



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Escola Politécnica & Escola de Química  
Programa de Engenharia Ambiental

**Darcy Muniz de Almeida**

**BACTÉRIAS NO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL E NA  
PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO DA USINA NUCLEAR DE ANGRA 1**

Rio de Janeiro

2016



UFRJ

Darcy Muniz de Almeida

**BACTÉRIAS NO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL E NA  
PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO DA USINA NUCLEAR DE ANGRA 1**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Aparecida Gomes Nassar  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Silva

Rio de Janeiro

2016

Almeida, Darcy Muniz de  
Bactérias no Canal de Transferência de Combustível e na  
Piscina de Combustível Usado da Usina Nuclear de Angra 1 / Darcy  
Muniz de Almeida. – 2016.  
75f.: il

Dissertação (Mestrado Engenharia Ambiental) - Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica e Escola de Química,  
Programa de Engenharia Ambiental, Rio de Janeiro, 2016.

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Aparecida Gomes Nassar e  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Silva.

1. Bactérias. 2. Usina Nuclear. 3. Piscina de Combustível Usado.  
I. Nassar, Cristina Aparecida Gomes (orientadora), II. Universidade  
Federal do Rio de Janeiro. Escola Politécnica e Escola de Química.  
III. Bactérias no Canal de Transferência de Combustível e na Piscina  
de Combustível Usado da Usina Nuclear de Angra 1



Darcy Muniz de Almeida

**BACTÉRIAS NO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL E NA  
PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO DA USINA NUCLEAR DE ANGRA 1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental (PEA), Escola de Química e Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 29/08/2016

Assinatura manuscrita em tinta preta de Cristina Aparecida Gomes Nassar.

Profa. Dra. Cristina Aparecida Gomes Nassar  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Presidente

Assinatura manuscrita em tinta preta de Sérgio Luiz Costa Bonecker.

Prof. Dr. Sérgio Luiz Costa Bonecker  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Membro interno

Assinatura manuscrita em tinta preta de Selma Gomes Ferreira Leite.

Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Membro interno

Assinatura manuscrita em tinta azul de Rodrigo Soares de Moura Neto.

Prof. Dr. Rodrigo Soares de Moura Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Membro externo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação aos meus pais, Darcy Florindo de Almeida e Yolanda Muniz de Almeida in memoriam, que me ensinaram faça sempre o seu melhor, estão constantemente presentes nos meus pensamentos, minha esposa Claudia Vargas e meus filhos inseparáveis Waleska Rodrigues, Diego Muniz, Caio Muniz e Bruno Muniz, em particular Dona Herlara do Nascimento Rocha fundamental no apoio logístico familiar e todos os amigos que sempre me incentivaram e apoiaram durante toda a elaboração desse trabalho científico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, criador do Universo, e aos bons mestres e protetores, que apesar de não poder vê-los sei que existem e me rodeiam, tendo me protegido ao longo de minha vida de diversos males e riscos.

Agradeço à Eletronuclear, pelo apoio profissional das Unidades Operacionais e pelo indispensável suporte para o desenvolvimento da presente dissertação.

Ao meu gerente Eng. Hélio Ricardo Veloso de Oliveira GDU.O - Gerência de Desempenho de Sistemas e de Reator de Angra 1, pelo incentivo, viabilizando toda a minha logística para a realização deste, cujo apoio foi determinante na continuidade e desenvolvimento do trabalho e ao Eng. Rodrigo Vieira da Fonseca, grande parceiro, auxiliando nos trabalhos de levantamento de dados no campo primordial na monitoração e coleta de dados.

Aos colegas Ubirahy Caldeira da Silva e Souza e Alexandre da Silveira, pela presteza no atendimento à obtenção de informações na área de química DIQU.O - Divisão de Química de Angra 1. Aos colegas Magno Jose de Oliveira, Marcos Fraga, Edison Minelli, Pedro Alexandre, Sandro Leonardo Nogueira de Lima e Luciana Teixeira Marcos DIPR.O - Divisão de Proteção Radiológica, pela paciência incondicional em responder aos questionamentos nos assuntos de proteção radiológica e viabilizar todo o processo.

As minhas orientadoras Profas. Dra. Cristina Nassar e Dra. Rosane Silva, pela excelente orientação, dedicação e apoio concedido durante o trabalho.

A todos os amigos do IBCCF - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Laboratório de Metabolismo Macromolecular "Firmino Torres de Castro" da UFRJ, em especial a Bianca, Isadora, Victor, Allan, Pâmela, Maria Clara, Thayane e Luísa, foi um prazer enorme a convivência e com certeza, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido!

A todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Engenharia Ambiental, PEA, promovido pela EQ/UFRJ e POLI/UFRJ com os quais tive convívio.

“Todas as coisas devem ser feitas da forma mais simples possível, porém não mais simples que o possível”.

Albert Einstein

## RESUMO

ALMEIDA, Darcy Muniz “Bactérias no Canal de Transferência de Combustível e na Piscina de Combustível Usado da Usina Nuclear de Angra 1”. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola de Química, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

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 PCU - Piscina de Combustível Usado 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 CTC - Canal de Transferência de Combustível e na PCU de uma usina podem formar filmes bacteriológicos resistentes à alta radiação. Ocorrências desse tipo já foram observadas em unidades de países como: República Eslováquia, Canadá (IAEA, 1997) e Espanha (SARRO *et. al.*, 2005 e CHICOTE *et. al.*, 2004), até o momento nenhum estudo desse tipo foi realizado no Brasil. Este trabalho pretende a partir da interpretação das análises biológicas 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*”. Com esse conhecimento será possível avaliar a eficácia ou a possível reavaliação da metodologia de análise e tratamento da água da piscina. Foram coletadas 14 amostras na superfície do revestimento do CTC, da PCU e nos drenos do ECB - Edifício de Combustível 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 outra parte foi empregada em uma análise de metagenoma por sequenciamento randômico (*Shotgun*). Foi identificado um total de 12 filos crescendo no “*liner*” do CTC, da PCU e nos drenos do ECB (*Acidobacteria*; *Actinobacteria*; *Bacteroidetes*; *Clamidiae*; *Clorobi*; *Cloroflexi*; *Cianobacteria*; *Deinococcus-Thermus*; *Firmicutes*; *Planctomicetos*; *Proteobacteria*; *Verrucomicrobia*; entre organismos não classificados). 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. As bactérias resistiram e sobreviveram a exposição à radiação de 0,416 Gy/h (alta radiação). A ação corrosiva de bactérias em superfícies do “*liner*” deve ser vista com cuidado, no entanto, não foi encontrada na literatura que as espécies identificadas ofereçam esse tipo de risco, esse fato é corroborado pelo baixo acúmulo de água nos drenos. Deve-se aprofundar estudos para a certificação de inexistência de corrosão da superfície dos “*liners*”. O método de Sequenciamento Randômico (*shotgun*) e a utilização do Sequenciador *Ion Torrent* PGM, apesar de serem caros, apresentam um resultado rápido e confiável para a identificação dos microrganismos. 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.

**Palavras-chave:** Bactérias. Usina Nuclear. Piscina de Combustível Usado.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Darcy Muniz "Bacteria in the Fuel Transfer Channel and in the Spent Fuel Pool of from the Nuclear Power Plant Angra 1". Dissertation (Master in Environmental Engineering) – School of Chemistry, Polytechnic School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The nuclear power plants in the world are in the process of extending its useful life of 40 to 60 years of operation. Angra 1 Nuclear Power Plant, for this purpose, has been carrying a reevaluation of engineering throughout your project. The SFP - Spent Fuel Pool is one of the areas to be studied in order to demonstrate their integrity and storage capacity of the fuel elements securely and enabling the extension of the useful life of the plant. Microorganisms that develop in the liner FTC - Fuel Transfer Channel and SFP a plant can form bacteria resistant films to high radiation. Instances of this type have already been observed in countries such as Canada, Slovakia Republic (IAEA, 1997) and Spain (SARRO *et. al.*, 2005 and CHICOTE *et. al.*, 2004), until this date no study of this kind was held in Brazil. This study intend from the interpretation of biological analyses and obtain the inventory of microorganisms present to direct the preventive actions to mitigate the growth of bacteria that may impair water quality and/or integrity of the liner. With this knowledge it will be possible to assess the effectiveness or the possible reassessment of the methodology of analysis and treatment of the pool water. The 14 samples were collected on the surface of the lining of the FTC, the SFP and the drains of the FB - Fuel Building of Angra 1. A portion of samples was used for growth and isolation of bacteria in culture medium and subsequent identification by 16S rRNA gene sequencing by Sanger method. The other part was employed in a metagenoma analysis by random sequencing (Shotgun). It was identified a total of 12 phyla growing in the liner FTC, the SFP and the drains of the FB (Acidobacteria; Actinobacteria; Bacteroidetes; Chlamydiae; Chlorobi; Chloroflexi; Cyanobacteria; Deinococcus-Thermus; Firmicutes; Planctomycetes; Proteobacteria; Verrucomicrobia; between organisms not classified). *A. xylosoxidans* isolated in cultures is common in the environment, it is recommended that periodic monitoring to assess its evolution and review preventive measures if necessary in order to not compromise the environment at that location and its surroundings. The bacteria resisted and survived the exposure

to radiation of 0.416 Gy/h (high radiation). The corrosive action of bacteria on surfaces of "liner" must be viewed with caution, however, was not found in the literature that the species identified offer that kind of risk, at this moment, this fact is borne out by the low accumulation of water in the drains. Must deepen studies for certification of absence of corrosion of the surface of the liners the Random Sequencing method (shotgun) and the use of the Sequencer Ion Torrent PGM, despite being expensive, have a fast and reliable result for the identification of microorganisms. The data indicate that the method of analysis and treatment of the pool water are suitable, since microorganisms did not show excessive growth.

Keywords: Bacteria. Nuclear Power Plant. Spent Fuel Pool.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista Aérea da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto .....	3
Figura 2: Gráfico preço médio de venda por fonte de energia .....	4
Figura 3: Fator de Disponibilidade de energia.....	6
Figura 4: Desenho Vista Superior EL. 17,95 do ECB.....	10
Figura 5: Vista da PCU, Comporta Aberta e CTC EL. 17,95 no ECB.....	17
Figura 6: Identificação da saída dos 19 pontos de drenos, EL. 5,15.....	18
Figura 7: Foto da Saída dos 19 pontos de drenos, EL. 5,15 .....	19
Figura 8: Pontos de Coleta das Amostras no CTC e na PCU da Usina Nuclear de Angra 1, PS - Piscina Submersa e CS - Canal Submerso .....	23
Figura 9: Fluxograma das etapas de crescimento, isolamento e identificação da bactéria .....	24
Figura 10: Placas de Petri após seis dias em meio de cultura indicando crescimento de colônias de bactérias.....	25
Figura 11: Valor do Levantamento Radiométrico da PCU em 26/02/14 .....	31
Figura 12: Valor do Levantamento Radiométrico do CTC em 05/02/14 .....	32
Figura 13: Sequência do gene 16S rRNA identificada para a colônia de bactéria isolada da amostra do dreno DU5.....	33
Figura 14: Árvore filogenética de seqüências 16S rDNA do isolado bacteriano ( <i>Seq 16S bact DU</i> ) e de bactérias disponíveis em bases de dados públicas. ....	34
Figura 15: Fluxograma quebra do DNA genômico e preparo das bibliotecas metagenômicas .....	37
Figura 16: Preparo das bibliotecas metagenômicas - Análise em gel microfluídico dos fragmentos obtidos das amostras (esquerda) e o tamanho das bibliotecas que foram sequenciadas de cada amostra (direita). ....	38
Figura 17: Relatório de corrida em <i>Ion Torrent</i> PGM contendo quantidade e qualidade das sequencias de DNA total obtidas. O relatório é gerado através do software <i>Torrent Browser</i> .....	39
Figura 18: Distribuição da comunidade bacteriana das amostras nas diferentes amostras: PS - Piscina Submersa; CS - Canal Submerso; DS - Dreno Seco; DU - Dreno Úmido.....	42

Figura 19: Análise funcional: Distribuição percentual de número de sequencias associadas a funções biológicas. Nas diferentes amostras: PS - Piscina Submersa; CS - Canal Submerso; DS - Dreno Seco; DU - Dreno Úmido .....45

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Vida Útil X Fator de Capacidade das Fontes de Energia .....	1
Quadro 2: Situação das Usinas Nucleares no Mundo.....	2
Quadro 3: Identificação das linhas de drenagem dos 19 drenos do ECB .....	18
Quadro 4: Monitoração dos Drenos do ECB .....	20
Quadro 5: Quantificação do DNA presente nas amostras.....	28
Quadro 6: Bactérias em áreas com radioatividade e contaminação em Angra 1 e no mundo .....	49
Quadro 7: Resistência a Radiação Ionizante .....	50
Quadro 8: Monitoração da água acumulada nos Drenos de Usinas. ....	51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Análise Estatística do sequenciamento do DNA das amostras .....40

## LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIEA	-	Agência Internacional de Energia Atômica
CNAAA	-	Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto
CNEN	-	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CS	-	Canal Submerso
CTC	-	Canal de Transferência de Combustível
DIPR.O	-	Divisão de Proteção Radiológica
DIQU.O	-	Divisão de Química de Angra 1
DS	-	Dreno Seco (< 1 mL/h desprezado)
DU	-	Dreno Úmido
ECB	-	Edifício do Combustível
EQ/UFRJ	-	Escola de Química da UFRJ
ERE	-	Edifício do Reator
GDU.O	-	Gerencia de Desempenho de Sistemas e de Reator de Angra 1
GNL	-	Gás Natural Liquefeito
IBCCF	-	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Laboratório de Metabolismo Macromolecular "Firmino Torres de Castro" da UFRJ
ISPs	-	Ion Sphere Particles
ISFET	-	Ion Sensitive Field Effect Transistor
<i>liner</i>	-	Revestimento
M5NR	-	Acessar o M5 de dados não redundante proteína usado para anotação de sequências de metagenômica
PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PCU	-	Piscina de Combustível Usado
PEA	-	Programa de Engenharia Ambiental
POLI/UFRJ	-	Escola Politécnica da UFRJ
ppm	-	Parte por milhão
PRIS	-	Power Reactor Information System
PS	-	Piscina Submersa
PWR	-	Pressurized Water Reactor
UFRJ	-	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 ENERGIA NUCLEAR NO BRASIL .....	3
2.2 PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO (PCU).....	7
2.3 DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS .....	9
2.3.1 Sistema Piscina de Combustível Usado (PCU).....	9
2.3.2 Sistema de Refrigeração e Purificação de Superfície da PCU.....	11
2.3.3 Sistema de Purificação da Água de Recarregamento.....	11
2.4 MICRORGANISMOS EM USINAS NO MUNDO .....	12
2.5 METAGENÔMICA.....	13
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
4.1 GERAL .....	16
4.2 ESPECÍFICOS .....	16
<b>5 LOCAL DE ESTUDO</b> .....	<b>17</b>
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
6.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, RADIOQUÍMICOS E RADIOMÉTRICO DA ÁGUA.....	21
6.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	21
6.2.1 Calibração do Espectrômetro .....	21
6.2.2 Pontos das Amostras .....	22
6.2.3 Licença para análise das Amostras.....	23
6.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA POR ISOLAMENTO.....	24
6.3.1 Crescimento e Isolamento de Bactéria em Meio de Cultura.....	24
6.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA POR MÉTODO DE SANGER .....	26
6.4.1 Análise das Sequências .....	26
6.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	27
6.6 ANÁLISE DE METAGENÔMA DAS AMOSTRAS COLHIDAS NA PISCINA, CANAL E DRENOS (SEQUENCIAMENTO RANDÔMICO ( <i>SHOTGUN</i> )).....	27
6.7 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PARA SEQUENCIAMENTO RANDÔMICO ( <i>SHOTGUN</i> ).....	28
6.7.1 Sequenciamento Semicondutor Por <i>Ion Torrent</i> PGM .....	28

<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
7.1 LEVANTAMENTO RADIOMÉTRICO DA PCU E CTC.....	31
7.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA PRESENTE NA AMOSTRA DU5.....	33
7.3 QUEBRA DO DNA GENÔMICO E PREPARO DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS .....	37
7.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DA BIBLIOTECA RANDÔMICA.....	38
7.5 ANÁLISE DOS DADOS PELA BIOINFORMÁTICA.....	39
7.6 ANÁLISE METAGENÔMICA.....	39
7.6.1 Leituras obtidas no sequenciamento metagenômico .....	39
7.6.2 Análise Taxonômica .....	40
7.6.3 Análise Funcional .....	43
7.7 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE E MONITORAÇÃO DOS DRENOS....	46
7.7.1 Bactérias em áreas com radioatividade e contaminação em Angra 1 e no mundo .....	46
7.7.2 Resistência a Radiação Ionizante .....	50
7.7.3 Monitoração dos Drenos .....	51
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>9 RECOMENDAÇÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE 1: BACTÉRIAS IDENTIFICADAS EM ANGRA 1.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE 2: RELATÓRIO DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Todas as fontes de energia são importantes e devem ser exploradas por questões estratégicas. A energia nuclear vem, nos últimos anos, se tornando uma opção importante na geração de energia elétrica no mundo, principalmente por ser considerada uma fonte de geração de energia limpa. A vida útil de uma usina nuclear (Quadro 1) é de 40 anos tem como expectativa 90% de fator de capacidade, ou seja, alto rendimento durante operação, acrescentando o fato de que as usinas estão em processo de extensão da sua vida útil para 60 anos, esses são fatores positivos e bastante competitivos comparados com as demais fontes geradoras de energia.

**Quadro 1: Vida Útil X Fator de Capacidade das Fontes de Energia**

	UNIDADE	HIDRELE- TRICIDADE	GÁS NATURAL	NUCLEAR	CARVÃO	BIOMASSA	EÓLICA	ÓLEO
CUSTO <i>OVERNIGHT</i>	(US\$/kW)	2.000	(*)	(*)	(*)	600	1.800	1.000
VIDA ÚTIL DA USINA	(anos)	40	25	40	40	25	25	25
FATOR DE CAPACIDADE	(%)	55	60	90	68	45	40	26
CUSTOS FIXOS DE O&M	(US\$/ kW-ano)	25	15	56	40	25	20	27
CUSTOS VARIÁVEIS DE O&M	(US\$/MWh)	2,30	4,10	4,20	4,00	4,20	1,70	6,50
CUSTO DO COMBUSTÍVEL	(US\$/ MMBtu)	n.a.	4	0,72	2,60	10,55	n.a.	13,94

(\*) o custo *overnight* de gás natural, nuclear e carvão foi determinado em função das condições de cada cenário

Fonte: FGV Projetos, 2013.

A matriz energética nuclear mundial conta com 442 usinas em operação, equivalentes a 15%. Segundo a *Power Reactor Information System e World Nuclear Association* estão em construção 66 usinas nucleares no mundo, com previsão de expansão da matriz energética para 25% até 2050 com a construção de 542 novas usinas.

No mundo existem 442 usinas em operação. Dentre os 31 países que possuem usinas nucleares, 12 possuem usinas em construção e 6 planejam construir novas usinas. A China pretende se destacar na produção de energia através de usinas nucleares com 27 em construção e 197 novas usinas. Outros países não detentores de usinas nucleares planejam 140 novas usinas. O Quadro 2, a seguir, sintetiza de forma objetiva a evolução da matriz energética no mundo, vários países estão investindo maciçamente na energia nuclear até 2050.

**Quadro 2: Situação das Usinas Nucleares no Mundo**

SITUAÇÃO DAS USINAS NUCLEARES NO MUNDO							
Países	Operação	Construção	Novas	Países	Operação	Construção	Novas
África do Sul	2	0	0	Hungria	4	0	0
Alemanha	8	0	0	Índia	21	6	63
Arábia Saudita	0	0	\	Irão DE	1	0	0
Argentina	3	1	0	Japão	43	2	17
Armênia	1	0	0	México	2	0	0
Bélgica	7	0	0	Países Baixos	1	0	0
Belarus	0	2	0	Paquistão	3	0	0
Brasil	2	1	0	Reino Unido	15	0	13
Bulgária	2	0	0	República Checa	6	0	0
Canadá	19	0	0	República da Coreia	25	3	0
China	31	24	197	Romênia	2	0	0
Emirados Árabes Unidos	0	4	14	Rússia	35	8	51
Eslováquia	4	2	0	Suécia	10	0	0
Eslovênia	1	0	0	Suíça	5	4	0
Espanha	7	0	0	Taiwan, China	6	0	0
Estados Unidos da América	99	5	31	Ucrânia	15	2	0
Finlândia	4	1	0	Outros Países	0	0	140
França	58	1	0	Total	442	66	542

Fonte: AIEA/PRIS - Power Reactor Information System e World Nuclear Association, 2016.

Desde o início da geração núcleo elétrica estão sendo produzidos e acumuladas grandes quantidades de combustíveis irradiados em vários países. Por conta deste cenário novas instalações de reprocessamento já foram construídas, porem vários países estão investigando como opção a ampliação do armazenamento do combustível irradiado antes do reprocessamento ou sua eliminação (IAEA, 1997).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ENERGIA NUCLEAR NO BRASIL

No Brasil a Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto (CNAAA) conta com duas usinas em operação (Figura 1). A primeira é Angra 1, que entrou em operação comercial em 1985 e tem potência de 640 megawatts. A outra é Angra 2, que começou a operar em 2001 e cuja potência é de 1.350 megawatts. Para os próximos anos, está prevista a entrada em operação de Angra 3, de 1.405 megawatts, que está com as obras em andamento. A usina será uma réplica de Angra 2, mas incorporando os avanços tecnológicos desenvolvidos desde a construção da segunda usina do complexo de Angra. Estas usinas são uma importante contribuição para a matriz elétrica brasileira. Juntas, geram o equivalente a um terço do consumo de energia elétrica do estado do Rio de Janeiro. Elas também representam 3% da geração nacional (ELETRONUCLEAR, 2016).

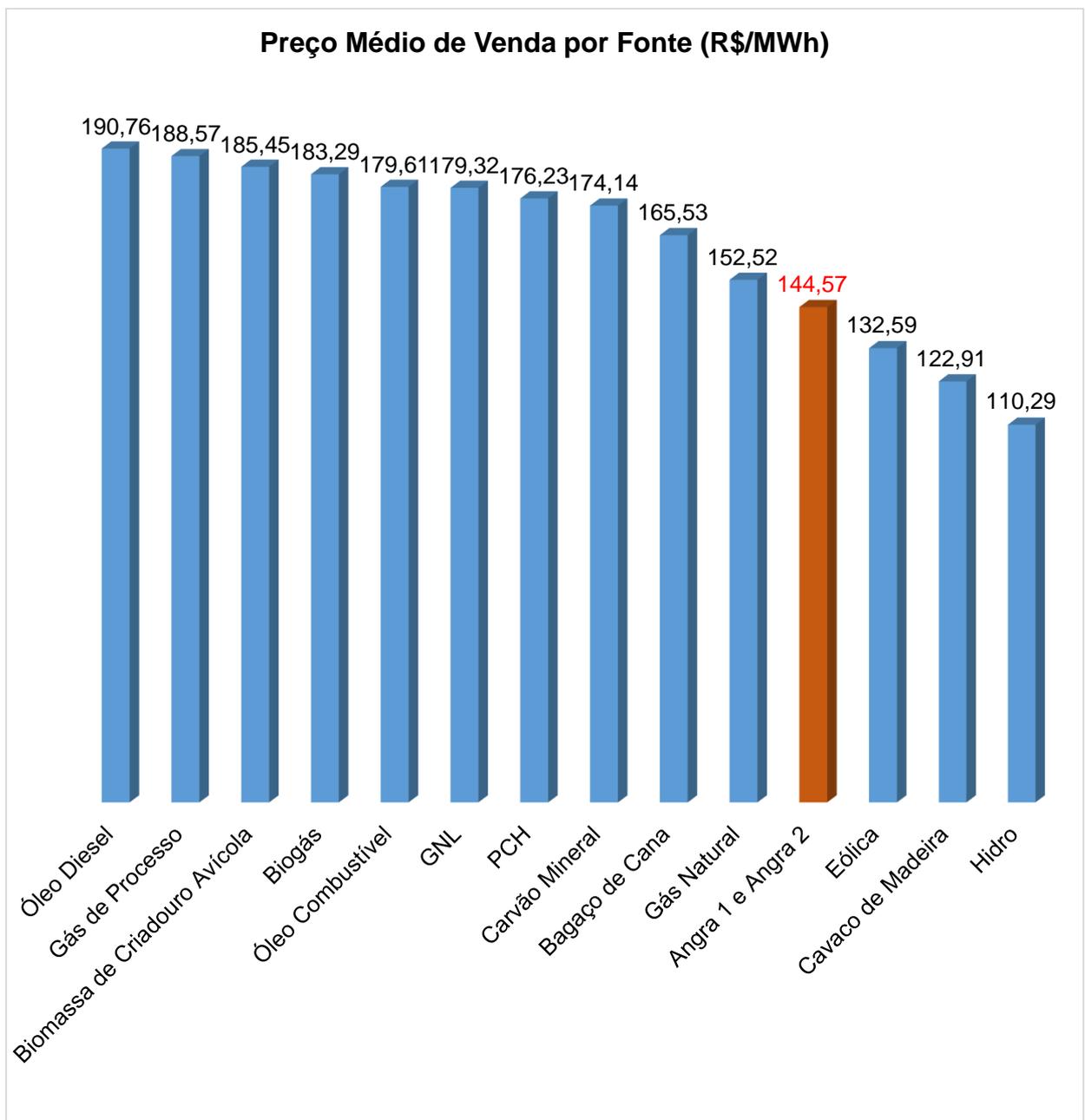


**Figura 1: Vista Aérea da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto**

Fonte: ELETRONUCLEAR (2016).

As usinas nucleares são usinas térmicas, que operam com base na geração de calor da fissão do urânio. (ELETRONUCLEAR, 2016).

A oferta da energia no sistema elétrico tem uma dinâmica no custo de geração, com diversas variáveis entre elas as condições climáticas. A Figura 2 compara as diversas fontes de energia e o seu preço médio. No caso de Angra 1 e Angra 2 o valor de R\$ 144,57/MWh (vigente durante o ano de 2012) e de Angra 3 de R\$ 179,44/MWh (Atualização de Novembro/2012) demonstra um preço médio de venda bastante competitivo no mercado na ocasião.



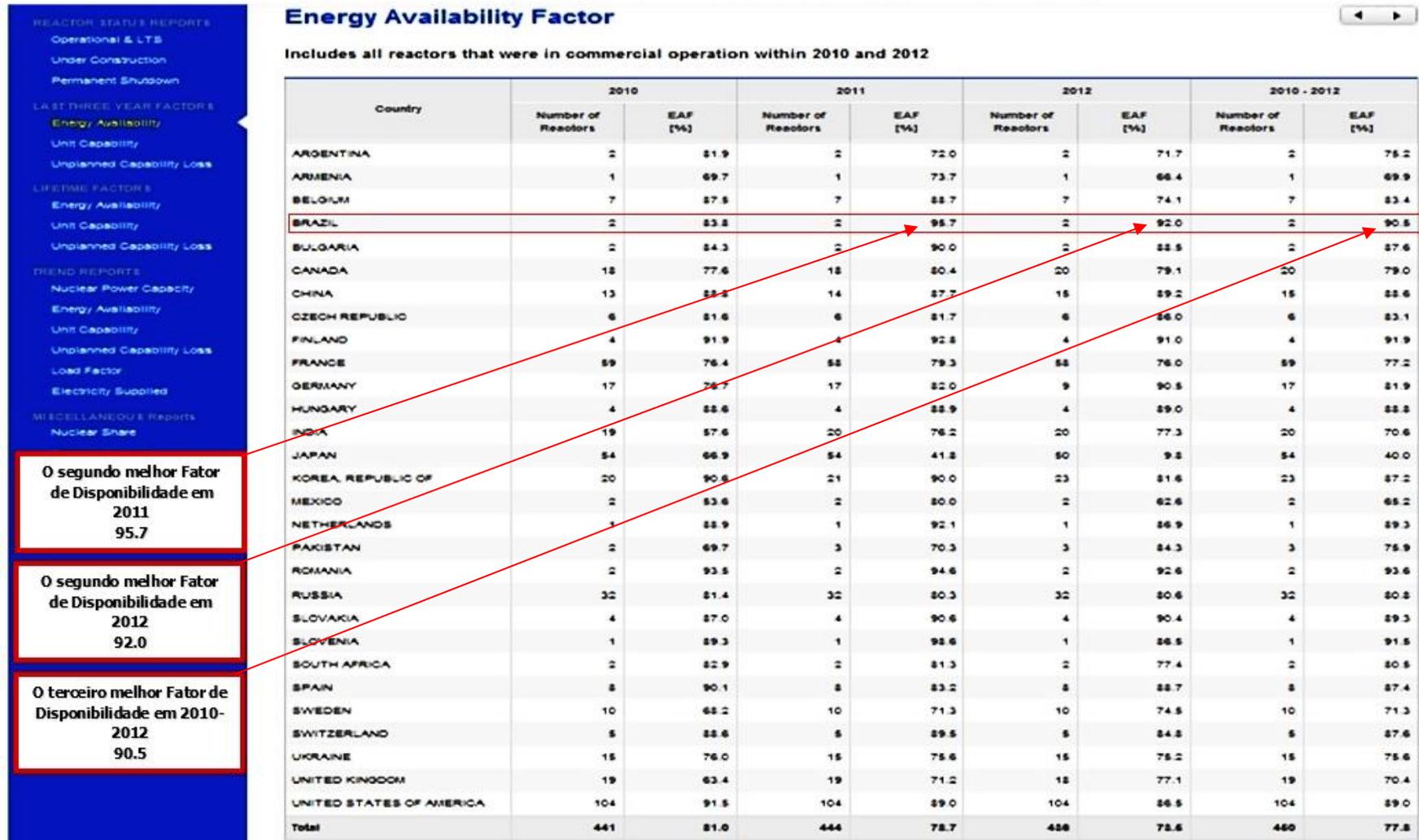
**Figura 2: Gráfico preço médio de venda por fonte de energia**

Fonte: IPCA (Nov/2012).

Anualmente as Usinas Nucleares no mundo são avaliadas em relação ao fator de disponibilidade no sistema durante a operação da planta, ou seja, tempo em que a Usina esteve disponível para gerar 100% de sua capacidade (Figura 3).

As Usinas de Angra 1 e 2 no período de 2010 a 2012 estiveram entre as melhores do mundo, em 3º lugar com 90,5%, em 2011 Angra 2 bateu o recorde de geração em ano sem “parada de recarregamento” com 95,7% em 2012 Angra 2 quebrou o recorde de geração em ano com parada com 92%, em média entre 442 usinas em operação IPCA (Nov/2012).

## Fator de Disponibilidade (por país Angra 1 e 2 – Fonte AIEA)



**Figura 3: Fator de Disponibilidade de energia.**

Fonte: AIEA/PRIS - Power Reactor Information System e World Nuclear Association (2012).

## 2.2 PISCINA DE COMBUSTÍVEL USADO (PCU)

A usina nuclear de Angra 1 tem um tipo de reator de água pressurizada, ou seja, PWR (*Pressurized Water Reactor*), que utiliza como combustível pastilhas de urânio <sup>235</sup> enriquecido entre 3 a 5% dentro das varetas dos 121 elementos combustíveis (cada elemento combustível tem um arranjo de 16x16=256 varetas e 4 metros de altura), para geração de energia elétrica, que são posicionados no núcleo do reator a partir da fissão nuclear. No entanto, após um certo tempo os elementos combustíveis passam a não serem eficazes para produzir energia. Estes elementos combustíveis são substituídos em um processo conhecido como parada para reabastecimento, ou seja, substituição por combustíveis novos. O combustível irradiado permanece termicamente e radiologicamente ativo, sendo necessária a transferência do elemento combustível do núcleo do reator, localizado no ERE – Edifício do Reator através do Sistema de Transferência de Combustível, passando pelo tubo de transferência de combustível, para o armazenamento nas 1252 células dos racks supercompactos no fundo da PCU - Piscina de Combustível Usado, localizada no ECB - Edifício do Combustível. A água da piscina tem duas funções: protege contra a radiação, e contribui para o resfriamento do combustível. A qualidade da água deve estar em conformidade com requisitos rigorosos de pureza e clareza permitindo que os operadores possam manusear os elementos combustíveis irradiados e novos (ELETRONUCLEAR, 2014).

As instalações das piscinas são estruturas maciças de concreto armado, podem considerar-se dois métodos principais de revestimentos: aço inoxidável ou com uma resina de epóxi. O material do “*liner*” da PCU e do CTC - Canal de Transferência de Combustível das Usinas de Angra é o aço inoxidável de qualidade estrutural e a resistência à corrosão justifica plenamente sua utilização em contato com a água borada (ELETRONUCLEAR, 2014).

O armazenamento em piscinas com água borada revestido com aço inoxidável é uma tecnologia predominante, entretanto o armazenamento seco, com revestimento de epóxi, vem sendo bastante utilizado por muitos países considerando o longo prazo de armazenamento. Análises de tecnologias de armazenamento secos e úmidos de combustível irradiado são realizadas por 16 organizações que representam 13 países (Canadá, Finlândia, França, Alemanha, Hungria, República da Coreia, Japão, Federação Russa, Eslováquia, Espanha, Suécia, Reino Unido e EUA) (IAEA, 1997).

Desde o início da utilização do armazenamento em piscinas, foram relatados vazamentos, pelas juntas de solda do *“liner”* nos diferentes países. (IAEA, 1997). O Japão desenvolveu um sistema de solda subaquático para reparo do *“liner”* de aço inoxidável sem esvaziar a piscina. Este sistema foi testado com sucesso em uma simulação completa, na fábrica (IAEA, 1997). No Canadá, têm sido desenvolvidas técnicas para reparação subaquática de defeitos tanto em aço inoxidável quanto em revestimentos de epóxi. Usando um epóxi de cura subaquática, um vazamento foi reparado com sucesso tanto para o aço inoxidável quanto em revestimento de epóxi (IAEA, 1997). Na França as soldas dos *“liners”* foram 100% radiografadas durante a construção. Um monitoramento permanente das costuras soldadas, através de inspeção de Raio X foi realizado afim de localizar e Identificar qualquer irregularidade durante a operação (IAEA, 1997). Na Hungria, foi observado vazamento no *“liner”* das piscinas de combustível irradiado da Unidade 1. Originalmente haviam soldas nos painéis retangulares, que desenvolveram micro trincas devido as forças cíclicas (esforços dinâmicos). Uma parte dos painéis do *“liner”* da piscina foi substituída no passado. Presume-se que os vazamentos são antigos, possivelmente da parte dos painéis não substituídos, na época especulou-se que o *“liner”* não foi totalmente reparado. Em 1992, foi constatado vazamento na Unidade 1, durante monitoramento, foi observado um vazamento entre 20 a 600 L/h. Já na Unidade 2 foi observado um vazamento entre 7 a 8 L/h. Não foram observados vazamentos nos *“liner”* das unidades 3 e 4 (IAEA, 1997). Na Suécia foi relatado vazamento totalizando entre 5 a 10 L/dia nas piscinas de combustível das usinas em operação, cujo volume total era de 14.000.000 L. Este valor ficou inalterado durante 10 anos de operação das usinas (IAEA, 1997).

O projeto da instalação de armazenamento na PCU em Angra 1 garante, que a passagem de água através do *“liner”* (revestimento que protege as paredes da piscina) seja devidamente minimizado tanto na magnitude e como na frequência de ocorrência. O projeto também assegura que quaisquer pequenos vazamentos, através de micro trincas no *“liner”*, podem ser detectados pelos operadores através dos drenos em inspeção periódica e/ou através de alarme no nível da PCU na sala de controle. A água que eventualmente passa pelas trincas do *“liner”* é direcionada dos drenos, sendo o volume mensurado periodicamente, para os tanques de rejeitos.

Apesar da água da piscina não ser favorável ao desenvolvimento de organismos, é desejável que ocorra periodicamente uma análise aprofundada da

qualidade dessa água e do possível crescimento de microrganismos na água, revestimento ou drenos.

## 2.3 DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS

### 2.3.1 Sistema Piscina de Combustível Usado (PCU)

A PCU tem como função o armazenamento seguro e subcrítico dos elementos combustíveis, mantendo a sua refrigeração e assegurando que os mesmos estejam sempre cobertos com água (ELETRONUCLEAR, 2014).

A PCU é um tanque retangular com 5,65 m de largura, 15,8 m de comprimento e 12,27 m de profundidade, o seu volume máximo (até a borda) é de 1.095.342,9 litros e seu volume útil é de 1.090.080 litros. Em operação normal o seu nível é de 17,54 m e o mínimo é de 17,39 m. Se o nível chegar até 17,95m ocorrerá o transbordamento da PCU (ELETRONUCLEAR, 2014).

O acionamento para a comporta só pode ser executado se a piscina e o canal de transferência estiverem com o mesmo nível de água. Com a comporta fechada é possível drenar o canal de transferência para o interior da PCU, com a utilização de uma bomba portátil, de modo a permitir manutenções no sistema de transferência de elementos combustíveis e em outros equipamentos que estejam no interior do canal de transferência (ELETRONUCLEAR, 2014).

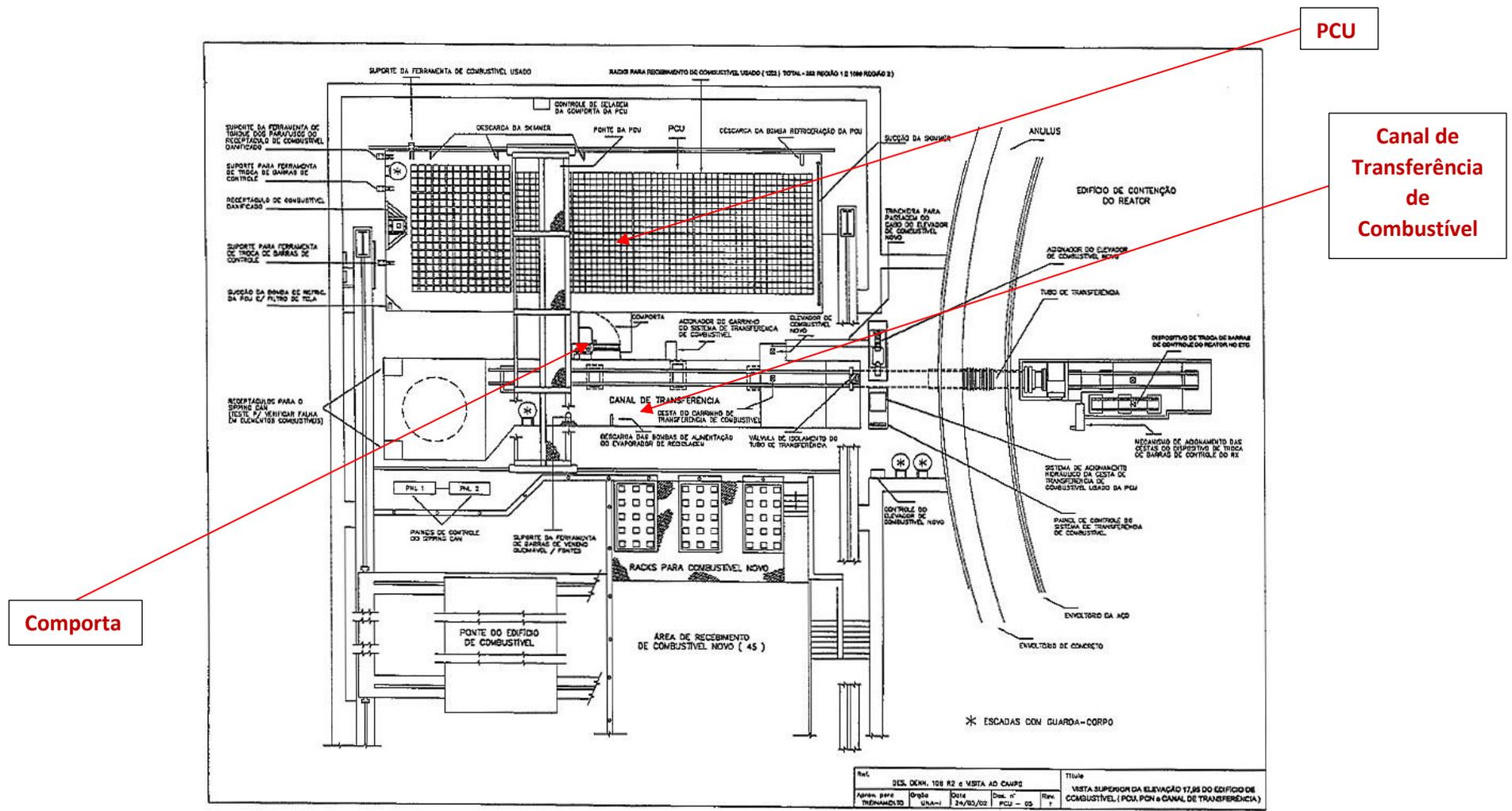


Figura 4: Desenho Vista Superior EL. 17,95 do ECB  
 Fonte: ELETRONUCLEAR (2016).

Esse canal tem um volume de útil de 537.470 litros e é por meio desse canal que o combustível do Reator chega até a PCU ou da PCU é levado até o Reator, durante as operações de descarregamento e recarregamento do núcleo (ELETRONUCLEAR, 2014).

Dentro da PCU ficam as células (racks), que recebem os elementos combustíveis usados e até alguns novos, em determinadas circunstâncias. (normalmente os elementos combustíveis novos são estocados em um outro conjunto de células ou racks que ficam no poço de combustíveis novos) (ELETRONUCLEAR, 2014).

Ainda no interior da PCU temos a linha de descarga da sua Bomba de Refrigeração (parcial) e o filtro de tela na linha de sucção da mesma bomba, as escumadeiras da sucção da Bomba de Purificação de Superfície e as suas três linhas de descarga, em forma de bica, as boias para alarme de nível baixo e alto da piscina e o sensor de temperatura da água PCU (ELETRONUCLEAR, 2014).

Com combustível estocado na PCU a concentração de boro é amostrada periodicamente e tem como limites 2.500 e 3.000 ppm. O boro é necessário para manter a margem de desligamento adequada na PCU, sem entrar na faixa do Coeficiente de Temperatura Positivo (Alfa do Moderador Positivo) na piscina (ELETRONUCLEAR, 2014).

### 2.3.2 Sistema de Refrigeração e Purificação de Superfície da PCU

O sistema de refrigeração da PCU, através do trocador de calor e da bomba de refrigeração, tem a função de remover o calor gerado pelo decaimento radioativo dos elementos combustíveis usados, estocados na PCU. Já o sistema de purificação de superfície, através de filtro e da bomba de recirculação tem a função de remover as impurezas que ficam na superfície da água da PCU, mantendo uma boa visibilidade, facilitando o manuseio das ferramentas, dos elementos combustíveis e de seus acessórios (ELETRONUCLEAR, 2014).

### 2.3.3 Sistema de Purificação da Água de Recarregamento

O sistema de purificação da água de recarregamento, através da bomba de recarregamento e filtros, tem a função de clarificar e reduzir a atividade da água

utilizada para recarregamento, mantendo a atividade no tanque inferior a 10 Ci, desconsiderando-se a contribuição do trítio e dos gases nobres. Esta água pode estar no Tanque de Água de Recarregamento, na Cavidade de Recarregamento ou na PCU (ELETRONUCLEAR, 2014).

## 2.4 MICRORGANISMOS EM USINAS NO MUNDO

Em usinas nucleares no mundo já foram observadas a proliferação de algas, fungos e bactérias, que juntos formam um biofilme, que podem ou não comprometer as superfícies da PCU (IAEA, 1997).

Em 1990 na Usina de Jaslovské Bohunice na República Eslováquia foi detectado o crescimento de espécies biológicas na água da piscina de combustível (IAEA, 1997). Os fenômenos resultaram em floculação de biomassa na superfície da piscina e uma diminuição parcial na clareza da água. O crescimento de biomassa ocorreu principalmente devido as condições favoráveis a sua formação devido ao baixo fluxo e temperatura da água da piscina. Na biomassa foram identificadas bactérias *psicrofílicas* (crescem em baixas temperaturas) e mesófilos (crescem em temperaturas moderadas) e *micromycetos* (fungos microscópicos) (IAEA, 1997).

No Canadá, na Usina de Pickering o frequente entupimento de filtros de purificação de piscina, era causado pelo crescimento de algas unicelulares não flageladas na PCU. As bactérias observadas nos filtros foram *Actinomyces* (bactérias anaeróbicas gram-negativas) e *polysaccharides*. As paredes e o fundo da piscina de combustível foram escovados com adição de peróxido de hidrogênio na concentração de 150 ppm à água da piscina para eliminar o biofilme (IAEA, 1997).

Em Valencia, na Espanha, em estudos microbiológicos com base em métodos de cultura padrão e sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) foi constatado a formação de biofilmes sobre diferentes corpos de prova, apesar das condições oligotróficas e radioativas da água (SARRO *et. al.*, 2005). No estudo foram imersos na PCU corpos de prova de placas em aço inoxidável austenítico e titânio (99,9), em condições estáticas e dinâmicas. Após 34 meses de imersão foi observado através da microscopia eletrônica e de epifluorescência um biofilme formado sobre as amostras. Foram identificadas 57 bactérias diferentes pertencentes filios  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteridae* (bactéria gram-positiva). A radioatividade do biofilme foi medida utilizando

espectrometria de raio  $\gamma$ , revelando que os biofilmes foram capazes de fixar radionuclídeos, especialmente Cobalto 60. SARRO *et. al.*, 2005.

A experiência das usinas no mundo confirma a identificação de microrganismos e formação de biofilmes nas piscinas de combustível, mesmo com parâmetros de alta qualidade em termos das características físico, química e radiométrica da água da piscina, embora não comprometa a integridade e o ambiente ocupacional. Este fato evidencia a importância do nosso trabalho, na identificação das bactérias na PCU de Angra 1.

## 2.5 METAGENÔMICA

A caracterização da comunidade de microrganismos por metagenômica tem sido empregada não apenas na identificação de microrganismos, mas principalmente para identificar a função que a microbiota exerce no ambiente. A obtenção do perfil do microbioma é realizado através da identificação de sequências de DNA pertencentes aos microrganismos presentes em uma amostra ambiental. A discriminação dos microrganismos é feita por comparação em bancos de dados de sequências disponíveis, tais como o GenBank (NCBI, s.d. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: Agosto de 2016).

O sequenciamento Sanger durante longos anos era tido como método padrão como sequenciador de DNA. Esse método exigia um longo tempo para processar os dados a um alto custo, razão pela qual houve uma busca por métodos mais rápidos e custos reduzidos para sequenciamento de DNA em grande escala. Nas últimas três décadas as técnicas de sequenciamento avançaram de tal forma que surgiram sequenciadores chamados de nova geração, cuja tecnologia permitem rapidamente a caracterização genômica, metagenômica além da definição de pequenos perfis de pequenos RNAs e mRNAs (GOYA *et. al.*, 2012).

Nos dias de hoje encontramos diversas metodologias tais como: *MiSeq* e *HiSeq* (*Illumina*), 454 Piro sequenciamento (Roche), AB SOLiD (*Life Technologies*), *Ion Torrent* PGM (*Life Technologies*), e muitos outros, cada qual com suas próprias características de resolução, química e frequência de erros (ROTHBERG *et. al.*, 2011; SALIPANTE *et. al.*, 2014). Todas essas novas tecnologias superam na rapidez do processamento de sequenciamento o método de Sanger e devem ser aplicadas para

cada caso dentro da especificidade agregando três fatores custo, tempo e benefício na obtenção dos resultados (GOYA *et. al.*, 2012).

### 3 JUSTIFICATIVA

A Usina Nuclear de Angra 1, para atender a extensão de vida útil de 40 para 60 anos vem realizando uma reavaliação de engenharia em todo seu projeto. A PCU de Angra 1 é uma das áreas a serem estudadas visando demonstrar sua integridade e capacidade de armazenamento os elementos combustíveis de forma segura e desta forma, possibilitar o prolongamento da vida útil da usina.

Microrganismos que se desenvolvem no “*liner*” do CTC e na PCU de uma usina podem formar filmes bacteriológicos resistentes à alta radiação. Ocorrências desse tipo já foram observadas em unidades de países como: República Eslováquia, Canadá (IAEA, 1997) e Espanha (SARRO *et. al.*, 2005 e CHICOTE *et. al.*, 2004), até o momento nenhum estudo desse tipo foi realizado no Brasil.

Este trabalho pretende a partir da interpretação das análises biológicas 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*”. Com esse conhecimento será possível avaliar a eficácia ou a possível reavaliação da metodologia de análise e tratamento da água da piscina.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

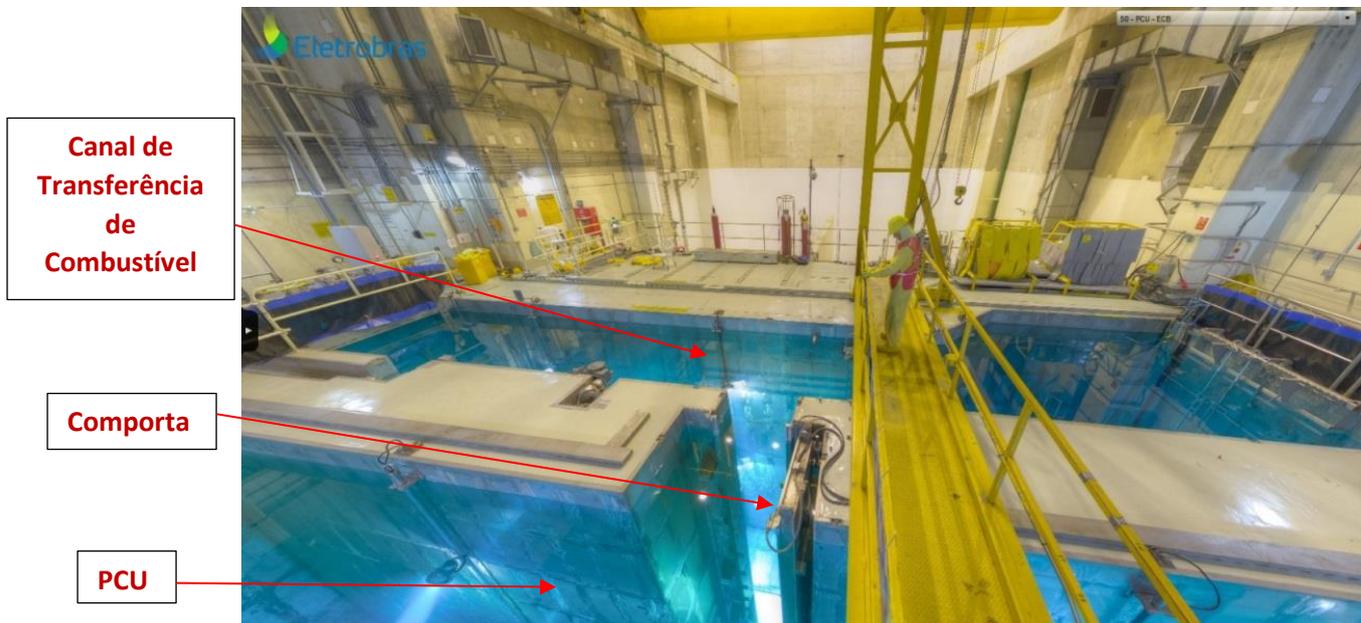
- Identificar a ocorrência de microrganismos na PCU da Usina Nuclear de Angra 1.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de microrganismos crescendo sobre os revestimentos “*liners*” na superfície da PCU, do CTC e dos drenos do ECB.
- Testar a eficácia de métodos moleculares modernos na identificação dos microrganismos encontrados.
- Avaliar a eficácia do sistema e, eventualmente, propor melhorias no tratamento da água da piscina.

## 5 LOCAL DE ESTUDO

A PCU tem como função o armazenamento seguro e subcrítico dos elementos combustíveis irradiados, mantendo a sua refrigeração e assegurando que os mesmos estejam sempre cobertos com água. Ela é construída em concreto armado reforçado e revestido com chapas de aço inoxidável (ASTM A240, tipo 304L) com espessura de 6 mm em painéis soldados com cerca de 1,5 m<sup>2</sup>, denominadas de “*liner*”. Está localizada no ECB, e sua capacidade de armazenamento nos racks supercompactos é de 1252 elementos combustíveis (ALMEIDA, 1999).



**Figura 5: Vista da PCU, Comporta Aberta e CTC EL. 17,95 no ECB**

Fonte: ELETRONUCLEAR (2016).

O concreto, revestido por resina de epóxi, contém sulcos setoriais que direcionam a água borada, em caso de passagem pelas micro trincas nos painéis, para os 19 pontos de drenos, localizados no ECB na elevação de 5,15, que são assim distribuídos e identificados no Quadro 3 e nas Figuras 6 e 7:

O “*liner*” é projetado para que não haja fuga para o meio ambiente, a saída dos drenos é direcionada através de canaletas para os drenos e conduzidas através de tubulação para os tanques de rejeitos de forma segura, atendendo as premissas de projeto.

Quadro 3: Identificação das linhas de drenagem dos 19 drenos do ECB

IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAS DE DRENAGEM DO EDIFÍCIO DO COMBUSTÍVEL	
ÍTEM	POSIÇÃO DO DRENO
1	PAREDE LADO SUL DA ÁREA DO CASK EL.5,05
2	FUNDO LADO LESTE DA ÁREA DO CASK EL.4,20
3	PAREDE LADO NORTE DA ÁREA DO CASK EL.5,05
4	PAREDE LADO NORTE DA COMPORTA DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.7,95
5	FUNDO LADO SUL DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.5,50
6	PAREDE LADO SUL DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.7,95
7	FUNDO LADO SUL DO ELEVADOR DE COMBUSTÍVEL EL.5,50
8	PAREDE LADO SUL DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.6,45
9	PAREDE LADO NORTE DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.6,45
10	FUNDO LADO LESTE DA PISCINA DE COMBUSTÍVEL EL.5,50
11	FUNDO LADO OESTE DA PISCINA DE COMBUSTÍVEL EL.5,40
12	PAREDE LADO OESTE DA PISCINA DE COMBUSTÍVEL EL.6,30
13	PAREDE LADO NORTE DA PISCINA DE COMBUSTÍVEL EL.6,30
14	PAREDE LADO SUL DA PISCINA DE COMBUSTÍVEL EL.6,30
15	DRENO DO FUNDO DA COMPORTA EL.9,689
16	DRENO DO FUNDO DA COMPORTA EL.10,022
17	PAREDE LADO LESTE DO SS LINER EL.6,30
18	FUNDO LADO LESTE DO CANAL DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL EL.5,50
19	TUBO DE TRANSFERÊNCIA DE COMBUSTÍVEL LADO LESTE EL.7,34

Fonte: ELETRONUCLEAR (2016).

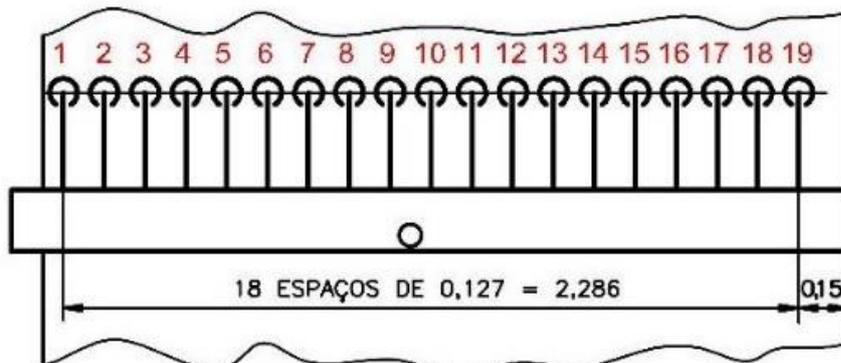


Figura 6: Identificação da saída dos 19 pontos de drenos, EL. 5,15

Fonte: ELETRONUCLEAR (2016).



**Figura 7: Foto da Saída dos 19 pontos de drenos, EL. 5,15**

Fonte: Autor (2016).

A Usina Nuclear de Angra 1 realizou em 2014 inspeção, com caixa de vácuo e reparo com epóxi de cura subaquática, em 90% do “*liner*” do CTC e parte da PCU. A Engenharia de Sistemas monitora periodicamente os 19 drenos e os valores encontrados são considerados extremamente baixos, ou seja, 2,5 L/dia em 1.627.550 L (Volume total do CTC e da PCU) (Quadro 4).

Quadro 4: Monitoração dos Drenos do ECB

MONITORAÇÃO DOS DRENOS "Liner ECB"								
2014 - 2005								
DADOS LOCALIZAÇÃO								Inspeção - 1P20 Caixa de Vácuo Sim/Não
Dreno	15/08/ 2014*	11/08/ 2014*	01/08/ 2014*	03/06/ 2014*	2005**	PCU	Canal Transferência	
Taxa mL/h (< 1 mL/h desprezado)								
1	-	-	-	-	-	-	P. S. CASK EL. 5,05	Não - Área FARU
2	-	3	8	-	-	-	F. L. CASK EL. 4,20	Não - Área FARU
3	-	-	-	-	-	-	P. N.CASK EL. 5,05	Sim / Parcial – 1 ponto
4	-	-	-	-	-	-	P. N. C. C. EL. 7,95	Sim / 14 pontos
5	4	4	2	10	-	-	F. S. C. EL. 5,50	Sim / Parcial – zero ponto
6	-	-	-	-	-	-	P. S. C. EL. 7,95	Não realizado
7	-	-	-	-	-	-	F. S. Elevador EL. 5,50	Não liberada DIPR.O
8	-	-	-	-	-	-	P. S.C. EL. 6,45	Sim / Parcial – zero ponto
9	12	16	20	12	10	-	P. N. C. EL. 6,45	Não realizado
10	8	15	20	20	9	F. L. EL. 5,50	-	Não acesso / Racks
11	51	58	66	40	32	F. O. EL. 5,40	-	Não acesso / Racks
12	-	-	-	-	-	P.O. EL. 6,30	-	Não acesso / Racks
13	10	9	16	-	3	P.N. EL. 6,30	-	Não acesso / Racks
14	11	13	22	18	9	P.S. EL. 6,30	-	Sim / Parcial – 9 pontos
15	-	-	-	-	-	-	F. C. EL. 9,689	Sim / zero ponto
16	5	17	42	10	8	-	F. C. EL. 10,02	Sim / zero ponto
17	4	4	2	5	-	P.L. EL. 6,30	-	Não acesso / Racks
18	-	-	-	-	-	-	F. L. C. EL. 5,50	Não liberada DIPR.O
19	-	-	-	-	-	-	T. T. L. EL. 7,34	Não liberada DIPR.O
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>139</b>	<b>198</b>	<b>115</b>	<b>71</b>	<b>0,105 L/h = 2,5 L/dia em 1.627.550 L</b>		

\* Pesquisa realizada por Darcy Muniz e Rodrigo Vieira - GDU.O / ramal 9128 e 8157

Condições: Núcleo Carregado + Gate fechada + Comporta Fechada + Temperatura PCU = 35° C e Canal = 35° C

\*\*Pesquisa realizada por Darcy Muniz / GDU.O / ramal 9128 - Referência Relatório OU3.10.97 "Vazamento pelo Liner da PCU"

Fonte: Autor (2016).

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, RADIOQUÍMICOS E RADIOMÉTRICO 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.

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  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 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  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Fluoreto < 150  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Sílica Total, Sólidos em Suspensão < 50  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Sulfato < 150  $\mu\text{g}/\text{L}$  (ELETRONUCLEAR, 2016).

### 6.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Inicialmente foi realizada a coleta de uma amostra piloto para uma avaliação radiológica preliminar, na Eletronuclear, pela Engenharia de Sistemas e as análises de dados para a liberação 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 14 amostras, com a liberação do transporte pela CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear de Angra 1 para o IBCCF.

#### 6.2.1 Calibração do Espectrômetro

Uma amostra piloto foi coletada com um SWAB a 15 cm abaixo da lamina d'água do CTC, em 30/07/15. A haste do SWAB foi manuseada, na sua metade, esfregada de forma firme, no sentido de cima para baixo e vice-versa, logo após girada em cerca de 180 graus e repetido o movimento. Logo após inserida no tubo do SWAB e devidamente identificada.

Os valores dos radionuclídeos da radioatividade para cada uma das 14 amostras dos SWABS, os quais foram registrados previamente de forma conservativa, através da espectrometria contendo os seguintes radionuclídeos Cr-51, Co-58, Co-60 e Cs-137 totalizando uma atividade de  $5.122E+002$  Bq/g para cada SWAB, a serem liberadas para transporte para o IBCCF.

Um novo SWAB foi utilizado como amostra piloto para obtenção dos pesos das partes separadas, a fim de estimarmos o peso total, juntamente com os valores dos radionuclídeos das 14 amostras necessárias para solicitação de autorização da CNEN, para liberação do transporte para o IBCCF.

Os valores encontrados, tanto em relação ao radionuclídeos como peso total = 512 Bq/g, estavam bem abaixo dos valores previstos na legislação, este fato permitiu dar continuidade a coleta das amostras.

#### 6.2.2 Pontos 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.

No canal de transferência e PCU (Figura 8) foram realizadas as seguintes coletas. Foram coletadas com SWAB a 15 cm abaixo da lamina d’água. A haste do SWAB foi manuseada, na sua metade, esfregada de forma firme, no sentido de cima para baixo e vice-versa, logo após girada em cerca de 180 graus e repetido o movimento. Logo após inserida no tubo do SWAB e devidamente identificada.

- Quatro amostras coletadas em diferentes pontos a 15 cm abaixo da linha d’água, em diferentes pontos do CTC (CS - Canal Submerso);

- Quatro amostras coletadas em diferentes pontos da piscina a 15 cm abaixo da lamina d’água da PCU (PS - Piscina Submersa).

No caso dos drenos, durante a coleta, a haste foi manuseada, na sua metade, introduzida no interior do dreno e “esfregada” de forma firme, circulando a parede do dreno.

- Três amostras oriundas dos drenos secos (DS) < 1 mL/h (desprezado:  
DS1 – amostra coletada nos drenos 1, 3 e 4;  
DS2 - amostra coletada nos drenos 6, 7 e 8;

DS3 - amostra coletada nos drenos 2, 15, 18 e 19.

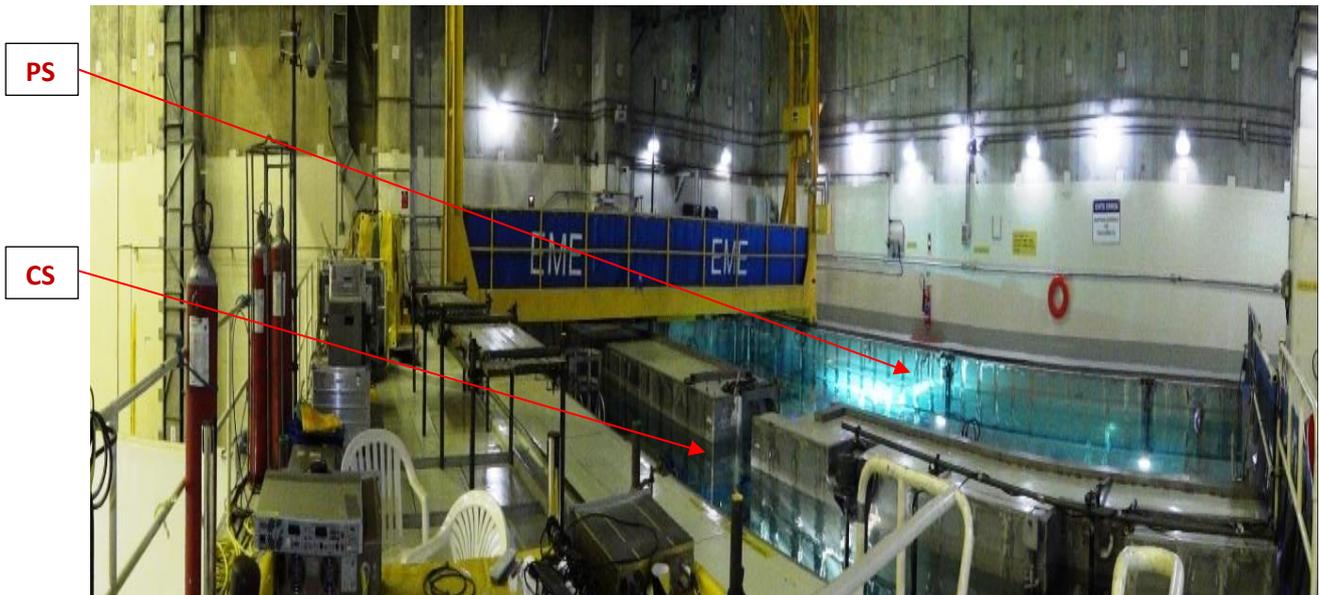
– Três amostras oriundas dos drenos úmidos (DU):

DU4 - amostra coletada nos drenos 2, 5 e 9;

DU5 - amostra coletada nos drenos 10, 11 e 13;

DU6 - amostra coletada nos drenos 14, 16 e 17.

Após a amostragem os SWABs foram imediatamente inseridos no tubo estéril, etiquetados e armazenados em caixa de isopor, sem gelo.



**Figura 8: Pontos de Coleta das Amostras no CTC e na PCU da Usina Nuclear de Angra 1, PS - Piscina Submersa e CS - Canal Submerso**

Fonte: Autor (2016).

### 6.2.3 Licença para análise das Amostras

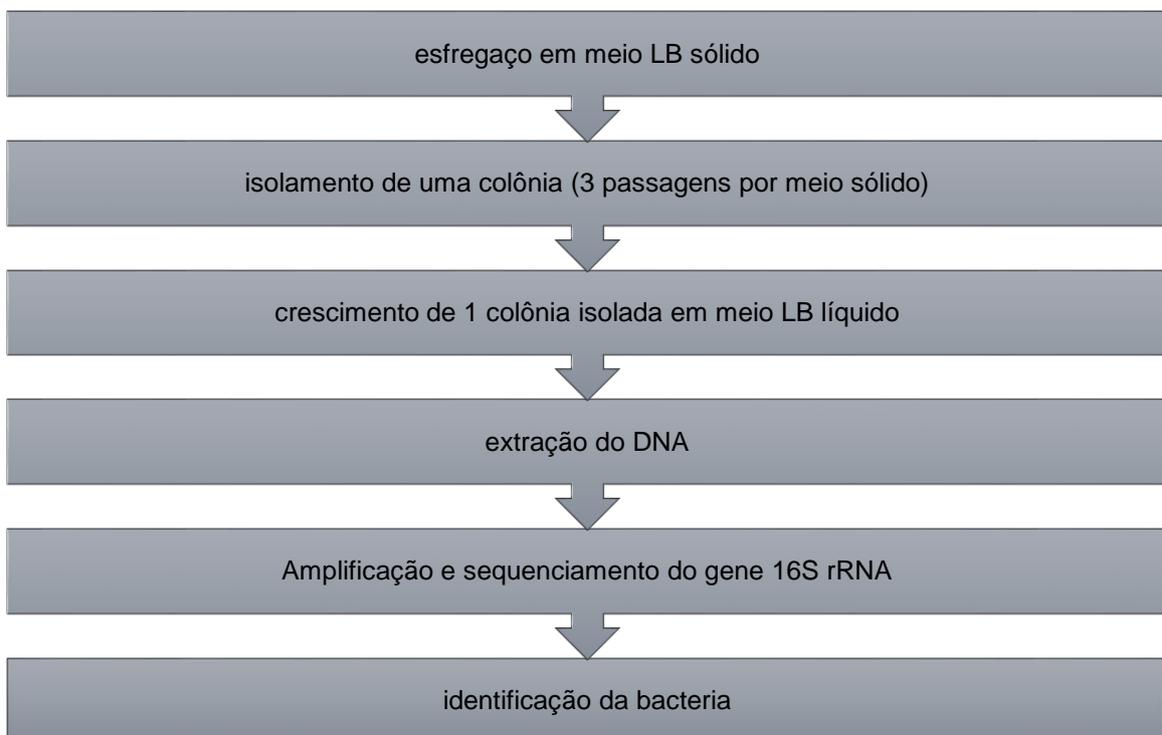
As amostras foram coletadas, através da Licença de Trabalho Radiológico N° 543 no dia 09/12/15 entre 9:45 h e 11:35 h, com a temperatura da água da PCU em 35°C e EL. 17,45 da lamina d'água, após a coleta na PCU e nos drenos foram levadas ao Laboratório Químico na Área Controlada para realização da espectrometria 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 SWAB's 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<sup>o</sup> C para posterior análise.

### 6.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA POR ISOLAMENTO

#### 6.3.1 Crescimento e Isolamento de Bactéria em Meio de Cultura

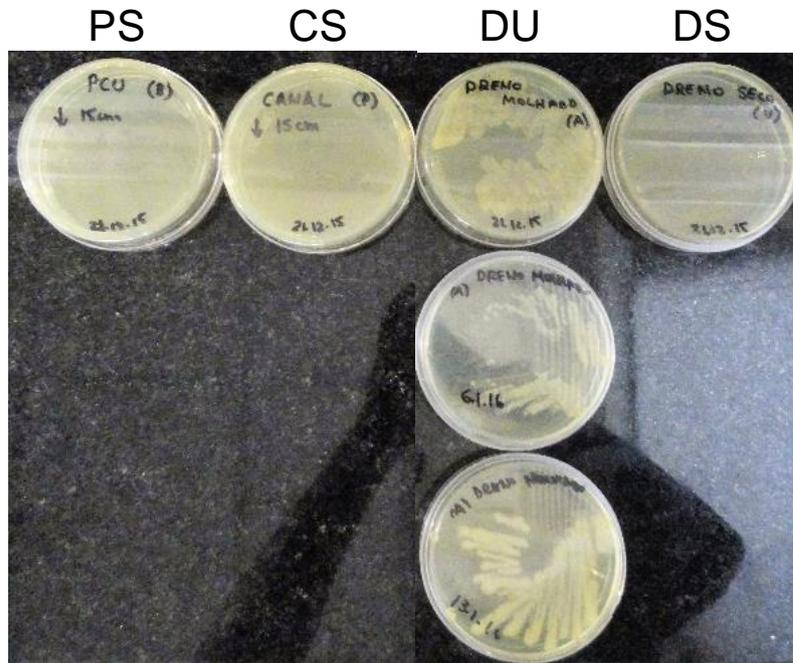
Para o crescimento dos microrganismos foi realizado um esfregaço com os swabs em meio de cultura LB agar fresco (1%Triptona; 0,5% Extrato de Levedura - 1% de NaCl – 1%, pH 7,0 em 1,5% de agar) em placas de Petri. As placas foram mantidas a 37<sup>o</sup> C ou a 55<sup>o</sup> C por 16 h. Após esse período as placas foram inspecionadas quanto a formação de colônias de bactérias. Após a observação de crescimento em uma determinada placa, o isolamento das colônias foi realizado através de três replaqueamentos consecutivos em meio de cultura LB agar (estéril) Figura 9.



**Figura 9: Fluxograma das etapas de crescimento, isolamento e identificação da bactéria**

Fonte: Autor (2016).

O cultivo de microrganismos foi realizado em placas de Petri com meio LB agar fresco (3 réplicas), na Figura 10 podemos verificar visualmente, que somente a amostra DU houve crescimento de microrganismos.



**Figura 10: Placas de Petri após seis dias em meio de cultura indicando crescimento de colônias de bactérias.**

Fonte: Autor (2016).

Com objetivo de identificar a bactéria isolada, foi utilizado o gene do 16S rRNA como alvo para o sequenciamento e posterior comparação e busca de similaridade com banco de dados de sequencias bacterianas. Para tal, uma colônia isolada da bactéria foi cultivada em meio LB líquido por 16 horas a 37°C com agitação. A cultura em meio líquido foi centrifugada a 5000 rpm a 4°C em rotor SSA na centrifuga 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 *NanoDrop spectrophotometer* (Thermo Scientific).

## 6.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA POR MÉTODO DE SANGER

Uma alíquota do DNA (10 ng) isolada das culturas de bactérias foi submetida a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene 16S rRNA envolvendo as regiões [V1V2] e [V6V7V8] do gene 16S rRNA. (TWACACATGCAAGTCGARCG; sequência antisense CGAGTTGCAGACTVCAATCCG). 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 e 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 nas duas fitas do DNA, utilizando o BigDye® Terminator 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).

### 6.4.1 Análise das Sequências

Após o sequenciamento nas duas fitas foi confirmado e a sequência consenso produzida, 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 sequências. Em seguida, a sequência consenso foi submetida a ferramenta de busca BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados nr de bactérias.

## 6.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências 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.

## 6.6 ANÁLISE DE METAGENÔMA DAS AMOSTRAS COLHIDAS NA PISCINA, CANAL E DRENOS (SEQUENCIAMENTO RANDÔMICO (*SHOTGUN*))

### 6.6.1 Extração do DNA das Amostras Ambientais

Para tal, foi necessário a extração de DNA total da comunidade microbiana presente nas amostras da ponta das hastas contendo o algodão. Esta foi feita para cada 2 cotonetes da mesma amostra. Estes foram imersos em solução de tampão TNE (10mM de Tris pH 8,0; 5mM de EDTA e 0,2M de NaCl) seguido de 1/10 do volume de SDS 20% e 1/20 do volume de proteinase K (20mg/ml).

A mistura foi incubada a 37°C por 16 horas. Após a verificação se o material foi solubilizado, a mistura foi separada por centrifugação e as pontas dos cotonetes foram removidas da solução. A mistura foi adicionada igual volume de fenol-saturado em tampão Tris, que foi agitado em vortex. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm (centrifuga eppendorf) por 5 minutos.

A fase aquosa foi transferida para tubo eppendorf de 2mL e extraído com igual volume de clorofórmio e centrifugado como acima. Novamente a fase aquosa era removida para outro tubo e eram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto e a nova mistura incubada a -20°C por 16 horas.

A mistura era centrifugada a 15.000 rpm (centrifuga eppendorf) por 10 minutos. O precipitado (DNA) foi lavado com 0,5mL de etanol 70% gelado. O DNA foi ressuspenso em solução TE-4 (Tris 10mM e EDTA 0,1mM, pH7,5) e armazenado a -20°C após dosagem por *fluorimetria*. Foram combinadas e processadas as amostras dos quatro cotonetes referentes a piscina (PS), dos quatro cotonetes do canal de transferência (CS), dos três cotonetes referentes aos drenos secos (DS) e dos três cotonetes do dreno úmido (DU).

## 6.7 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PARA SEQUENCIAMENTO RANDÔMICO (SHOTGUN)

Para o sequenciamento randômico, o DNA total das amostras foi quantificado no fluorímetro Qubit® (Invitrogen).

**Quadro 5: Quantificação do DNA presente nas amostras**

Amostras	Volume da amostra μL	Quantificação ng/mL	Total ng	Volume para análise com 100 ng
PS	50	5.5	275	18 mL
CS	50	0.86	43	116mL
DS	100	1.47	147	68mL
DU	100	60	6200	1,6 mL

Fonte: Autor (2016).

### 6.7.1 Sequenciamento Semicondutor Por *Ion Torrent* PGM

Neste estudo foi escolhida a plataforma *Ion Torrent* como tecnologia de sequenciamento, com auxílio *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM). A fase da composição do sequenciamento ocorre através da medição na alteração no pH por conta da liberação do ion hidrogênio no momento da incorporação de nucleotídeos, já na fase de síntese por um transistor e convertida em um sinal elétrico (ROTHBERG *et. al.*, 2011). O sistema de detecção de alterações no pH durante a incorporação de bases reduz sensivelmente o custo do sequenciamento quando comparado com outras tecnologias que utilizam sistemas de detecção de luz (GLENN, 2011).

A partir de então seguiu se a mesma forma de outras tecnologias de sequenciamento de nova geração, a fase inicial consiste na construção da biblioteca de fragmentos de DNA. Inicialmente foi realizada a fragmentação do DNA genômica, realizado pelos processos enzimáticos. Independentemente da escolha do método de fragmentação, objetivamos fragmentar o DNA de maneira aleatória assim obtemos o genoma coberto mais uniformemente possível durante a hora da montagem. Durante a construção das bibliotecas de produtos amplificados (*amplicons*) buscou se o tamanho ideal para leitura do sequenciador (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

Logo após concluído o processo de fragmentação partiu-se para a fase de ligação de adaptadores e *barcodes*, desta forma as sequências artificiais conhecidas foram incorporadas aos fragmentos de DNA permitindo que as diversas amostras fossem devidamente amplificadas, enriquecidas e sequenciadas simultaneamente (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

A fase seguinte foi à amplificação da biblioteca. O objetivo desta fase foi o aumento da fonte de sinal iônico que foi detectado no momento do sequenciamento. O *Ion Torrent* utiliza o método de amplificação PCR em emulsão, neste momento, gerando diversas cópias de fragmentos de DNA pela amplificação clonal. Na PCR milhões de micro reatores em uma emulsão de óleo, foram criados, com os reagentes necessários na obtenção da reação de PCR e de pequenas esferas chamadas de *beads* ou *Ion Sphere* cobertas com sequências complementares aos adaptadores. A função das sequências complementares foi a fixação dos clones de fragmentos de biblioteca na esfera, além de atuarem como iniciadores para a PCR (ROTHBERG *et. al.*, 2011). Finalmente, o objetivo foi a obtenção dos *beads* monoclonais, quando um único fragmento de DNA estivesse devidamente incorporado em uma única esfera.

Entretanto em alguns casos ocorrem de *beads* policlonais, onde múltiplos fragmentos de DNA, são incorporados em uma única esfera e de *beads* vazias, ou seja, neste caso não tivemos fragmento de DNA incorporado à esfera. Quando ocorrem casos de *beads* vazias, automaticamente elas são eliminadas durante o procedimento de enriquecimento das amostras e as *beads* policlonais são detectadas e os *reads* gerados a partir de amplificação policlonal são eliminados (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

O fator mais importante que afeta a etapa de amplificação é a quantificação do DNA. Caso ocorra o DNA subquantificado, significa que existe mais DNA na amostra do que o reportado, conseqüentemente o resultado deverá ser o aumento da quantidade de *beads* policlonais. No caso da obtenção do DNA sobre quantificado, significa que existe menos DNA do que o reportado, o resultado deverá ser uma quantidade muito pequena de *beads* com fragmentos (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

O processo do sequenciamento através do *Ion Torrent* PGM é bem diferente da maioria dos sequenciadores que utilizam uma DNA polimerase para gerar a fita complementar ao modelo com bases marcadas por fluoróforos e câmeras de detecção. A detecção ocorre diretamente, no momento da reação de polimerização

gerando naturalmente um hidrogênio, de forma que, um próton, que altera o pH do meio. A alteração do pH deverá ser detectada por um transistor ISFET e convertida em um sinal elétrico (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

O fato do sequenciamento das amostras serem feitas em chips de silício é mais uma diferença da tecnologia *Ion Torrent*, que contém milhares de poços microscópicos um pouco maiores que as *beads* com fragmentos de DNA, neste caso, em cada poço, caberá apenas uma *bead*. Este chip, também estarão os transistores ISFET em cada poço, que detectam o sinal das mudanças de pH (ROTHBERG *et. al.*, 2011).

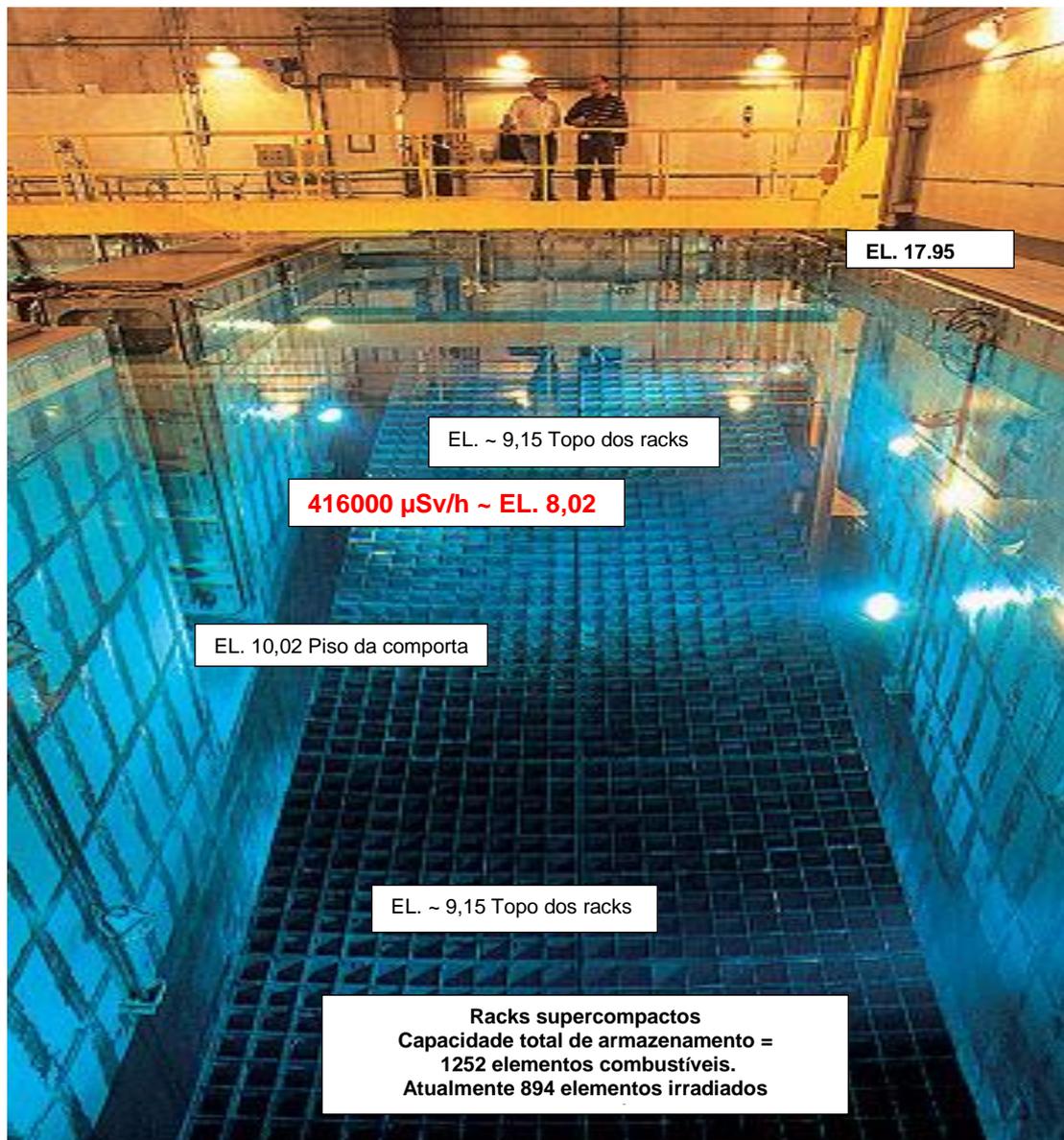
Foram construídas quatro bibliotecas a partir do material combinados das quatro amostras PS, CS três amostras DS e DU e as etapas de preparação das amostras para o sequenciamento randômico.

Inicialmente, 100 ng de DNA de cada amostra foi fragmentado enzimaticamente durante dois minutos utilizando o kit *Ion Shear<sup>TM</sup>*, conforme orientações do fabricante. Com isso, foram obtidos fragmentos com tamanho de 200 pb, ideal para protocolo de sequenciamento em *Ion PGM*. Os padrões de fragmentação foram avaliados por eletroforese micro fluídica, em equipamento *Bioanalyzer* (Agilent).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 LEVANTAMENTO RADIOMÉTRICO DA PCU E CTC.

O levantamento radiométrico máximo indicou o valor de 416000  $\mu\text{Sv/h}$  ~ EL. 8,02 na PCU e 1400  $\mu\text{Sv/h}$  EL. 5,15 fundo do CTC (Figuras 11 e 12).



**Figura 11: Valor do Levantamento Radiométrico da PCU em 26/02/14**

Fonte: Adaptado de Eletronuclear - Divisão de Proteção Radiológica, (2016). Disponível em: <<https://www.google.com.br/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=fotos%20da%20piscina%20de%20combustível%20de%20anagra%201>>. Acesso em: Junho de 2016.



**Figura 12: Valor do Levantamento Radiométrico do CTC em 05/02/14**

Fonte: Eletronuclear - Divisão de Proteção Radiológica, (2016).

Fonte: Autor (2016).

## 7.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA PRESENTE NA AMOSTRA DU5

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. Na amostra DU5, após o isolamento de uma colônia de bactéria, partimos para sua identificação através da análise do segmento gene 16S rRNA. A bactéria isolada da colônia proveniente da amostra DU5 apresentou a sequência do gene 16S rRNA, conforme apresentada na Figura 13.

LOCUS Seq\_16S\_bact\_DU 1045 bp DNA linear UNA 04-Jun-2016

```

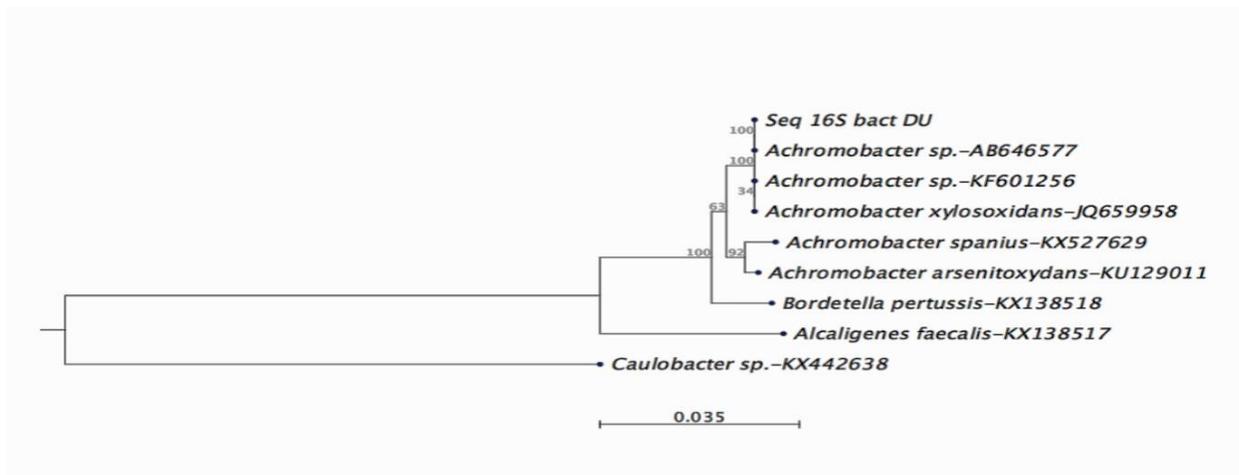
1  GCTAATACCG CATACGCCCT ACGGGGAAA GCAGGGGATC TTCGGACCTT GCACTATTGG
61  AGCGGCCGAT ATCGGATTAG CTAGTTGGTG GGGTAACGGC CTACCAAGGC GACGATCCGT
121 AGCTGGTTTG AGAGGACGAC CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
181 GAGGCAGCAG TGGGAATTT TGGACAATGG GGGAAACCTT GATCCAGCCA TCCCGCGTGT
241 GCGATGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTTGGCAGGA AAGAAACGTC GCGGGCTAAT
301 ACCCCGCGAA ACTGACGGTA CCTGCAGAAT AAGCACCGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG
361 CGGTAATACG TAGGGTGCAA GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG TGCGCAGGCG
421 GTTCGGAAAG AAAGATGTGA AATCCCAGAG CTTAACTTTG GAACTGCATT TTAACTACC
481 GGGCTAGAGT GTGTCAGAGG GAGGTGGAAT TCCGCGTGTA GCAGTGAAAT GCGTAGATAT
541 GCGGAGGAAC ACCGATGGCG AAGCGACCTT CCTGGGATAA CACTGACGCT CATGCACGAA
601 AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCCTAAAC GATGTCAACT
661 AGCTGTTGGG GCCTTCGGGC CTTGGTAGCG CAGCTAACGC GTGAAGTTGA CCGCCTGGGG
721 AGTACGGTCG CAAGATTAAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG ACCCGCACAA GCGGTGGATG
781 ATGTGGATTA ATTCGATGCA ACGCGAAAAA CCTTACCTAC CCTTGACATG TCTGGAATGC
841 CGAAGAGATT TGGCAGTGCT CGCAAGAGAA CCGGAACACA GGTGCTGCAT GGCTGTGCTC
901 AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT GTCATTAGTT
961 GCTACGAAAG GGCCTCTAA TGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC
1021 GTCAAGTCCT CATGGCCCTT ATGGG

```

**Figura 13: Sequência do gene 16S rRNA identificada para a colônia de bactéria isolada da amostra do dreno DU5**

Fonte: Autor (2016).

A sequência consenso de 1045 pares de bases foi submetida a análise filogenética (Figura 14) produzido a árvore NJ bootstrap de 1000 replicatas.



**Figura 14: Árvore filogenética de seqüências 16S rDNA do isolado bacteriano (Seq 16S bact DU) e de bactérias disponíveis em bases de dados públicas.**

Fonte: Autor (2016).

Esta árvore foi baseada em *Neighbour-joining* e construída utilizando alinhamento de 1040pb da região comparável das seqüências de genes 16S rDNA. A matriz de distancia foi calculada pelo método Jukes-Cantor. Os valores de *bootstrap* baseados em 1000 replicatas estão indicadas nos nós. A barra representa 0,035 divergência de seqüência. Os códigos indicados após o nome das espécies representam o acesso ao GenBank.

As análises levaram a identificação da bactéria como *Achromobacter sp. e/ou A. xylosoxidans* Yabuuchi and Yano 1981. Abaixo a classificação da bactéria.

Reino Bacteria

Filo: Proteobacteria

Classe: Betaproteobacteria

Ordem: Burkolderiales

Familia: 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 seguir é apresentada as características das bactérias encontradas (REFERENCE MD, s.d. Disponível em: <<http://www.reference.md/>>. Acesso em: Agosto de 2016).

1- *Acidobacteria* (Filo). Um fisiologicamente diverso filo de bactérias gram-negativas, acidófilas encontrados em uma grande variedade de *habitats*, mas particularmente abundante em solos e sedimentos.

2-*Actinobacteria* (Filo). Filo de bactérias gram-positivas com distribuição em todo o mundo e abundantes no solo, ou em animais, de águas continentais ou marinhas e, praticamente, qualquer superfície natural, com propriedades morfológicas diversas. Cepas de *Actinobacteria* mostram maiores do que a similaridade da sequência 80% 16S rDNA/rRNA entre uns aos outros e, também, a presença de certos nucleotídeos de assinatura. (STACKEBRANDT *et. al.*, 1997).

3-*Bacteroidetes* (Filo). Um filo de bactérias composta de três classes: Bacteroides, Flavobacteria e Esmingobacteria.

4- *Clamidiae* (Filo). Uma ordem de bactérias gram-negativas, anaeróbias intracelulares que têm o ciclo de desenvolvimento, como clamídia de replicação. Este é um ciclo de dois estágios que inclui uma forma infecciosa metabolicamente inativa e uma forma vegetativa que se reproduz por fissão binária. Membros da Clamidiales são disseminados por aerossol ou por contato. Há pelo menos seis famílias reconhecidas: Clamidiaceae, Criblamidiaceae, Paraclamidiaceae, Rabdoclamidia, Simkaniaceae e Waddliaceae.

5-Clorobi (Filo). Um filo de bactérias fototróficas que não libera oxigênio, incluindo a família Clorobiaceae. Eles ocorrem em sedimentos aquáticos e fontes termais onde utilizam compostos reduzidos de enxofre, em vez de oxigênio.

6-Cloroflexi (Filo). Filo de bactérias verdes não sulfurosas, incluindo a família Cloroflexaceae, entre outros.

7-Cianobacteria (Filo). Um filo de bactérias fotossintéticas que gera oxigênio, composto de bactérias clorofiladas que variam unicelulares para pluricelulares, Cianobactérias são os únicos organismos conhecidos capazes de fixar o dióxido de carbono (na presença de luz) e o nitrogênio. Morfologia celular pode incluir fixadoras de nitrogênio heterocistos e/ou células de descanso, chamadas acinetos. Anteriormente eram consideradas algas azuis – esverdeadas.

8-*Deinococcus-Thermus* (Filo). Bactéria gram-positiva aeróbica encontrada no solo considerada altamente resistente a radiação, especialmente radiação ionizante.

*9-Firmicutes* (Filo). Um filo de bactérias, predominantemente, gram-positivas que inclui as ordens Bacillales e Clostridiales. Firmicutes e Bacteroidetes são os dois filios bacterianos que constituem a maioria do intestino humano microbiota.

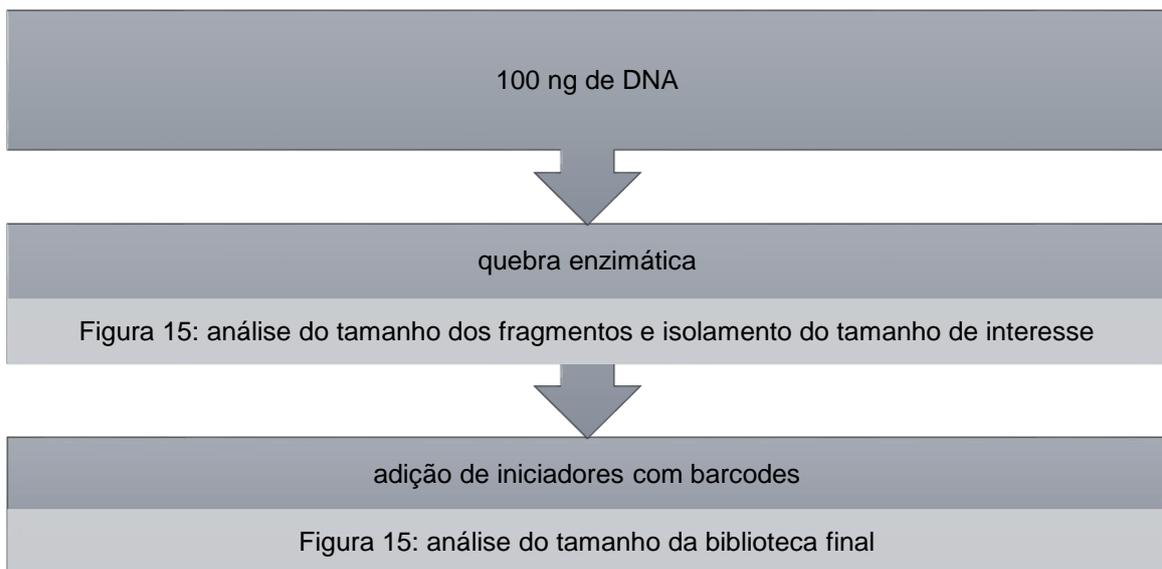
*10-Planctomycetos* (Filo). Um filo de bactérias gram-negativas, cujos membros são encontrados em uma variedade de habitats de água, bem como de tecidos animais. Formam um filo distinto do domínio de bactérias e possuem características incomuns, tais como a compartimentalização intracelular e uma falta de peptidoglicano em suas paredes celulares (FUERST; SAGULENKO, 2011).

*11-Proteobacteria* (Filo); É o mais abundante na natureza e para melhor classificar esta categoria são comumente tratados em suas respectivas 4 Classes encontradas neste trabalho: *Alfaproteobacteria*; *Betaproteobacteria*; *Deltaproteobacteria*; *Gamaproteobacteria*. A *Alfaproteobacteria* (classe) é composta principalmente de dois fenótipos principais: bactérias púrpuras não sulfurosas e bactérias aeróbias que contêm bacterioclorofila. A *Betaproteobacteria* (classe) é uma classe composta de bactérias quimioheterotróficas e quimioautotróficas que derivam nutrientes de decomposição da matéria orgânica. Incluem as Burkolderiales Hidrogenofilus Metilofilaceae Neisseriales Nitrosomonadales Procabacteriales Rodociclaceae. A bactéria isolada de amostra do dreno (DU) é uma espécie que foi identificada também na análise de metagenoma realizada neste estudo. A *Deltaproteobacteria* (classe). Bactérias, morfologicamente diverso, anaeróbicas representado por grupos sulfidogênicos. Alguns membros deste grupo são considerados predadores bacterianos, tendo propriedades bacteriolíticas. A *Gamaproteobacteria* (classe). Um grupo das proteobactérias composta de bactérias gram-negativas e anaeróbias facultativas. Bactérias de importância médica e científica, como as famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pseudomonadaceae. Nesta classe está presente um grande número de agentes patogênicos para o homem e animais tais como, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

*12- Verrucomicrobia* (Filo). Um filo de bactérias gram-negativas que contém sete classes e ocorre em uma grande variedade de ambientes. A maioria dos membros são quimioheterotróficos.

O estudo de CHICOTE *et. al.*, 2004 também isolou e identificou microrganismos fixados na parede da piscina de uma usina nuclear espanhola. Os autores amplificaram fragmentos de rDNA 16S de microrganismos por PCR utilizando *primers* universais para o domínio 'Bactérias'. O estudo revelou a presença de seis bactérias, pertencentes a três diferentes grupos filogenéticos: b-proteobactérias; Actinomicetales e o grupo de *Bacillus/Staphylococcus*. Um fungo também foi encontrado e identificado como *Aspergillus fumigatus* pelo sequenciamento da região de D2 do rDNA gene. Segundo os autores o isolamento destes microrganismos em condições oligotróficas e radioativas é de grande interesse devido à possibilidade de sua utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados por radionuclídeos.

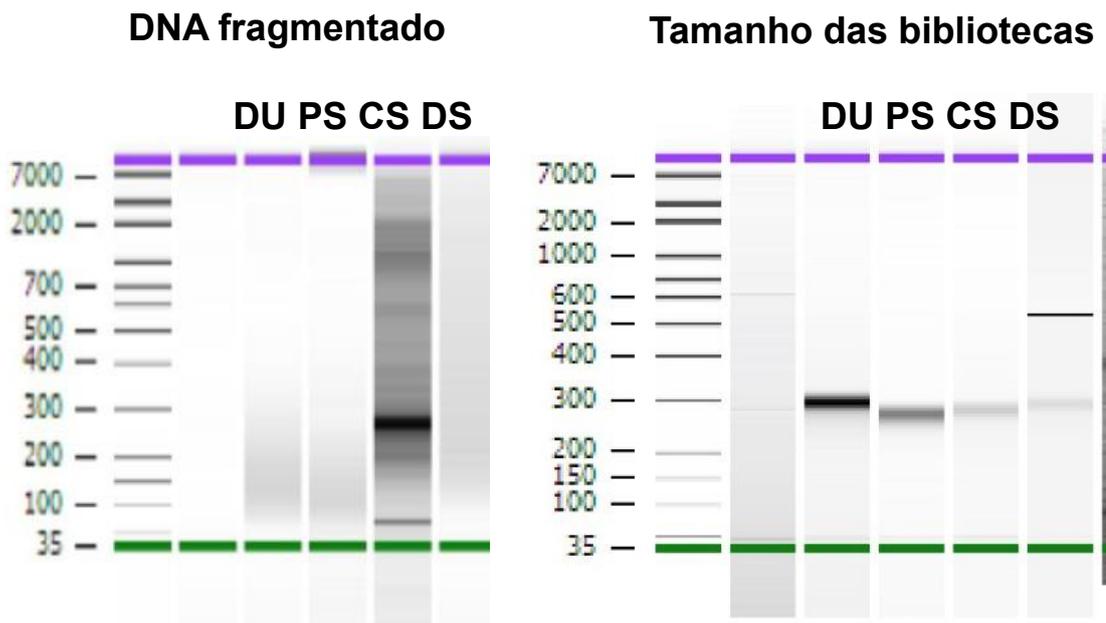
### 7.3 QUEBRA DO DNA GENÔMICO E PREPARO DAS BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS



**Figura 15: Fluxograma quebra do DNA genômico e preparo das bibliotecas metagenômicas**

Fonte: Autor (2016).

As bibliotecas foram preparadas de acordo com o Kit v3.1 (Life Technologies). Na Figura 16 podemos observar o tamanho de aproximadamente 200pb das bibliotecas obtidas.



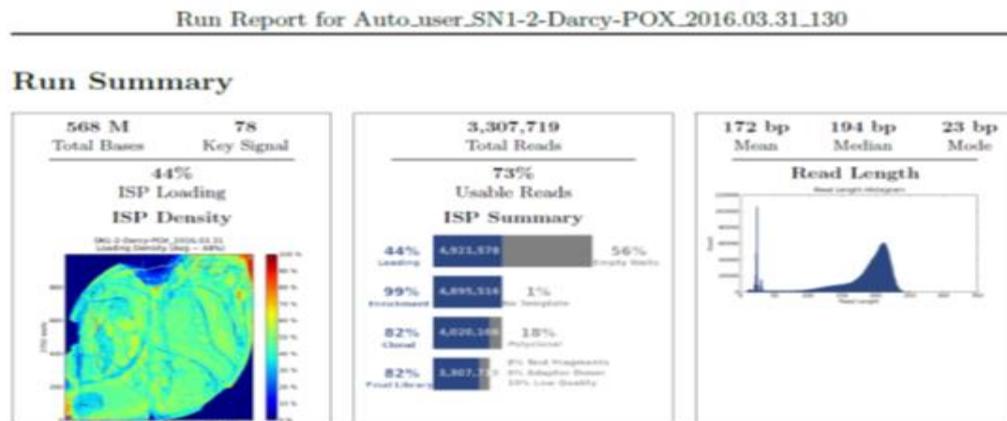
**Figura 16: Preparo das bibliotecas metagenômicas - Análise em gel microfluídico dos fragmentos obtidos das amostras (esquerda) e o tamanho das bibliotecas que foram sequenciadas de cada amostra (direita).**

Fonte: Autor (2016).

Para preparo das Ion Sphere<sup>TM</sup> Particles (ISPs) contendo DNA amplificado de forma clonal, foi feito PCR em emulsão no equipamento Ion OneTouch<sup>TM</sup> e utilizando-se o OneTouch<sup>TM</sup> 200 Template Kit para a biblioteca de 200 pb, de acordo com recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizado o enriquecimento das ISPs positivas utilizando-se o Ion OneTouch<sup>TM</sup> ES e OneTouch<sup>TM</sup> 200 Template kit. O protocolo de sequenciamento foi realizado com o Ion PGM<sup>TM</sup> 200 Sequencing Kit para a biblioteca randômica, onde os fragmentos possuem em torno de 300 pb.

#### 7.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DA BIBLIOTECA RANDÔMICA

Todas as amostras foram sequenciadas em Ion Torrent PGM<sup>TM</sup> (Personal Genome Machine). A Figura 17 indica o relatório da corrida dessas amostras.



**Figura 17: Relatório de corrida em *Ion Torrent* PGM contendo quantidade e qualidade das sequências de DNA total obtidas. O relatório é gerado através do software *Torrent Browser***

Fonte: Autor (2016).

## 7.5 ANÁLISE DOS DADOS PELA BIOINFORMÁTICA

Após o sequenciamento, foi gerado um relatório de qualidade de bases através do *Torrent Browser*, no servidor da plataforma *Ion Torrent*. As sequências obtidas de todas as amostras foram retiradas do servidor no formato FASTQ e analisadas no MG-RAST *Metagenomics Server* (referencia). Inicialmente, foi realizado o controle de qualidade seguindo o fluxograma de análises do servidor, onde foram realizadas etapas de remoção de sequências replicadas artificialmente (artefatos de sequenciamento), e o valor de *Phred* de 15 foi usado como pontuação mínima para definição de uma base de alta qualidade. Sequências que não se enquadravam nestes critérios foram excluídas da análise.

## 7.6 ANÁLISE METAGENÔMICA

### 7.6.1 Leituras obtidas no sequenciamento metagenômico

Para as sequências obtidas após o sequenciamento da biblioteca randômica, a análise taxonômica foi feita utilizando o banco de dados M5NR, que consiste na integração de diversas bases de dados referenciadas. O processo de controle de qualidade do sequenciamento analisado pelo serviço do MG-RAST removeu de 55% a 60% da contagem das leituras iniciais. No Tabela 1, observa-se que o número de leituras do sequenciamento (*reads*) obtidos após o processamento e análise do

serviço do MG-RAST, foi maior nas amostras do dreno seco (911.570) e úmido (910.251) comparados com os da piscina (470.054) e do canal (449.805). A média do tamanho das leituras foi de 171 pares de bases (pb) nas quatro amostras. O percentual de GC (guaninas e citosinas) foi de 55 a 60 entre as amostras. Estes dados, contudo, não influenciaram na aquisição de informação sobre a análise taxonômica nem funcional que está comentado a seguir.

**Tabela 1: Análise Estatística do sequenciamento do DNA das amostras**

Processamento das leituras do sequenciamento		PS	CS	DS	DU
Sequências enviadas para o MG-Rast	<b>Contagem</b>	81.766.670 bp	79.454.713 bp	142.259.007 bp	164.522.032 bp
	<b>Contagem sequências</b>	470.054	449.805	911.570	910.251
	<b>Comprimento sequência</b>	173 ± 33 bp	176 ± 37 bp	156 ± 78 bp	180 ± 46 bp
Sequências após análise no MG-Rast	<b>Contagem</b>	53.598.695 bp	51.943.405 bp	81.916.705 bp	97.798.240 bp
	<b>Contagem sequências</b>	327.158	313.639	486.413	605.771
	<b>Comprimento sequência</b>	163 ± 38 bp	165 ± 41 bp	168 ± 50 bp	161 ± 50 bp
	<b>% GC</b>	55 ± 6 %	55 ± 6 %	60 ± 7 %	59 ± 9 %
Alinhamento e Anotação dos genes	<b>Categorias de RNA ribossomal</b>	218	210	953	792
	<b>Categorias funcionais identificadas</b>	49.017	47.598	150.659	189.833

Fonte: Autor (2016).

### 7.6.2 Análise Taxonômica

Foram identificadas majoritariamente 12 filos nas amostras (PS, CS, DS e DU) englobando: *Acidobacteria*; *Actinobacteria*; *Bacteroidetes*; *Clamidiae*; *Clorobi*; *Cloroflexi*; *Cianobacteria*; *Deinococcus-Thermus*; *Firmicutes*; *Planctomicetos*; *Proteobacteria*; *Verrucomicrobia*; entre organismos não classificados oriundo de bactéria. O filo mais abundante compreendeu o das Proteobacterias, nas amostras da piscina (53%), canal (53%), dreno seco (77%) e dreno úmido (83%), que está apresentado na (Figura 18) com as suas Classes mais abundantes *Alfaproteobacteria*; *Betaproteobacteria*; *Deltaproteobacteria*; *Gammaproteobacteria* nas respectivas amostras.

Estes diferentes níveis taxonômicos estão distribuídos de forma percentual conforme as amostras. Destaca-se a maior abundância na diversidade das amostras da piscina e do canal. No entanto, observa-se que a Classe das Alfabroteobacteria (Filo Proteobacteria) é a mais abundante nas amostras coletadas nos drenos seco (57%) e úmido (60%) quando comparado com sua abundância percentual nas amostras da piscina (16%) e do canal (15%). Em contraste, a Classe Gamaproteobacteria (Filo Proteobacteria) é mais abundante na piscina (18%) e no canal (18%) do que no dreno seco (10%) e úmido (6%). As Classe de Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria tiveram menos variação entre as amostras. Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes respondem respectivamente por 14%, 12% e 11% na amostra da piscina e 14%, 12% e 9% na amostra do canal. Esses filos estão presentes nas amostras tanto de dreno seco quanto úmido, porém Actinobacteria é mais abundante no dreno seco (8%) e Bacteroidetes no dreno úmido (8%). Cianobacterias, Deinococcus, Cloroflexi, Planctomicetos, Acidobacteria, Clorobi, Verrucomicrobia e Clamídia estão em menores percentuais, variando em até 2.5%.

As bactérias (%) predominantes foram as Proteobacterias, seguidas da Actinobacteria.

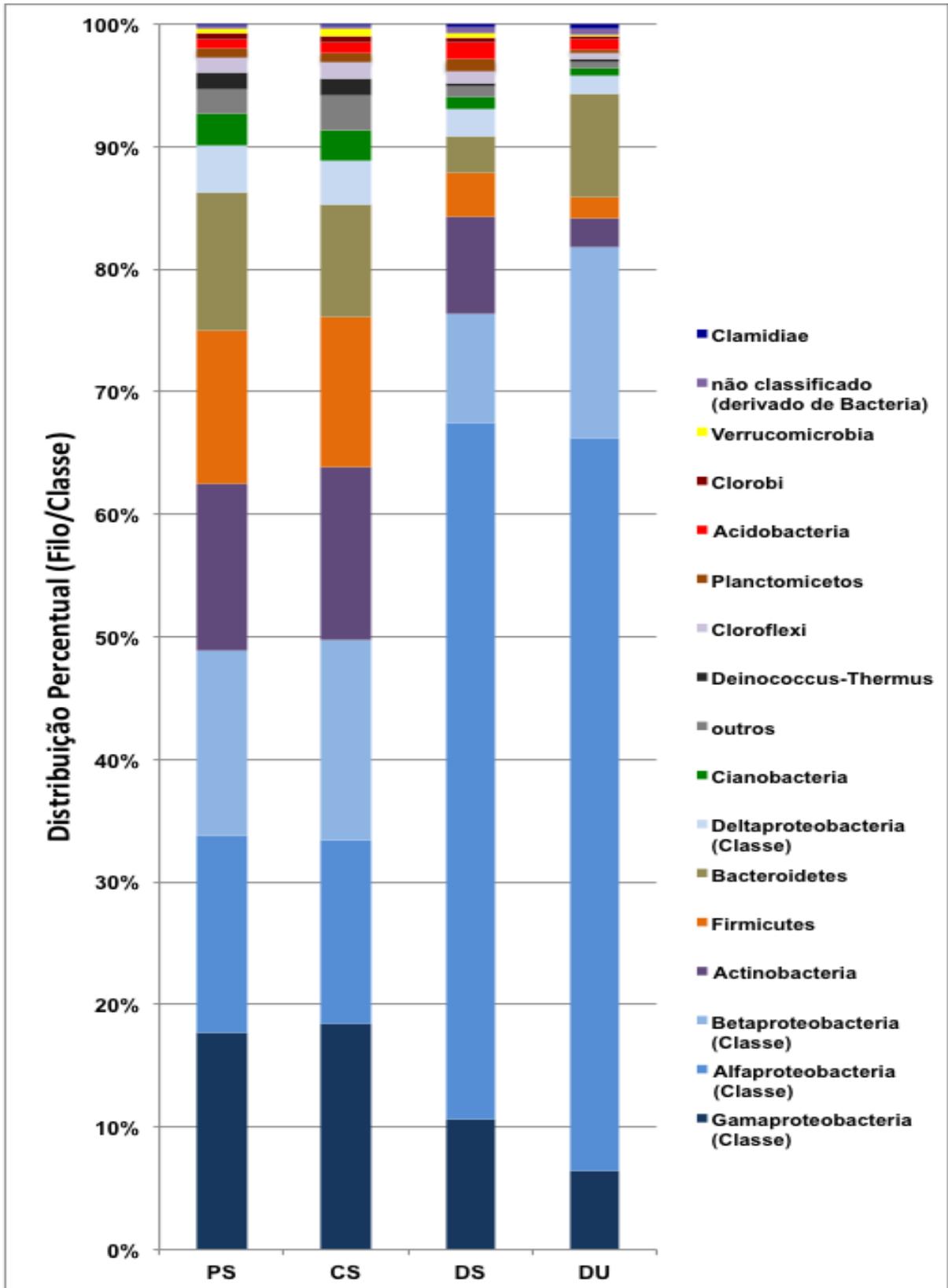


Figura 18: Distribuição da comunidade bacteriana das amostras nas diferentes amostras: PS - Piscina Submersa; CS - Canal Submerso; DS - Dreno Seco; DU - Dreno Úmido

Fonte: Autor (2016).

### 7.6.3 Análise Funcional

Com objetivo de determinar as sequencias proteicas envolvidas em funções biológicas presente nas amostras, as leituras do sequenciamento foram avaliadas quanto a sequencias codificantes de proteínas como indicado na Figura 19. As amostras PS e CS se comportaram com a mesma distribuição de funções de grupos gênicos, sendo genes envolvidos na respiração e metabolismo de proteínas os de maior número de leituras associadas a esta função. No entanto análise das amostras de dreno seco e úmido são também comparativas por si só. Porém genes de proteínas associados a agrupamentos de subsistemas foram os mais abundantes, seguido de metabolismo de carboidratos e aminoácidos e derivados. A comparação entre os grupos PS e CS com DS e DU indicam que as funções associadas a metabolismo de DNA, parede celular, transporte de membrana, virulência e defesa são mais abundantes nas amostras dos drenos.

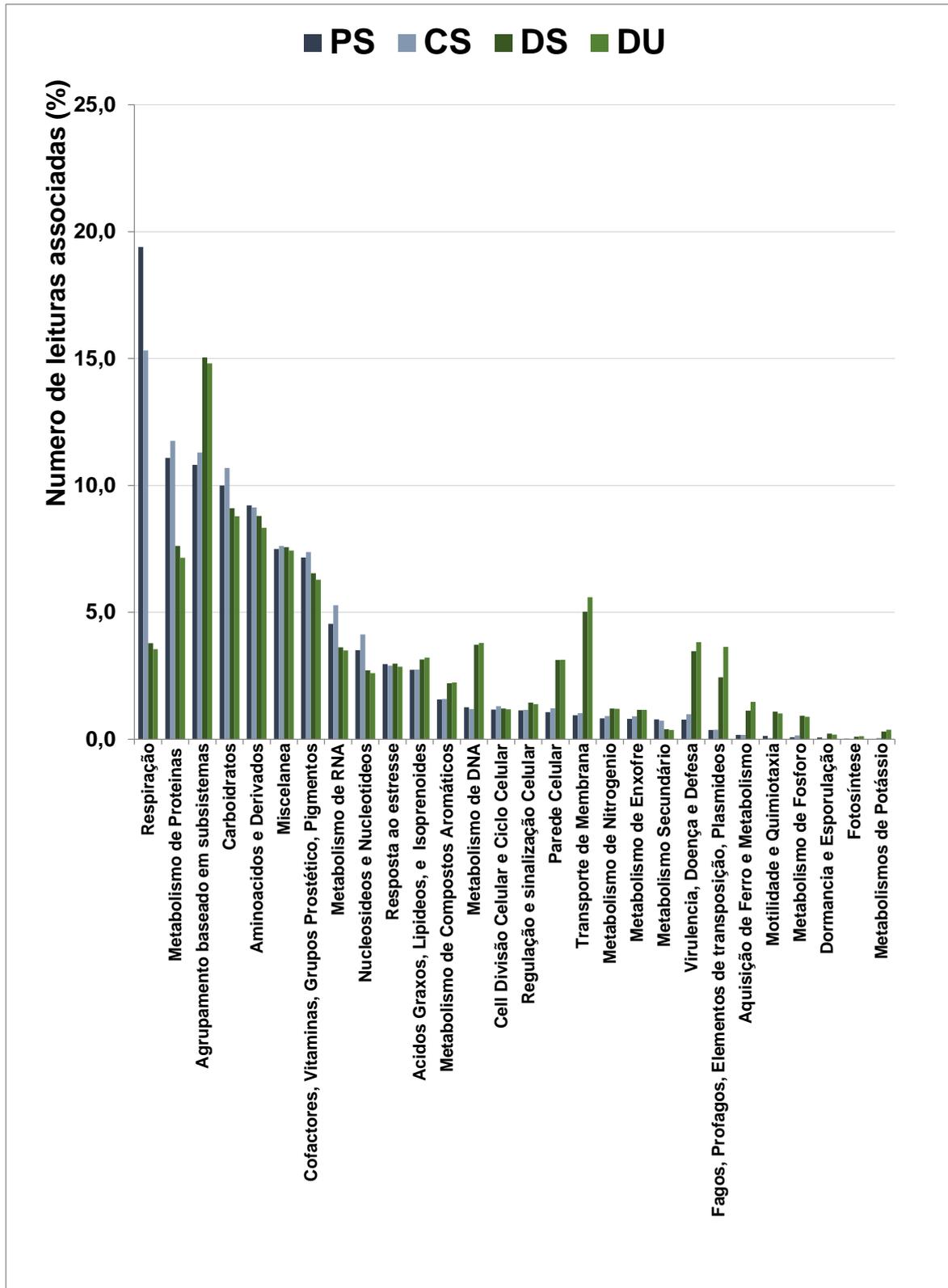
Os grupos gênicos funcionais com maior percentagem foram: Respiração, Metabolismo proteico e Agrupamento baseado em subsistemas.

#### **O significado dos três principais metabolismos:**

**Respiração e excreção:** Quanto à respiração, as bactérias podem ser aeróbias ou anaeróbias. As bactérias anaeróbias podem ser facultativas ou obrigatórias (estritas). As bactérias anaeróbias facultativas são assim chamadas porque tanto podem fazer respiração aeróbia – quando o ambiente tiver oxigênio – como respiração anaeróbia – caso falte esse gás. As anaeróbias obrigatórias não possuem as enzimas adequadas para o aproveitamento do oxigênio e morrem na presença desse gás, como é o caso do bacilo do tétano. A fermentação das bactérias é usada na indústria para a produção de iogurtes, coalhadas, queijos (*Lactobacilos*) e vinagre (*Acetobacter*), entre outros. Finalmente, as exceções são eliminadas para o exterior, por difusão, através da membrana e da parede celular.

**Agrupamento baseados em subsistemas:** é aquele em que não há acoplamento funcional, evidências de que genes pertencem um ao outro, mas que ainda não sabem o que fazem (NMPDR, s.d. Disponível em: <<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/ClusteringBasedSubsystem>>. Acesso em: Junho de 2016).

**Metabolismo proteico:** Todas as bactérias patogênicas são heterotróficas, elas obtêm energia através da oxidação de moléculas orgânicas e o metabolismo destas moléculas (carboidratos, lipídeos e proteínas) fornece a energia (adenosina trifosfato - ATP) necessária para as bactérias desenvolverem suas funções vitais. O metabolismo pode ser aeróbio, em que o aceptor final de elétrons é o oxigênio, ou anaeróbio, em que o aceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica. As bactérias aeróbias produzem 38 moléculas de ATP a partir de uma molécula de glicose. Enquanto que as bactérias anaeróbias produzem apenas 2 moléculas de ATP. O metabolismo anaeróbio, apesar de ser menos eficiente que o metabolismo aeróbio, é realizado em condições onde os substratos estão mais facilmente disponíveis. A exigência pela presença do oxigênio durante o metabolismo pode ser obrigatória ou facultativa, sendo assim alguns organismos conseguem alternar entre a respiração aeróbia e anaeróbia.



**Figura 19: Análise funcional: Distribuição percentual de número de sequencias associadas a funções biológicas. Nas diferentes amostras: PS - Piscina Submersa; CS - Canal Submerso; DS - Dreno Seco; DU - Dreno Úmido**

Fonte: Autor (2016).

## 7.7 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE E MONITORAÇÃO DOS DRENOS

### 7.7.1 Bactérias em áreas com radioatividade e contaminação em Angra 1 e no mundo

Dentre os inúmeros artigos publicados sobre os acidentes das Usinas Nucleares de Chernobyl em 1986 e Fukushima em 2011, apenas três deles, referentes a Chernobyl, continham informações sobre bactérias (RUIZ-GONZÁLEZ *et. al.*, 2016; MØLLER; MOUSSEAU, 2013 e RAGON *et. al.* 2014). O acidente de Chernobyl tem sido considerado um experimento de longo prazo sobre os efeitos da exposição à radiação ionizante ao nível de ecossistema. Apesar de estudos desses efeitos sobre as plantas e animais serem abundantes, o estudo de como os níveis de radiação de Chernobyl afetam comunidades microbianas procaríotas e eucaríotas é praticamente inexistente, exceto para alguns relatórios sobre agentes patogênicos humanos ou microrganismos do solo (RAGON *et. al.* 2014). Os autores encontraram uma correlação positiva entre o aumento da exposição à radiação e o aumento das taxas de mutação em Actinobacteria encontradas em amostras de Chernobyl e Irlanda do Norte.

O estudo de RUIZ-GONZÁLEZ *et. al.*, 2016 isolou 87 morfotipos bacterianos: 18 a partir em uma área com radiação de fundo elevado (2,9  $\mu\text{Gy/h}$ ), 25 de radiação de fundo intermediário (0,45  $\mu\text{Gy/h}$ ), 20 anos de uma radiação de fundo baixa (0,1  $\mu\text{Gy/h}$ ) e 24 de uma área controle (radiação de fundo ambiental - 0,03 - 0,05  $\mu\text{Gy/h}$ ). O estudo determinou que as bactérias pertenciam principalmente ao grupo de Bacillus-Firmicutes (41 morfotipos) e Actinobacteria (27), com menor frequência Gamaproteobacteria (3), Flavobacteria (2) e Betaproteobacteria (1). A menor riqueza de espécies foi encontrada em regiões de radiação de fundo elevado.

Considerando que todas as bactérias das amostras da piscina coletadas em Angra 1 foram identificadas nas amostras de drenos úmidos (drenos 10, 11, 13, 14 e 17) pode-se assumir que os filos de bactéria identificadas percorreram os 12 metros de coluna d'água da piscina (APÊNDICE 1). Dessa forma, pode se sugerir que todas elas são resistentes a alta radiação já que sobreviveram a exposição a 894 elementos combustíveis irradiados estocados com alta atividade (416000  $\mu\text{Sv/h}$  = 0,416 Gy/h), localizados na PCU.

Dentre os 12 filos (excetuando as bactérias Clamidiae, Clorobi, Cloroflexi e Firmicutes), apenas 8 filos foram encontrados nas áreas pós acidente de Chernobyl por (RAGON *et. al.* 2014).

A Actinobacteria, identificada em Angra 1, também foi identificada nas áreas pós acidente de Chernobyl, (RUIZ-GONZÁLEZ *et. al.*, 2016), porém resistindo a uma exposição bem superior de 4000 Gy/h e nas Usinas Nucleares de Cofrentes em Valencia na Espanha (SARRO *et. al.*, 2005 e CHICOTE *et. al.*, 2004), e Pickering no Canadá, (IAEA, 1997) nestas não tendo sido mencionado valores de exposição à radiação pela bactéria. As Cianobacterias também foram observadas em áreas pós acidente de Chernobyl (RAGON *et. al.* 2014), resistindo a uma exposição de 0,000025Gy/h, bem inferior a Angra 1, entretanto essa bactéria resistiu a uma exposição de 4000 Gy/h (BILLI *et. al.*, 2000). Já a bactéria Deinococcus-Thermus identificada em Angra 1 e em Chernobyl (RAGON *et. al.* 2014), resistiu a uma exposição de 30000 Gy/h (RAINEY *et. al.*, 2005).

RUIZ-GONZÁLEZ *et. al.*, 2016 menciona que a bactéria Flavobacteria, Firmicutes (Bacillus) e Proteobacteria foram identificadas nas áreas pós acidente de Chernobyl resistindo a uma exposição de 4000 Gy/h.

No estudo de SARRO *et. al.*, 2005 foram identificadas 57 bactérias pertencentes aos grupos das *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteridae* (bactéria gram-positiva) revelando que os biofilmes foram capazes de fixar radionuclídeos, especialmente Cobalto 60. Este fato se justifica, provavelmente, pela contaminação fixa (não transferível) de radionuclídeos aderentes aos corpos de provas de placas em aço inoxidável austenítico e titânio (99,9), depois de 34 meses imersas, que ocorre após a remoção da piscina e secagem da água. O que não ocorre no “*liner*”, uma vez que apesar dos biofilmes conterem radionuclídeos a radiação se torna baixa, tendo em vista que uma das funções da água da piscina é justamente proteger contra a radiação.

O presente estudo as amostras (SWAB) não apresentaram níveis significativos de radionuclídeos, razão pela qual atenderam todos os critérios previstos a remoção e liberação do transporte de Angra 1 para o IBCCF. 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.

A área no entorno da superfície da PCU e do CTC são consideradas área nível de baixo de radiação, praticamente zero, uma vez que o projeto da PCU com profundidade de aproximadamente de 12 metros de coluna d'água elimina a possibilidade de radiação na borda da piscina, apenas são tomados todos os cuidados preventivos relativos a contaminação, em caso de contato com a água da piscina, utilizando as devidas vestimentas em acordo com a Licença de Trabalho Radiológico, além do controle na exclusão de material estranho ao trabalho, de forma a garantir que todo o material e ferramental utilizado durante qualquer tarefa, seja devidamente inventariado e não seja indevidamente extraviado correndo o risco de queda e danos irreparáveis aos sistemas e ao combustível.

A demonstração a exposição à radiação dos microrganismos em Angra 1 e usinas no mundo foi sintetizada no Quadro 6.

**Quadro 6: Bactérias em áreas com radioatividade e contaminação em Angra 1 e no mundo**

Angra 1	Chernobyl (Ragon et. al., 2014)	Chernobyl (Ruiz-González et. al, 2016)	Cofrentes, Espanha (Sarro et. al., 2005)	Cofrentes, Espanha (Chicote et. al, 2004)	Pickering, Canadá, (IAEA, 1997)	Chernobyl (Møller & Mousseau, 2013)	Jaslovské Bohunice, Eslováquia (IAEA, 1997)
atividade 0,416 Gy/h	0.000025 Gy/h	4000 Gy/h	Não mencionado	Não mencionado	Não mencionado	Não mencionado	Não mencionado
Acidobacteria	X						
Actinobacteria	X	X	X	X	X	Kineococcus	
Alfaproteobacteria	X					Methylobacterium; Rubrobacter	
Bacteroidetes	X	Flavobacteria					
Betaproteobacteria	X			X			
Clamídiae							
Clorobi							
Cloroflexi							
Cianobacteria	X					Chroococciopsis	
Deinococcus-Thermus	X						
Deltaproteobacteria	X						
Firmicutes		Bacillus	X	Staphylococcus		Paenibacillus amyloliticus; Bacillus subtilis	
Gammaproteobacteria	X					Acinetobacter radioresistens; Azotobacter; Escherichia coli	
Planctomycetos	X						
Verrucomicrobia	X						
bactérias indeterminadas	X						
Achromobacter xylooxidans		Proteobacteria	57 bactérias: actinobacteridae e proteobactérias				
outros grupos				Trichocomaceae	polissacarídeos	Desulfurococcus; Locurio rôsea; Radiotolerans; Thermococcus	masofílicos; micromycetes; Psychrofilicos

Fonte: Autor (2016).

### 7.7.2 Resistência a Radiação Ionizante

A Resistência a Radiação Ionizante do Quadro 7 indica que as bactérias têm extrema resistência quando exposta a alta radiação. No caso do ser humano a resistência é bastante limitada e tratada de forma que não afete sua saúde.

Exemplos:

- 1- Exposição ocupacional dentro do CTC, por um mergulhador, exposto em 2:20 h = durante a manutenção do subaquática do sistema de transferência de combustível de Angra 1, foi de 0,00049 Gy, a dose ocupacional permitida/dia seria de 0,001 Gy. (ALMEIDA, 2002).
- 2- Exposição ocupacional após 23 anos de trabalho em Angra 1 foi de 0,01435 Gy a dose ocupacional permitida/23 anos seria de 0,46 Gy. (APÊNDICE 2).

As taxas de doses e consequências a exposição à radiação ionizante são dados se suma importância, que devem ser analisados e foram parâmetros vistos neste trabalho. Neste caso no Quadro 7, temos os valores e as comparações da resistência a exposição em bactérias e no ser humano.

**Quadro 7: Resistência a Radiação Ionizante**

Resistência a Radiação Ionizante	Dose Gy/h	Observação
Exposição Ocupacional Usina Nuclear de Angra dos Reis	0,02	Empregado/ano (Eletronuclear, 2016)
Exposição Ocupacional Usinas no Mundo	0,05	Empregado/ano (Eletronuclear, 2016)
Exposição Ocupacional Usina Nuclear de Angra 1	0,014	Empregado/23 anos
Mortal durante exposição	1000	
Morte em horas a 48 h	50 a 100	Ser humano (Leitão, A. C., 2016)
Morte de 5 a 10 dias	6 a 50	
Morte de 10 a 30 dias	2 a 6	
Deinococcus-Thermus (Rainey et. al., 2005)	30000	Bactéria
Cianobactéria (Billi et. al., 2000)	4000	Bactéria
<i>Acidobacteria</i>		Bactérias na PCU – Racks Supercompactos de Angra 1, 894 elementos combustíveis irradiados.
<i>Actinobacteria</i>		
<i>Alfaproteobacteria</i>		
<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Betaproteobacteria</i>		
<i>Clamidiae</i>		
<i>Clorobi</i>		
<i>Cloroflexi</i>	0,416	
<i>Cianobacteria</i>		
<i>Deinococcus-Thermus</i>		
<i>Deltaproteobacteria</i>		
<i>Firmicutes</i>		
<i>Gammaproteobacteria</i>		
<i>Planctomicetos</i>		
<i>Verrucomicrobia</i>		

Fonte: Autor (2016).

### 7.7.3 Monitoração dos Drenos

A monitoração dos 19 drenos de Angra 1, aponta para valores extremamente baixos de acúmulo de água, ou seja, 2,5 L/dia em 1.627.550 L (Volume total do CTC e da PCU), se compararmos com os valores das Usinas da Suécia e Hungria (Quadro 8).

**Quadro 8: Monitoração da água acumulada nos Drenos de Usinas.**

<b>Monitoração dos Drenos</b>			
<b>País</b>	<b>Usina Nuclear</b>	<b>L/h</b>	<b>Observação</b>
<b>Brasil</b>	<b>Angra 1</b>	<b>0,10</b>	<b>2014</b>
Suécia	-	0,21 – 0,42	(IAEA, 1997)
Hungria - 1992	Unidade 1	20 a 600	
	Unidade 2	7 a 8	
	Unidade 3	-	
	Unidade 4	-	

Fonte: Autor (2016).

Esses dados indicam que apesar da presença das bactérias, essas aparentemente não comprometem o revestimento da área, uma vez que o vazamento observado é mínimo.

## 8 CONCLUSÃO

- Identificamos um total de 12 filos crescendo no “*liner*” do CTC, da PCU e nos drenos do ECB de Angra 1 entre organismos não classificados.
- 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 0,416 Gy/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 as espécies identificadas ofereçam esse tipo de risco. Esse fato é corroborado pelo baixo acúmulo de água nos drenos e a inexistência visual de corrosão da superfície dos “*liners*”.
- 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.
- O método de Sequenciamento Randômico (*shotgun*) e a utilização do Sequenciador *Ion Torrent* PGM, apesar serem caros, apresentam um resultado rápido e confiável para a identificação dos microrganismos.
- 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.

## 9 RECOMENDAÇÃO

- Estabelecer um prazo preventivo, para uma análise microbiológica da água da PCU, CTC e dos drenos do ECB, conseqüentemente uma reavaliação do inventário.

## REFERÊNCIAS

- AIEA/PRIS - Power Reactor Information System e World Nuclear Association, 2016.
- 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.
- 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.
- BILLI, D., FRIEDMANN, E.I.; HOFER, K.G.; CAIOLA, M.G.; OCAMPO-FRIEDMAN, R. Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p.1489-1492, 2000.
- 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.
- CDC, 2008. *Emerging Infectious Diseases*. 2008. Vol. 14, No. 7. Disponível em <http://www.cdc.gov/eid>. Acesso: 27 de junho de 2016.
- 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.
- ELETRONUCLEAR, 2016. ANGRA 1. Disponível em; <<http://www.eletronuclear.gov.br/AEmpresa/CentralNuclear/Angra1.aspx>>. Acesso em 14 jan. 2016.
- ELETRONUCLEAR. Curso de formação de operadores licenciáveis UNA 1 Sistema de purificação e limpeza da piscina de combustível usado – PCU. Sistema de purificação da água de recarregamento are. Rev. Eletronuclear. Material mimeografado. 4 Nov/2014.

MIELNIK, O. O Futuro Energético e a Geração Nuclear. FGV Projetos, Coleção FGV Projetos, n.19. p. 96, 2013.

FUERST, J.A, SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*, n. 9, p. 403-413, jun/ 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v9/n6/full/nrmicro2578.html>>. Acesso em: Junho de 2016.

GLENN, T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour.* v.11, p.759-769, 2011.

GOYA, R.; IRMTRAUD, M. M.; MARRA, M. A. Applications of High-Throughput Sequencing *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*, © Springer Science+Business Media, LLC, v. Chapter 3, p. 27-53, 2012.

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.

IPCA, (Nov/2012) Nº 001 – 15º Leilão de Energia Nova (A-5) – 14 de dezembro de 2012. Disponível em: <[www.ccee.org.br/ccee/documentos/CCEE\\_069322](http://www.ccee.org.br/ccee/documentos/CCEE_069322)>, Acesso em: Agosto de 2016.

LEITÃO, A. C. Efeitos somáticos das radiações ionizantes. Capítulo IX: Radiobiologia e Fotobiologia. 2016.

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.

SALIPANTE, S.J.; PRITCHARD, C.C.; , KOEHLER, K.; *et al.* Validation and implementation of targeted capture and sequencing for the detection of actionable mutation, copy number variation, and gene rearrangement in clinical cancer specimens. *J Mol Diagn*, v.16, p.56-67, 2014.

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.

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.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, v. 475, n. 7356, p. 348-352. 2011.

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.

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.

STACKEBRANDT E; RAINEY F. A., AND WARD-RAINEY N. L. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Apr. 1997, p. 479-491

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.

## APÊNDICE

### APÊNDICE 1: BACTÉRIAS IDENTIFICADAS EM ANGRA 1

<b>Bactérias</b>	<b>PS</b>	<b>CS</b>	<b>DS</b>	<b>DU</b>
<i>Alphaproteobacteria</i>	653	589	227681	307316
<i>Betaproteobacteria</i>	612	643	35590	79877
<i>Gammaproteobacteria</i>	718	726	42406	32985
<i>Bacteroidetes</i>	456	363	11837	43698
<i>Actinobacteria</i>	557	559	31443	11916
<i>Firmicutes</i>	506	478	14680	8816
<i>Deltaproteobacteria</i>	159	142	8830	7278
<i>Acidobacteria</i>	31	36	5908	4046
<i>Cyanobacteria</i>	102	97	3919	3001
<i>Chloroflexi</i>	48	54	3785	2336
<i>Planctomycetes</i>	32	29	3701	1635
<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>	10	9	1956	2105
<i>Chlamydiae</i>	6	5	977	2056
<i>Chlorobi</i>	16	17	1262	1380
<i>Verrucomicrobia</i>	16	27	1529	992
<i>Deinococcus-Thermus</i>	56	54	1373	1058
<i>Outras</i>	83	110	3392	3085

## APÊNDICE 2: RELATÓRIO DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

### Relatório de Exposição Ocupacional Doses em mSv

Nome: DARCY MUNIZ DE ALMEIDA

Período de Exposição	Dose	Tipo de Dose	Tipos de Dosímetros
01/11/92 até 31/12/92	3,60	DET	F
01/01/93 até 31/12/93	3,60	DET	F
01/01/94 até 31/12/94	0,00	DET	F
01/01/95 até 31/12/95	0,70	DET	F
01/01/96 até 31/12/96	1,15	DET	F
01/01/97 até 31/12/97	0,60	DET	F
01/01/98 até 31/12/98	1,40	DET	F
01/01/99 até 31/12/99	0,00	DET	F
01/01/00 até 31/12/00	0,20	DET	F
01/01/01 até 31/12/01	0,60	DET	F
01/01/02 até 31/12/02	1,10	DET	F
01/01/03 até 31/12/03	0,90	DET	F
01/01/04 até 31/12/04	0,20	DET	F
01/01/05 até 31/12/05	0,40	DET	F
01/01/06 até 31/12/06	0,50	DET	F
01/01/07 até 31/12/07	0,00	DET	F
01/01/08 até 31/12/08	0,00	DET	F
01/01/09 até 31/12/09	0,00	DET	F, DTL
01/01/10 até 31/12/10	0,00	DET	DTL
01/01/11 até 31/12/11	0,00	DET	DTL
01/01/12 até 31/12/12	0,00	DET	DTL
01/01/13 até 31/12/13	0,00	DET	DTL
01/01/14 até 31/08/14	0,00	DET	DTL
01/01/15 até 10/12/15	0,00	DET	DTL

Início de monitoração: 11/1992

#### Tipos de Doses:

DET: Dose Efetiva Total

EDME: Equivalente de Dose Máxima na Extremidade

EDS: Equivalente de Dose Superficial

#### Tipos de Dosímetros:

DTL: Dosímetro Termoluminescente

DLD: Dosímetro do Tipo Leitura Direta (secundário)

F: Filme Dosimétrico

AD: Anel Dosimétrico

Este relatório apresenta as doses recebidas durante a designação de trabalho do usuário na Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto.