

# CARACTERIZAÇÃO DE REJEITOS LÍQUIDOS RADIOATIVOS CONTENDO SOLVENTES ORGÂNICOS

*Rafael Vicente de Pádua Ferreira<sup>\*</sup>, Maria Helena Bellini<sup>\*</sup>, Solange  
Kazumi Sakata<sup>\*</sup>, Fernando Dutra<sup>\*\*</sup>, Tânia Regina de Borba<sup>\*</sup>, Patricia  
Busko Di Vitta<sup>\*\*\*</sup>, Julio Takehiro Marumo<sup>\*</sup>*

\* Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)  
Av. Professor Lineu Prestes 2242  
05508-000 São Paulo, SP  
[rpadua@ipen.br](mailto:rpadua@ipen.br)

\*\* Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL)  
Av. Regente Feijó, 1295. Laboratório 4A  
03342000 - São Paulo, SP

\*\*\* Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ-USP)  
Av. Prof. Lineu Prestes, 748  
05508-900 - São Paulo, SP

## RESUMO

O desenvolvimento do reprocessamento do combustível nuclear no Brasil teve início nos anos 70 com a implantação do Projeto Reprocessamento, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN-SP). O programa foi encerrado nos anos 90 e parte dos rejeitos radioativos gerados estão estocados no Laboratório de Rejeitos Radioativos na espera de tratamento, sendo constituídos de uma mistura aquosa e compostos orgânicos. A principal forma de tratamento de rejeitos radioativos líquidos é a imobilização em cimento, devido à seu baixo custo de processamento e compatibilidade com uma grande variedade de rejeitos. Entretanto, os orgânicos são geralmente incompatíveis com o cimento, interferindo na hidratação e no processo de solidificação, requerendo portanto, tratamento prévio com aditivos especiais para estabilizar ou destruir estes compostos. Diante deste problema a utilização de microrganismos para o tratamento dos rejeitos líquidos radioativos armazenados no Laboratório de Rejeitos Radioativos, surge como uma técnica bastante promissora. Esta técnica baseia-se na utilização de microrganismos capazes de metabolizar e digerir os componentes orgânicos dos rejeitos, tornando-os compatíveis com a matriz de cimento. Neste trabalho, foi realizada a caracterização qualitativa e semiquantitativa dos compostos orgânicos presentes nos rejeitos utilizando cromatografia gasosa e a avaliação de fatores que influenciam no crescimento dos microrganismos e interferem no

processo de degradação dos compostos orgânicos como pH, potencial eletroquímico (Eh) e a carga máxima de rejeito.

Palavras chaves: reprocessamento, rejeito radioativo, caracterização de rejeitos

## 1. INTRODUÇÃO

Em vários países a fissão nuclear tem sido uma das principais fontes para a geração de eletricidade, os radioisótopos também têm sido amplamente utilizados na área agrícola, médica e, especialmente, em pesquisa. O custo para a sociedade advindo da utilização dessas tecnologias é a geração de rejeitos radioativos, que, da mesma forma que os resíduos convencionais, devem ser tratados adequadamente para garantir a segurança do homem e do meio ambiente.

No Brasil, a Comissão Nacional de Energia Nuclear define o rejeito radioativo como: "qualquer material resultante de atividades humanas, que contenha radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados na Norma CNEN-NE-6.05 - Gerência de Rejeitos Radioativos em Instalações Radioativas, e para o qual a reutilização é imprópria ou não prevista" (CNEN,1985).

Antes de serem encaminhados para o armazenamento provisório ou a disposição final, todos os rejeitos devem ser embalados adequadamente e, em alguns casos, solidificados com materiais que variam de acordo com o tipo de rejeito. A solidificação tem como objetivo transformar o rejeito em uma forma estável para o armazenamento seguro, sendo a cimentação, o processo mais empregado. Essa técnica, no entanto, apesar de ser simples e barata, tem limitações como baixa capacidade de carga para as resinas e incompatibilidade com líquidos orgânicos (MESQUITA, 1980, IAEA, 2004).

A principal fonte geradora de rejeitos radioativos líquidos orgânicos (RRO) no Brasil foram as atividades de reprocessamento do combustível nuclear. O desenvolvimento do reprocessamento no Brasil teve início nos anos 70 com a implantação do Projeto Reprocessamento, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Comissão Nacional de Energia Nuclear/São Paulo (IPEN-CNEN/SP), dando origem à instalação, em escala de laboratório, do CELESTE (CÉLula de Estudos e Testes em Extração). Esta instalação operou até o início da década de 90 utilizando o 1º ciclo do processo com capacidade máxima de tratamento de 1Kg de metal pesado por campanha (FORBICINI, 1994).

O reprocessamento do elemento combustível constitui uma das etapas do ciclo do combustível e tem por objetivo separar U-235, U-238 e Pu-239 dos produtos de fissão contidos no elemento combustível queimado para reutilizá-los na fabricação de novos elementos combustíveis (HIROMOTO *et al*, 1999).

Ao longo dos anos vários processos foram desenvolvidos para se realizar o reprocessamento, utilizando-se de diferentes técnicas, sendo a extração com solventes a mais eficiente e segura nas operações em escala industrial. Dentre os processos de extração com solventes destaca-se o PUREX (Plutonium Uranium Recovery by Extracion). Neste processo o solvente utilizado é o Tri-butil fosfato (TBP) diluído geralmente com hidrocarbonetos de cadeia longa como o dodecano ou misturas como querosene, varsol, entre outros. O processo PUREX apresenta uma série de vantagens quando comparado com outros processos de extração incluindo menor volatilidade e inflamabilidade do solvente, maior estabilidade química e resistência à radiação além de apresentar um custo operacional mais baixo. Os RRO são gerados principalmente durante este processo. (IAEA, 2004).

Atualmente estão armazenados na unidade de armazenamento e tratamento de rejeitos radioativos líquidos e sólidos úmidos do Laboratório de Rejeitos Radioativos - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear - São Paulo (LRR-IPEN/CNEN-SP), 17 embalagens, contendo rejeitos de Pu<sup>238, 239</sup>, Am<sup>241</sup>, U<sup>235, 238</sup> e produtos de fissão provenientes da antiga unidade de reprocessamento, totalizando 340 litros (DELLAMANO, 2005).

O principal problema para a gerência dos RRO decorre da incapacidade destes de serem imobilizados diretamente com cimento, necessitando para isso, de tratamento prévio.

Para o tratamento dos RRO são descritos na literatura vários métodos, divididos em técnicas **não destrutivas**, como secagem, evaporação, destilação, condicionamento físico/separação, absorção, imobilização direta; e **técnicas destrutivas**, como incineração, pirohidrólise, hidrólise alcalina, vitrificação, tratamento de plasma, métodos eletroquímicos, oxidação química direta, digestão ácida, microondas e o tratamento biológico (IAEA, 2004). A escolha do método depende, além do custo de tratamento, da reutilização ou não dos solventes, da facilidade de processo e da quantidade de material a ser tratado (ENDO, 1991).

Em muitos países esses rejeitos são tratados por incineração, que destrói os compostos orgânicos perigosos e os radionuclídeos

presentes são capturados pelas cinzas voláteis ou liberados com os gases <sup>(IAEA,1988)</sup>. No Brasil, não há incineradores disponíveis para a queima de rejeitos radioativos.

Diante deste problema a utilização de microrganismos para o tratamento dos RRO armazenados no LRR-IPEN/CNEN-SP, surge como uma tecnologia bastante promissora. Esta abordagem baseia-se na utilização de microrganismos capazes de metabolizar e digerir os componentes orgânicos dos rejeitos os tornando compatível com a matriz de cimento (IAEA, 2004).

Porém poucos dados estão disponíveis na literatura sobre a biodegradação de componentes orgânicos em rejeitos radioativos, são descritos a degradação do TBP por *Pseudomonas sp* (MACASKIE,1991) e um processo de biodegradação foi patenteado nos EUA consistindo na utilização de bactérias pré-selecionadas para realização da hidrólise dos compostos orgânicos com a formação de dióxido de carbono e água realizando-se assim a imobilização dos compostos inorgânicos e biomassa em cimento. (DEGUITRE & STINGRE; 1999, IAEA, 2004).

A implantação da biodegradação para tratamento de RRO requer um estudo detalhado dos parâmetros que envolvem este processo.

Desta forma, este trabalho visa determinar qualitativamente e semiquantitativa os compostos orgânicos presentes nos RRO armazenados no LRR-IPEN/CNEN-SP e avaliar fatores que podem influenciar no crescimento das comunidades bacterianas selecionadas para a biodegradação e interferir no processo de degradação dos compostos orgânico, como pH, potencial eletroquímico (Eh) e carga máxima de rejeito.

## 2. METODOLOGIA

Este trabalho pode ser dividido em duas etapas, uma de caracterização dos RRO e outra de avaliação dos fatores que influenciam no crescimento dos microrganismos e interferem no processo de degradação.

Na primeira etapa, os compostos orgânicos presentes nos RRO foram identificados por duas técnicas de cromatografia a gás (CG), a de injeção direta e a "Headspace". A técnica de injeção direta forneceu a identificação e semiquantificação dos compostos orgânicos não voláteis, como o TBP, ao passo que a "Headspace" dos voláteis. E na segunda etapa foi realizada a avaliação dos valores pH e potencial eletroquímico (Eh) no rejeito "in natura" e determinada a carga máxima de RRO com a qual as comunidades bacterianas selecionadas

conseguem sobreviver.

## **CARACTERIZAÇÃO DOS REJEITOS**

Em todas as análises da fase orgânica dos RRO por CG injeção, foram utilizadas extrações da fração orgânica realizadas com diclorometano em um funil de separação, na proporção 1:1. A fase orgânica foi separada em um frasco de vidro com capacidade para 25 mL e antes de serem enviadas para a cromatografia, as amostras foram analisadas quanto à presença de radionuclídeos. Esta análise foi realizada por meio da avaliação de papéis de filtros impregnados com 1 mL da extração de cada rejeito em espectrômetros Alfa (Eberline Scintillation Alpha Counter SAC-4), Beta (Eberline BC-4) e Gama (contador automático HPGe Canberra, model GX2518). Somente as amostras sem radionuclídeos foram utilizadas para a determinação dos compostos orgânicos. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para a avaliação e semiquantificação da composição orgânica dos RRO foram selecionadas as embalagens 80 e 85 por serem as embalagens com maior atividade radioativa. Amostras dessas embalagens foram analisadas por CG/MS e CGMS/Headspace na tentativa de se realizar uma avaliação qualitativa e semiquantitativa dos compostos presentes. As análises foram realizadas na Central Analítica do IQ-USP, utilizando o cromatógrafo Shimadzu "Headspace" modelo GCMS-QP5050, com amostrador automático "Headspace" HSS-4A. As amostras foram introduzidas com um injetor "split/splitless" (split de 1:14) a 250°C utilizando como gás de arraste hélio (1,3 mL/min) a separação foi feita com uma coluna DB-5 J&W (30m x 0,25mm d.i. espessura do filme 0,25µm). A temperatura inicial da coluna foi de 40°C, mantida por 2 min, sendo aumentada à razão de 3°C por min até 65°C, mantendo-se por 1 min, então novamente aumentada até 220°C (15° C/min) e mantida nesta temperatura por 3 minutos para garantir a saída de todos os compostos. A temperatura de interface do MS foi 230°C. O espectrômetro de massas foi operado em modo scan (impacto de elétron à 70 eV, 1000 V)

As análises dos RRO por "Headspace" foram realizadas com amostras "in natura", enviadas em frascos de vidros com capacidade para 20 mL fechadas com septos de teflon e lacres de alumínio.

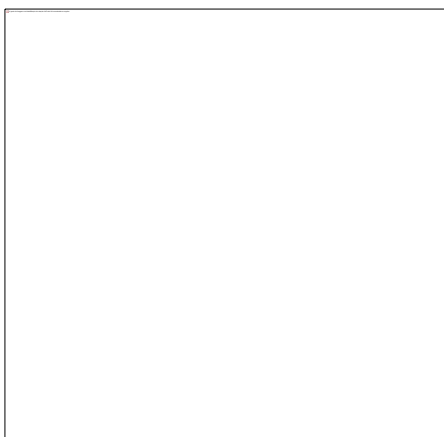
## **AValiação DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS E INTERFEREM NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO**

Nesta etapa foram realizados ensaios para a avaliação de fatores que interferem no crescimento dos microrganismos e na degradação dos compostos orgânicos.

Os valores de pH e Eh foram mensurados em oito embalagens de RRO com maior concentração de radionuclídeos). As medidas de pH foram realizadas com um eletrodo de vidro combinado acoplado a um phmetro, ambos da marca Micronal, modelo B374. O Eh foi mensurado com um potenciômetro da marca Fisher Scientific, modelo Accumet 910 e um eletrodo de vidro combinado da marca Laborsan. Os equipamentos foram calibrados antes do uso, sendo o phmetro calibrado com soluções de pH 7,0 e 4,0 da marca Micronal e o potenciômetro calibrado com uma solução padrão Eh 220 mV da marca Laborsan. Todas as leituras foram realizadas após estabilização.

Após a avaliação das amostras, foram selecionados consórcios bacterianos provenientes de áreas impactadas, a mina de urânio de Poços de Caldas (Fig:1) e o estuário de São Sebastião (Fig: 2). Da mina de urânio foram coletados o solo pela existência de metais pesado e água devido a sua acidez, do estuário de São Sebastião foi doado pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) uma amostra de sedimento proveniente de uma área impactada com hidrocarbonetos.

A amostra de solo da mina de urânio de Poços de Caldas foi coletada na coordenada, **BIA**: S 21 ° 56 ' 19 . 0 ' WO 46 ° 29 ' 47 . 5 ' e a amostra de água no ponto **BIA LAGO** coordenada S 21 ° 56 ' 20 . 8 ' WO 46 ° 29 ' 13 . 5 ' , a amostra de sedimento do estuário de São Sebastião foi coletada na coordenada : S 23°47' 44. 4' S WO 45° 22' 85. 0'.



**Figura 1: Platô de Poços de Caldas  
estuário de São Sebastião**

(AMARAL *et al*, 1985)

(MEDEIROS& BÍCEGO, 2004)

**Figura 2: Mapa do**

Para obtenção dos consórcios bacterianos, as amostras de água, solo e sedimento foram submetidas ao processo de enriquecimento descrito por (CRAVO JÚNIOR, 1998). Com o objetivo de selecionar e aumentar a população de bactérias capazes de degradar os compostos orgânicos presentes nos RRO. Nesse sentido incubou-se 10 gramas de solo ou 10 mL de água em 100 ml de meio mínimo constituído por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,13g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,7g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4,39g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,11g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,003g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05g/L, contendo óleo diesel como única fonte de carbono. Posteriormente, foram realizados 3 repiques sucessivos em intervalos de 48 horas, variando de 1 a 5 % (v/v) a concentração de TBP, dodecano, acetato de etila e óleo diesel no meio mínimo. Os experimentos foram realizados em frascos com tampa de rosca com 250 mL de capacidade. Todos os frascos foram incubados em plataforma de agitação (150 rpm) à 30 °C e após o período de incubação, parte da cultura obtida foi estocada em tubos criogênicos contendo 30% de glicerol estéril à temperatura de – 20°C.

A carga máxima de RRO no meio com a qual as comunidades bacterianas obtidas conseguem sobreviver foi determinada por meio da concentração inibitória mínima (CIM). Este método baseia-se na determinação da concentração mínima de uma substância em um meio para a qual não se observa o crescimento de microrganismos (NCCLS, 2003). A CIM dos RRO 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 LB (Biolife) e incubadas em estufa a 30°C até a obtenção de uma densidade bacteriana na cultura de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. 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 RRO 80 e 85 variando de 1% a 64% preparadas com o meio LB. Após os períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) a 30°C a CIM foi determinada comparando-se o crescimento nos tubos contendo as diluições dos RRO com o crescimento em tubos controle (sem RRO) e por inoculação das culturas em ágar nutriente (Biolife).

### **3. RESULTADOS**

#### **CARACTERIZAÇÃO DOS RRO**

As análises por cromatografia gasosa das amostras 80 e 85 estão representadas nas figuras 3 e 4 respectivamente.

**Figura 3:** Análises semiquantitativas dos compostos orgânicos presentes na embalagem 80: (A) amostras analisadas por CG "HeadSpace" (B) amostras analisadas por CG injeção direta



**Figura 4:** Análises semiquantitativas dos compostos orgânicos presentes na embalagem 85: (A) amostras analisadas por CG "HeadSpace" (B) amostras analisadas por CG injeção direta

Com estes resultados pode-se afirmar que a composição orgânica dos RRO é uma mistura de etanol, acetona, hexano, piridina, acetato de etila e TBP, sendo em majoritariamente composta por TBP, hexano e acetona.

## DETERMINAÇÕES DE PH, POTENCIAL REDOX (EH)

As medidas de pH e Eh foram determinadas nos RRO "in natura" e os resultados estão apresentados na Tab.1.

**Tabela 1:** Resultados das medições de pH e Eh

Amostras	pH	Eh (mV)
071	0,30	847
074	3,78	120
076	3,90	-0.47
079	1,79	446
080	2,44	553
081	4,72	310
082	4,47	272
085	2,07	301

Todos os RRO testados possuem pH ácido (entre 0,30 e 4,47) e valores de potencial redox variando entre +120 e +847 mV, com exceção da embalagem 76 que possui valor de Eh negativo -0,47 mV.

Segundo ATLAS & BARTHA (1993) e MADIGAN, *et al.* (2004) a determinação dos valores de pH e potencial redox é importante, pois influenciam o crescimento, a sobrevivência, e a atividade metabólica dos microrganismos.

A maioria das espécies bacterianas pode crescer em meios cujo pH esteja entre 5 e 9, faixa na qual encontra-se a maior parte dos ambientes naturais. Quanto à tolerância ao pH, as bactérias podem ser classificadas em três categorias: neutrófilas (pH entre 5,4 a 8,5), acidófilas (pH extremamente baixos, entre 0,1 e 5,4) e alcalinófilas (pH entre 8,5 e 11,5) (PELCZAR, 1996).

O potencial redox é está diretamente ligado com a taxa de oxigênio e, dependendo dos valores que o ambiente apresenta, favorece o crescimento de determinado grupo de microrganismos.

Valores positivos favorecem o crescimento de microrganismos aeróbicos quanto que os negativos os anaeróbicos (KENNEY, 1969).

A partir destes resultados pode-se afirmar que os RRO "in natura" favorecem o crescimento de microrganismos aeróbios acidófilos.

#### **DETERMINAÇÃO DA CARGA MÁXIMA DE RRO.**

As CIM das amostras 80 e 85 foram avaliadas para se determinar a carga máxima das amostras no meio com a qual as comunidades bacterianas conseguem crescer. Nos experimentos realizados, as concentrações das amostras 80 e 85 capazes de inibir o crescimento foram idênticas, situando-se entre 16% e 32% para as culturas mistas Bia e Bia Lago e 8% e 16% para a cultura São Sebastião.

#### **4. CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que as técnicas de CG/MS e CGMS/HeadSpace foram eficientes para a determinação da composição orgânica dos RRO armazenados no LLR-IPEN/CNEN-SP.

Os valores de pH e Eh indicaram que os RRO são um ambiente propício para o crescimento de bactérias aeróbias acidófilas. Portanto, deve-se ser realizado um levantamento prévio com o objetivo de se verificar a contaminação previa dos RRO por microrganismos com pertencentes a este grupo antes da aplicação do processo de biodegradação.

Os resultados da CIM mostraram que as comunidades bacterianas Bia e Bia Lago, ambas provenientes da mina de urânio de Poços de Caldas, conseguem se desenvolver com o dobro da concentração de RRO no meio, sendo, portanto, mais resistentes que a comunidade São Sebastião do estuário de São Sebastião.

#### **5. REFERÊNCIAS**

ATLAS, R M; BARTHA, R.. **Microbial Ecology. Fundamentals and Applications**. 3. ed. Usa: The Benjamin/cummings, 1993.

AMARAL, E. C. S.; AZEVEDO, H. L. P; MENDONÇA, A. H.. Pre-operational environmental survey at the uranium mine and mill site, Poços de Caldas, Minas Gerais. **The Science Of The Total Environment**, Brazil, v. 48, n. 4-5, p.257-266, 1985.

CRAVO JÚNIOR, W. B. **Biodegradação de querosene de aviação (QAV) por culturas mistas e por *Pseudomonas aeruginosa***, 1998. Dissertação (mestrado). Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **Gerência de rejeitos radioativos em instalações radioativas**. Rio de Janeiro: CNEN-NE-6.05, CNEN, 1985.

DEGUITRE J.; STINGRE, M.. **Process and apparatus for treating oils and solvents contaminated by radioactive substances**. USA Pat. 005948259. 1999.

DELLAMANO, J. C. Laboratório de Rejeito Radioativo. Unidade de armazenamento e tratamento de rejeitos radioativos líquidos e sólidos úmidos. IPEN/CNEN-SP, **Comunicação pessoal**, 2005.

ENDO, L.S. **Tratamento de rejeitos radioativos compostos por solventes orgânicos: sistema TBP/DODECANO**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo(Brasil). 1991.

FORBICINI, C. A. L. G. **Procedimentos eletroquímicos no tratamento do combustível nuclear irradiado**. 1994. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.

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.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY . **Predisposal management of organic radioactive waste**, Vienna, 2004.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Radioactive waste management glossary IAEA - TECDOC-447**, 2. ed. Vienna. 1988.

KENNEY EB, Ash MM Jr. Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. **J Periodontol**. v.40(11), p.630–633. 1969

MACASKIE, L. E. The Application of Biotechnology to the Treatment of Wastes Produced from the Nuclear Fuel Cycle: Biodegradation and Bioaccumulation as a Means of Treating Radionuclide-Containing Streams. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 41-112, 1991

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.N., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Pearson-Prentice Hall, 2004.

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

MESQUITA, C. H.. Soluções Cintiladoras- Apontamentos Relativos A Física Instrumentação Metodologia e Aplicações Práticas. **INFORMAÇÃO IPEN**, v. 2, p. 1-65, 1980.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A5. *NCCLS*. 2003.

PELCZAR JR., M. J., CHAN, E.C., KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. vol.1. 2<sup>a</sup>ed. São Paulo: Makron Books, 1996.