação encerrada na década de 90 do século passado. Este rejeito é composto por uma mistura de água, TBP (230 ppm) e os seguintes radionuclídeos: Am²⁴¹ ($1,7 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^3$ Bq/L), Cs¹³⁷ ($2,7 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$ Bq/L), U (Total) ($4,3 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^2$ Bq/L), Pu²³⁶ ($3,3 \times 10^3 \pm 6,00 \times 10^2$ Bq/L) e Pu²³⁹ ($23,6 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$).

Nesta etapa, avaliou-se a presença de micro-organismos pré-existentes no rejeito, utilizando a técnica de contagem padrão em placas, realizada de acordo com o "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (1995). Foram retiradas assepticamente duas alíquotas de 10 mL do rejeito estudado e transferidas para tubos estéreis contendo 90 mL de solução tampão (pH=7,2), preparada a partir de uma mistura de solução KH₂PO₄ 0,25M e MgCl₂ 0,4M. Com essa solução foram realizadas diluições sucessivas, em um intervalo entre 10⁻¹ e 10⁻⁷, inoculadas em placas de petri contendo ágar padrão para contagem (Acumedia), De cada diluição foram preparadas placas em quadruplicata, duas placas foram reservadas para aerobiose e as outras duas para anaerobiose. Após a homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas em estufa de cultura, a 37 °C, por 48 horas. Para a incubação em atmosfera de anaerobiose utilizou-se jarras de anaerobiose e geradores de CO₂, da Probac do Brasil. Após esse período, procedeu-se a contagem das colônias.

II) SELEÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS

As comunidades bacterianas foram obtidas de amostras de água coletada na mina de urânio de Poços de Caldas (Minas Gerais, Brasil) denominada Bia Lago (BL) e do sedimento do Canal de São Sebastião (SS) (São Paulo, Brasil). Ambos os locais são conhecidos como áreas ambientalmente impactadas, o primeiro pela atividade de extração e tratamento do minério de urânio, e o segundo pelos seguidos vazamentos de hidrocarbonetos. A mina de urânio de Poços de Caldas foi a primeira instalação para a produção de concentrado de urânio no Brasil e operou entre 1982-1995. Os resíduos gerados durante as atividades de mineração são uma fonte de drenagem ácida que promove a solubilização de urânio, tório, rádio e elementos estáveis, como o manganês, ferro, zinco, flúor (Fernandes et al, 1995). O Canal de São Sebastião, no litoral norte do Estado de São Paulo, onde se localiza o mais importante terminal petrolífero do Brasil teve desde sua inauguração em 1974, até o ano de 1997, 305 ocorrências de vazamentos de óleo. (Medeiros & Bicego, 2004)

Para obtenção das comunidades bacterianas foi adicionado 1,0 g de amostra SS e 1 mL da amostra BL em meio mineral (1,0g (NH₄)₂SO₄, 0,2g KH₂PO₄, 1,6g K₂HPO₄, 0,2g MgSO₄.7H₂O, 0,1g de NaCl, 0,01g FeSO₄.7H₂O, e 0,02g CaCl₂.2H₂O em 1000 mL de água deionizada) acrescido de 0,5% TBP e 150 µg/L de cicloheximida. As comunidades foram incubadas em um plataforma de agitação a 28 ° C e 160 rpm por aproximadamente 48 h. Depois de três transferências de série no meio de enriquecimento, as comunidades foram utilizadas no experimento de biodegradação

III) AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM DEGRADAR O TBP

A biodegradação do TBP presente no rejeito radioativo líquido, por comunidades bacterianas foi realizada pelo método de batelada. Antes do ensaio de biodegradação, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. A CIM representa a concentração mínima de uma substância em um meio para a qual não se observa o crescimento de micro-organismos. A CIM dos rejeitos foi determinada pelo método de macrodiluição em caldo, conforme recomendado pelo “National Committee for Clinical Laboratories Standards” (NCCLS, 2003).

As comunidades bacterianas foram repicadas em caldo Luria-Bertani (LB) (Biolife®) e incubadas em estufa a 30°C até a obtenção de uma densidade bacteriana na cultura de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) determinada por espectrofotometria (600nm). Esta suspensão foi diluída 10 vezes em solução salina (NaCl, 0,85%) estéril e, posteriormente, alíquotas de 1 mL desta diluição foram inoculadas em tubos ($1,5 \times 10^7$ UFC/tubo) contendo concentrações dos rejeitos variando de 1% a 64% preparadas com os meios de cultura a serem testados. Após os períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) a 30°C a CIM foi determinada comparando-se o crescimento bacteriano nos tubos contendo as diluições dos rejeitos com o crescimento em tubos controle (sem rejeitos) e por inoculação das comunidades em ágar nutriente (Biolife®).

Para a realização destes ensaios de biodegradação foram preparados inóculos com as comunidades bacterianas, incubando-se em plataforma de agitação (150 rpm) à 30°C, 1 mL das culturas em meio mineral acrescido de 1000 ppm de TBP. Com a obtenção de uma população de micro-organismos igual à 3×10^8 UFC/mL todas as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos. O “pellet” obtido foi lavado duas vezes com solução salina 0,85%. Em seguida as células foram ressuspensas na mesma solução para obtenção de uma suspensão bacteriana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, distribuídas em frascos contendo a quantidade de rejeito mais próxima da CIM para as comunidades testada e meio de cultura PAS (KH_2PO_4 0,2g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0g/L, K_2HPO_4 1,6g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/L). As culturas foram então, incubadas à temperatura de 30°C em plataforma de agitação (150 rpm) durante 96, 240, 480 e 720 horas. Como controles, foram preparados frascos contendo inóculos inativados por calor úmido sob pressão. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Decorrido o tempo de incubação, a reação de degradação foi interrompida autoclavando os frascos e em seguida adicionados 1000 ppm de octano como padrão interno e 5 mL de diclorometano para extração líquido-líquido dos compostos orgânicos. Os frascos foram homogeneizados e analisados por cromatografia a gás no cromatógrafo Agilent 6890N. A separação dos compostos foi feita com uma coluna DB-XLB da J&E Scientific (30m, d.i. 0,25 mm e filme de 0,25µm) utilizando como gás de arraste o hélio (1,3 mL/min). A temperatura do injetor foi de 230°C e a temperatura inicial da coluna foi mantida a 30°C por 5min e, aumentando gradativamente (10°C/min) até 180°C mantendo-se por 1 min, e, então, novamente até 230°C. Esta última foi mantida por 3 min para garantir a saída de todos os compostos. As concentrações de TBP obtidas nas análises foram calculadas em função do padrão interno recuperado.

RESULTADOS

Por meio dos ensaios de contagem padrão em placa não foram encontrados micro-organismos aeróbios e anaeróbios no rejeito estudado. Estes resultados indicaram que o rejeito, na forma em que se encontra estocado, não é um ambiente propício para o crescimento de micro-organismo, levando à necessidade de se obter e adaptar comunidades bacterianas de outros ambientes para a realização da biodegradação do TBP.

A CIM do rejeito foi avaliada para se determinar a concentração máxima de rejeito das amostras no meio com a qual as comunidades bacterianas conseguem crescer. A concentração do rejeito capaz de inibir o crescimento, situa-se entre 16% e 32% para as comunidades BL e SS.

Os resultados obtidos nos experimentos de biodegradação do TBP, pelas comunidades bacterianas estão apresentados nas Fig. 1. Os resultados foram comparados com a concentração inicial, aplicando-se o teste t de Student, com nível de significância de 95%.

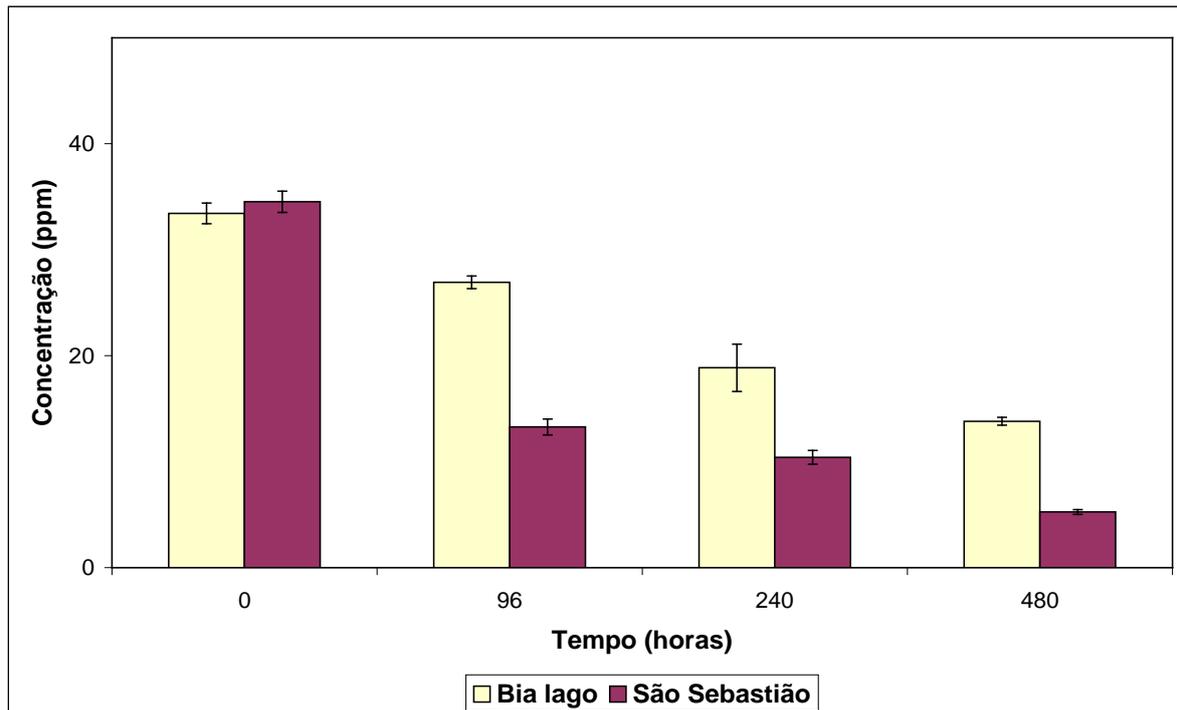


FIGURA 1: Variação concentração do TBP em função do tempo, observada no ensaio de biodegradação com as comunidades bacterianas Bia Lago e São Sebastião.

Os resultados obtidos mostraram que a comunidade de bactérias isoladas de sedimentos do canal de São Sebastião (SS) tem a maior capacidade de biodegradação de TBP, sendo observado um nível de degradação de 84,8% em 480h. A capacidade de biodegradação de TBP pela comunidade de bactérias BL isolada da mina de urânio foi de 80,5% em 480h.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que as duas comunidades estudadas degradaram, de modo eficiente o TBP. O melhor desempenho foi o da comunidade SS. Estes resultados sugerem que a aplicação da comunidade SS pode ser um processo de pré-tratamento viável para rejeitos radiativos líquidos orgânicos contendo TBP. Outra possibilidade de aplicação dessa comunidade é a sua utilização no tratamento de efluentes industriais contendo TBP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A. E. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. ed 19., 1995.
2. FERNANDES, H.M.; VEIGA, L. H. S.; FRANKLIN, M. R.; PRADO, V. C. S.; TADDEI, J. F. Environmental impact assessment of uranium mining and milling facilities: A study case at the Pocos de Caldas uranium mining and milling site, Brazil. J. Geoch. Expl.,v.52(1-2), pp 161-173, 1995.
3. FORBICINI, C. A. L. G. Procedimentos eletroquímicos no tratamento do combustível nuclear irradiado. 1994. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.
4. HIROMOTO, G.; DELLAMANO, J.C.; MARUMO, J.T.; ENDO, L.S.; VICENTE, R.; HIRAYAMA, T. Introdução à gerência de rejeitos radioativos, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-Departamento de Rejeitos Radioativos, São Paulo, 1999.
5. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Predisposal management of organic radioactive waste, Vienna, 2004.
6. JAPAN CHEMICAL INDUSTRY ECOLOGY-TOXICOLOGY & INFORMATION CENTER (JETOC). Initial Assessment Profile: Tributyl phosphate. Disponível em : <http://www.jetoc.or.jp/HPSIDS/pdffiles/126-73-8.pdf> acessado em 24 de agosto de 2008.

7. MEDEIROS, P. M.; BÍCEGO, M. C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP-Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, p. 11-12, 2004.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. 2003.
9. NAKAMURA, A. International programme on chemical safety – environmental health criteria 112 - Tri-n-butyl Phosphate. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 1991.
10. STRINGFELLOW W. T.; KOMADA T.; CHANG L. Y., Biological treatment of concentrated hazardous, toxic, and radionuclide mixed wastes without dilution. Lawrence Berkeley National Laboratory. Paper LBNL-55928, 2004.