

Coordenação de Pós-Graduação
Instituto de Radioproteção e Dosimetria
Comissão Nacional de Energia Nuclear

**Toxicidade do tório (IV) para
microalgas verdes dos gêneros
Monoraphidium e *Scenedesmus***

Juliana Cristina de Queiroz
Orientador: Dr^a Ana Cristina de Melo Ferreira
Co-orientador: Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Juliana Cristina de Queiroz

**Toxicidade do tório (IV) para microalgas verdes dos gêneros
Monoraphidium e *Scenedesmus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
pelo Programa de Pós-Graduação em
Radioproteção e Dosimetria do Instituto de
Radioproteção e Dosimetria da Comissão
Nacional de Energia Nuclear na área de
Radioecologia.

Orientadora: Dra. Ana Cristina de Melo
Ferreira

IRD/CNEN
Co-Orientador: Dr. Antônio Carlos A. Costa

UERJ

Rio de Janeiro – Brasil

Instituto de Radioproteção e Dosimetria – Comissão Nacional de Energia Nuclear

Coordenação de Pós-Graduação

2009

Queiroz, Juliana Cristina de

Toxicidade do tório (IV) para microalgas verdes dos gêneros *Monoraphidium* e *Scenedesmus* / Juliana Cristina de Queiroz. – Rio de Janeiro: IRD, 2009.

xv, 80 f. : il., tab., gráf. ; 29cm.

Orientador: Ana Cristina de Melo Ferreira

Orientador: Antônio Carlos Augusto da Costa

Dissertação (mestrado) – Instituto de Radioproteção e Dosimetria.

Referências bibliográficas: f. 62-64

1. Microalgas. 2. Tório. 3. Toxicidade. I. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. II. Título.

Juliana Cristina de Queiroz

**Toxicidade do tório (IV) para microalgas verdes dos gêneros *Monoraphidium* e
*Scenedesmus***

Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2009.

Dra. Ana Cristina de Melo Ferreira – IRD/CNEN

Dr. Luiz Tauhata – IRD/CNEN - FAPERJ

Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo – UFRJ

Dr. Luiz Fernando de Carvalho Conti – IRD/CNEN

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Melo Ferreira e co-orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa, com auxílios concedidos pela CNEN.

Aos meus pais, Expedito e Edna, por todo o apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteou com a vida.

À Prof. Dr^a. Ana Cristina, pela confiança, por toda ajuda e amizade, e por ter dado todas as condições para que este trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Antônio Costa, por todos os ensinamentos necessários para a realização do trabalho e pela disponibilização do laboratório.

À Heliane, por me acolher em sua sala e proporcionar sorrisos todos os dias. Pra ela, a beleza da vida está acima de tudo.

Ao grande amigo Tadeu, por todos os momentos de descontração, cultura geral e fotografia, além de muito me ajudar com assuntos de informática.

À equipe do Serviço de Análises Ambientais, com quem convivi por todo este período: Beth, Carlos Henrique, Cláudio, Elder, Fernando, Isabel, Ivan, José Marcus, Josué, Luca, Luis Cláudio, Malú, Márcia, Ricardo Lobo, Virgínia, Zenildo e as bolsistas Antônia, Franciane e Taisa.

Aos professores da pós-graduação do IRD, por todo o conhecimento e por estarem sempre acessíveis para qualquer dúvida ou problema. Aos queridos amigos do mestrado, com quem dividi momentos de dúvidas e alegrias.

A todos os funcionários do IRD que, de alguma forma, deixaram suas marcas neste período e ajudaram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos do Instituto de Química da UERJ, Márcia Machado, Márcia Carrera, Gustavo, Dâmaris e Caroline, que muito contribuíram com muitos ensinamentos e também muita descontração.

Ao Laboratório de Toxicologia de Cianobactérias da UFRJ, por disponibilizar as cepas necessárias para os experimentos.

À Nilda Brittes e sua família, que me mostrou o caminho para que tudo isto fosse possível, no momento em que tudo parecia mais difícil.

Ao Darwin, por todo o amor e carinho que tem por mim, e que, com seu companheirismo, musicalidade e bom humor, tornou esta trajetória mais leve.

A Nádia e Jorge por serem meu porto seguro no Rio de Janeiro.

A Darck e Carla, por me darem de presente a Clara, minha primeira sobrinha. A Duani e Mariana, pelos deliciosos encontros ao som de muita música boa.

À minha família que está distante e faz com que, em todos os encontros, eu esqueça todo o mundo ao meu redor.

À CNEN pela bolsa concedida.

RESUMO

Avaliou-se a toxicidade de tório nas espécies de microalgas verdes *Monoraphidium sp.* e *Scenedesmus sp.* As microalgas foram inoculadas em meio ASM-1 com e sem presença de tório (meio em pH 8,0 e 6,0 isentos de tório – controle – e meio em pH 6,0 com concentrações de 0,5 a 100,0 mg/L Th). Seu efeito foi monitorado por contagem direta em câmara de Fuchs-Rosenthal e por *software* desenvolvido pelo grupo durante o experimento. A diferença entre os valores de pH não influenciou o crescimento das microalgas, sendo o pH 6,0 o escolhido por não comprometer a solubilidade do tório. A toxicidade do metal foi observada apenas nas concentrações acima de 50,0 mg/L. A cultura de *Monoraphidium sp.* contendo $6,25 \times 10^5$ microrganismos/mL iniciais atingiu $5,52 \times 10^7$ microrganismos/mL no meio com 10,0 mg/L Th, contra $8,57 \times 10^6$ microrganismos/mL no meio com 100,0 mg/L Th. O controle chegou a $2,51 \times 10^7$ microrganismos/mL ao final do experimento. A espécie *Scenedesmus sp.* se mostrou mais resistente à presença do tório. Baixas concentrações do radionuclídeo favoreceram o crescimento das microalgas. A cultura inicial, com $7,65 \times 10^5$ microrganismos/mL chegou a $2,25 \times 10^6$ microrganismos/mL no controle e a $5,87 \times 10^6$ microrganismos/mL no meio com 0,5 mg/L Th ao final do experimento. O *software* desenvolvido foi muito eficaz na melhoria da exatidão dos resultados e diminuição da incerteza de contagem, além de permitir o registro das medições. Os resultados permitem sugerir que baixas concentrações de tório têm efeito positivo no fitoplâncton, propondo o emprego destas espécies para estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: biorremediação, microalgas, *Monoraphidium*, *Scenedesmus*, toxicidade, Tório

ABSTRACT

The toxicity of thorium by two green microalgae species, *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp was studied. During the toxicity tests, the microalgal cultures were inoculated in ASM-1 culture medium in the presence and absence of thorium (cultures at pH 8.0 and 6.0 in the absence of thorium – control – and at pH 6.0 for thorium concentrations ranging from 0.5 to 100.0 mg/L Th). Its effect was monitored by direct counting on Fuchs-Rosenthal chamber and with the help of *software* developed by the group during the experiments. The difference in pH value in the culture medium didn't affect the growth of the microalgae, and pH 6.0 was chosen as a reference in order not to compromise solubility and speciation of thorium in solution. The toxicity of the metal over the species was observed just for thorium concentrations over 50.0 mg/L. A *Monoraphidium* sp. culture containing 6.25×10^5 microorganisms/mL reached a final concentration of 5.52×10^7 microorganisms/mL in the presence of thorium in the concentration of 10.0 mg/L. If we consider the 100.0 ppm thorium solution reached a final concentration of 8.57×10^6 microorganisms/mL. Control tests indicated a final concentration of 2.51×10^7 microorganisms/mL at the end of the growth. *Scenedesmus* sp. cells proved to be more resistant to the presence of thorium in solution. Low concentrations of the radionuclide favored the growth of these microalgae. A culture containing 7.65×10^5 microorganisms/mL reached a final concentration of 2.25×10^6 microorganisms/mL, in the absence of thorium in the medium. Toxicological tests indicated a final culture concentration of 5.87×10^6 microorganisms/mL in the presence of 0.5 mg/L thorium. The *software* used for comparison of direct count method proved to be very useful for the improvement of accuracy of the results obtained and a decrease in the uncertainty in counting. Beyond these advantages it also allowed recording of the data. From the present results one can conclude that the presence of thorium in the medium suggests that low thorium concentrations have a positive effect on this type of phytoplankton, indicating its potential for ecotoxicological studies.

Key-words: bioremediation, microalgae, *Monoraphidium*, *Scenedesmus*, toxicity, Thorium

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Fundamentos Teóricos	04
2.1 Biorremediação	04
2.2 Tório	06
2.3 Algas	09
2.3.1 Microalgas	13
2.4 Quantificação de microalgas	15
2.4.1 Método eletrônico de quantificação	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Microalgas	20
3.2 Condições de cultivo dos microrganismos	21
3.2.1 Meio de cultura utilizado	21
3.2.2 Preparo da cultura inicial	22
3.3 Ensaio de toxicidade	23
3.4 Método de contagem por microscopia	25
3.4.1 Câmara de Fuchs-Rosenthal	26
3.4.2 Aquisição de imagens	29

3.5 Desenvolvimento de software de contagem	30
3.5.1 Comprovação da eficiência do software	34
4. Resultados e Discussão	36
4.1 Estudo do efeito do pH no crescimento das microalgas.	36
4.2 Estudos de toxicidade do Tório sobre a espécie <i>Monoraphidium sp.</i>	41
4.2.1 Culturas contaminadas com Tório nas concentrações de 0 a 10 mg/L	41
4.2.2 Culturas contaminadas com Tório nas concentrações de 10 a 100 mg/L	43
4.3 Estudos de toxicidade do Tório sobre a espécie <i>Scenedesmus sp.</i>	46
4.3.1 Culturas contaminadas com Tório nas concentrações de 0 a 10 mg/L	46
4.3.2 Culturas contaminadas com Tório nas concentrações de 10 a 100 mg/L	49
4.4 Estudo comparativo sobre metodologias de contagem direta e com uso de software	51
4.4.1 Estudo da repetitividade de contagens quando se utiliza o software	53
4.5 Galeria de imagens	55
4.5.1 <i>Monoraphidium sp.</i>	55
4.5.2 <i>Scenedesmus sp.</i>	58
5. Conclusão	61
6. Bibliografia	63

LISTA DE FIGURAS

1. Série radioativa do ^{232}Th (Tauhata, 2006)	08
2. Microscópio Axioskop 40 do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos da UERJ	25
3. Câmara de Fuchs-Rosenthal	26
4. Divisões da Câmara de Fuchs-Rosenthal	27
5. Orientação da contagem dos microrganismos na câmara de Fuchs-Rosenthal	28
6. Diagrama de orientação para aquisição de imagens pelo microscópio Axioskop 40	29
7. Foto de <i>Monoraphidium</i> sp. tirada com microscópio Axioskop 40 e Aumento de 20x ocular	30
8. Software para contagem de culturas – desenvolvido por Dr. Luis Fernando de Carvalho Conti	30
9. Software para contagem de culturas – janela de seleção de imagens	31
10. Representação da imagem de microalga <i>Monoraphidium</i> sp. durante contagem através do software	32
11. Efeito do pH no crescimento da microalga <i>Monoraphidium</i> sp.	36
12. Efeito do pH no crescimento da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	37
13. Aproximação linear do crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, em ausência do elemento Tório	38
14. Aproximação linear do crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 8,0, em ausência do elemento Tório	39
15. Crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após	

contaminação do meio com ^{232}Th	41
16. Crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software)	42
17. Crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th	44
18. Crescimento de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software)	45
19. Crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th	46
20. Crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software)	48
21. Crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th	49
22. Crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 após contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software)	50
23. Comparação entre contagem direta e por software para cultura de <i>Monoraphidium</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, contaminado com 1,0 mg/L de ^{232}Th	52
24. Comparação entre contagem direta e por software para cultura de <i>Scenedesmus</i> sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 e sem contaminação de ^{232}Th	53
25. Repetitividade de contagens de <i>Monoraphidium</i> sp. através de software	54
26. Repetitividade de contagens de <i>Scenedesmus</i> sp. através de software	55
27. <i>Monoraphidium</i> sp. em meio sem contaminante e pH 8,0 – 2º dia de experimento	56

28. <i>Monoraphidium</i> sp. em meio contaminado com 0,5 mg/L Th e pH 6,0	
2º dia de experimento	56
29. <i>Monoraphidium</i> sp. em meio contaminado com 10,0 mg/L Th e pH 6,0	
6º dia de experimento	57
30. <i>Scenedesmus</i> sp. em meio sem contaminante e pH 6,0 – 1º dia de experimento	58
31. <i>Scenedesmus</i> sp. em meio sem contaminante e pH 6,0 – 23º dia de experimento	59
32. <i>Scenedesmus</i> sp. em meio contaminado com 0,5 mg/L Th e pH 6,0	
7º dia de experimento	60

1. INTRODUÇÃO

Elementos radioativos naturais, como urânio, tório e seus descendentes, são encontrados em praticamente todos os locais da crosta terrestre. Entretanto, rejeitos industriais e outras atividades antrópicas têm alterado o ciclo natural destes radionuclídeos e, conseqüentemente, ocasionado um aumento substancial da dispersão dos mesmos no meio ambiente (Marques, Dos Santos *et al.*, 2004).

A bioacumulação de substâncias tóxicas por microrganismos diminui sua concentração no ambiente, tornando-as menos disponíveis para outros organismos, implicando em maior resistência ao impacto tóxico. Os efeitos causados por altas concentrações destes rejeitos à comunidade microbiana podem implicar no comprometimento de toda a cadeia trófica. Como produtoras primárias da cadeia alimentar, as microalgas são as primeiras espécies a serem afetadas e, portanto, podem ser consideradas sinalizadoras do ambiente aquático (Satoh, Vudikaria *et al.*, 2005). O uso de microalgas como biomarcadores pode ser visto como instrumento eficiente de prevenção, desde que alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais ainda não sejam observáveis em níveis orgânicos.

A biorremediação vem sendo considerada uma tecnologia efetiva de tratamento para remoção de contaminantes, embora algas já tenham mostrado seu grande potencial de “limpar” sistemas aquáticos (Rollemberg, 2004). Desde então, o comportamento de muitas microalgas em relação aos processos de biosorção tem sido estudado.

Sar, Kazy *et al.* (2004) estudaram a capacidade de absorção de urânio (VI) e tório (IV) por *Pseudomonas* isoladas de solo para remediação de rejeitos nucleares. A

remoção de tório (IV) foi estudada também por Picardo *et al.* (2009), utilizando a macroalga *Sargassum filipendula* como agente bioacumulador.

Embora a toxicidade e a bioacumulação de muitos metais por microrganismos tenham sido amplamente estudados, existe pouca informação sobre o mecanismo de bioacumulação de elementos radioativos, particularmente do tório.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a influência do tório no crescimento de microalgas verdes dos gêneros *Monoraphidium* e *Scenedesmus*. Os objetivos específicos incluem:

- Estudar as condições ideais de pH no crescimento das microalgas que também permitam a predominância em solução na sua forma iônica.
- Avaliar o efeito de concentrações crescentes de tório para as microalgas.
- Utilizar o *software* desenvolvido pelo Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD) para contagem de microrganismos, a fim de minimizar as incertezas encontradas nas formas tradicionais de contagem.

A apresentação desta dissertação inclui, ainda, mais quatro capítulos.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica, onde são abordados temas como características relevantes das microalgas verdes, do radionuclídeo tório e dos métodos clássicos de quantificação.

O Capítulo 3 apresenta a metodologia adotada no estudo, bem como os estudos de toxicidade, observação microscópica e estudos comparativos com o *software* desenvolvido pelo IRD.

No Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos, juntamente com as discussões sobre influência do tório sobre as espécies selecionadas, além de resultados quantitativos e estatísticos do *software* de contagem utilizado.

Finalmente, no Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões sobre o tema desenvolvido.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Fitorremediação.

Atualmente, diversos métodos são empregados para tratamento de efluentes contaminados, os quais são divididos em dois grupos: abióticos e bióticos. Os métodos abióticos incluem precipitação, adsorção, troca-iônica, membranas e tecnologias eletroquímicas. O processo biótico utiliza a “biorremediação” para degradar substâncias tóxicas presentes no meio-ambiente, utilizando como recurso a ocorrência natural de microrganismos. Os processos biológicos possuem três vantagens principais para a remoção de poluentes (Vijayaraghavan, 2008):

- Podem ser realizados *in situ*, isto é, no próprio local contaminado, ou *ex situ*, através da remoção do meio contaminado.
- São benignos ao meio-ambiente, pois não há geração de poluentes secundários.
- Possuem um baixo custo efetivo.

As principais estratégias de biorremediação são:

- Atenuação natural ou biorremediação intrínseca: técnica *in situ* onde microrganismos autóctones degradam de forma intrínseca ou natural o contaminante.
- Bioestimulação ou bioestímulo: técnica *in situ* que consiste na adição de nutrientes como fontes de nitrogênio e fósforo para estimular o crescimento de microrganismos autóctones.
- Bioventilação: é a bioestimulação (*in situ*) realizada com injeção de gases como O₂ e CH₄.

- Bioaumentação: técnica *in situ* que trata da inoculação do local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
- Bioenriquecimento: técnica utilizada principalmente para o tratamento de resíduos oleosos, que promove a aplicação e incorporação dos contaminantes, ou rejeitos contaminados, na superfície de solo não contaminado para degradação *in situ*. O solo é arado e gradeado para promover a aeração e mistura uniforme do contaminante.
- Compostagem: processo *ex situ* que utiliza microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante e transformá-lo em material estável, tipo húmus.

“Biorremediação” é o processo definido pela ingestão de elementos tóxicos por organismos vivos. O elemento é transportado para dentro da célula, acumulado intracelularmente, atravessa a membrana celular e entra no ciclo metabólico (Malik, 2004). A “biosorção” é definida pela adesão passiva de elementos tóxicos por materiais biológicos mortos ou inativos, ou por materiais derivados de fontes biológicas. Os dois maiores enfoques no processo são o aumento da população microbiana no local contaminado e a adição de microrganismos degradadores dos compostos.

Won et al. (2005), em estudos sobre biosorção de corantes usados na indústria de tintas, concluíram que biomassas microbianas (microalgas, fungos e bactérias) são mais eficientes do que materiais macroscópicos (algas marinhas) – provavelmente devido à natureza dos constituintes da parede celular e grupos funcionais envolvidos.

Os primeiros estudos sobre a capacidade de acúmulo de elementos metálicos por alguns microrganismos apareceram por volta de 1980, quando diversos grupos reportaram pesquisas referentes à acumulação devido ao metabolismo de células vivas,

os efeitos dos metais nas atividades metabólicas de células microbianas e as consequências do acúmulo na cadeia alimentar (Volesky, 1987). Posteriormente, pesquisadores concluíram que a biosorção depende não apenas da composição química da biomassa, mas também de fatores físico-químicos externos e solução química. Picardo, Ferreira et al. (2009) estudaram a biosorção de tório na macroalga marinha da espécie *Sargassum filipendula*, e descobriram uma alta eficiência na recuperação de tório em diferentes profundidades.

2.2 Tório.

Existem cerca de 2500 nuclídeos, dos quais aproximadamente 300 são estáveis. Os nuclídeos restantes são radioativos, ou seja, transformam-se através da emissão de partículas durante um processo de decaimento, até que se torne um nuclídeo estável (Keller, 1981). O tório natural foi originado na mesma época em que se formou a crosta da Terra, e só existe até hoje por possuir uma meia-vida extremamente longa, da ordem de bilhões de anos. Foi descoberto em 1808 por Jöns Jacob Berzelius e utilizado pela primeira vez em 1885, nas primeiras lâmpadas a gás na iluminação pública da Europa e América do Norte. Suas propriedades radioativas foram descobertas em 1898 por Gerhard Carl Schmidt e Marie Curie.

Existem 12 isótopos de tório (Bhainsa e D'souza, 2009), de massa atômica entre 223 e 234, e meias-vidas que vão de segundos até 10^{10} anos, como mostra a Tabela 1 (Santschi, Murray *et al.*, 2006).

Tabela 1: Radioisótopos de tório (Santschi, Murray *et al.*, 2006).

Isótopo	Meia-vida	Tipo de decaimento	Principal energia de decaimento (MeV)	Método de produção
^{234}Th	24,1 dias	β^-	0,053 (70%)	Radioatividade natural; filho do ^{238}U
^{233}Th	22,1 minutos	β^-	1,245 (87%)	^{232}Th + neutrons
^{232}Th	$1,39 \times 10^{10}$ anos	α	4,012 (78%)	tório natural é 99,9% ^{232}Th
^{231}Th	25,64 horas	β^-	0,080 (37%)	Radioatividade natural; filho do ^{235}U
^{230}Th	$7,5 \times 10^4$ anos	α	4,687 (76%)	Radioatividade natural; filho do ^{234}U
^{229}Th	7340 anos	α	4,845 (56%)	Filho do ^{233}U
^{228}Th	1,9 anos	α	5,423 (72%)	Radioatividade natural; filho do ^{228}Ac
^{227}Th	18,17 anos	α	6,038 (24%)	Radioatividade natural; filho do ^{227}Ac
^{226}Th	30,9 minutos	α	6,337 (76%)	Filho do ^{230}U
^{225}Th	8 minutos	α	6,48 (43%)	Filho do ^{229}U
^{224}Th	~1 segundo	α	7,17 (81%)	Filho do ^{228}U
^{223}Th	~0,7 segundos	α	7,29 (60%)	Filho do ^{227}U

Na busca pela estabilidade nuclear, o ^{232}Th emite radiação alfa formando um novo elemento radioativo, o ^{228}Ra , que decai por radiação beta formando o ^{228}Ac . Este processo continua por várias etapas até que o núcleo formado seja estável, corrigindo instabilidades nucleares através da emissão de radiação e chegando ao ^{208}Pb . A este conjunto de radionuclídeos dá-se o nome de família ou série radioativa, como mostra a Figura 1 (Tauhata, 2006).

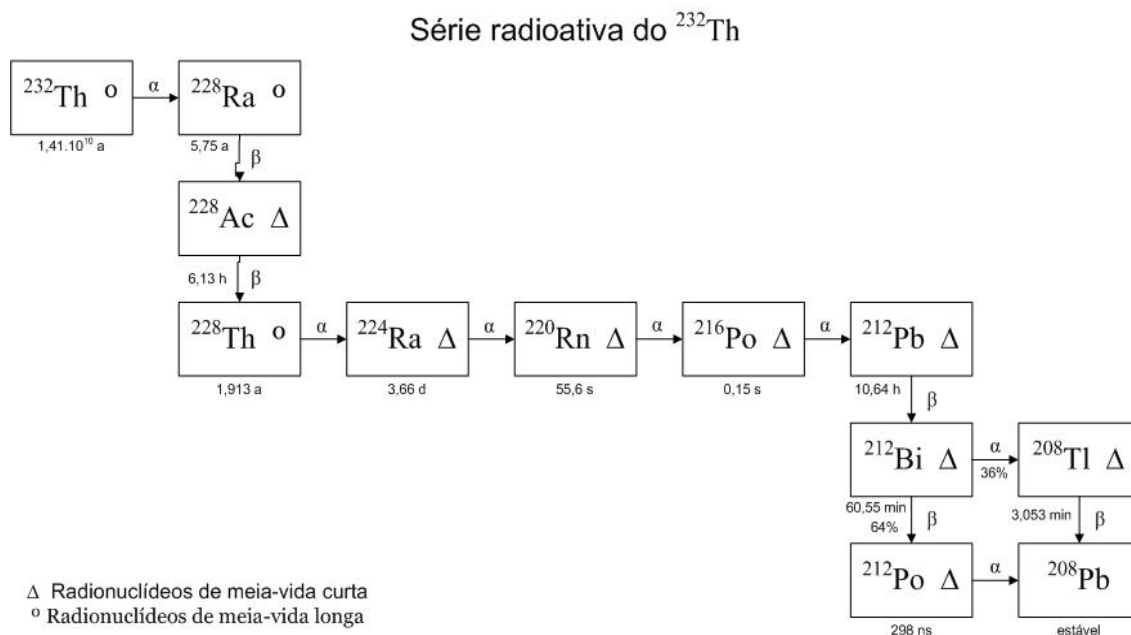


Figura 1: Série radioativa do ^{232}Th (Tauhata, 2006).

Os principais minerais que contém tório são a torianita, a torita e a monazita (fosfato de terras-raras). Aparece, também, associado a outros minerais como columbita/tantalita (composto de ferro ou manganês, e nióbio ou tântalo), zirconita (silicato de zircônio), pirocloro (composto de tântalo, nióbio ou titânio) e fosfatos. Os principais problemas ambientais decorrem de atividades de mineração intensiva e outras que resultam na liberação de rejeitos, como a indústria nuclear e atividades antropogênicas como a queima da lignina por indústrias de produção de energia, processamento de minérios e do uso de fertilizantes (Bhainsa e D'souza, 2009).

O pó de algumas ligas de tório pode ser auto-inflamável quando em contato com o ar. A poluição por radionuclídeos e metais pesados é, hoje em dia, uma preocupação ambiental, segundo Barkay e Schaefer (2001). Existem, no mundo todo, legislações específicas para exploração, manuseio e transporte de tório e outros minérios radioativos em minas e instalações nucleares. No Brasil, a legislação vigente é regulamentada pela CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear, através da Norma

NN 4.01 (Cnen, 2005). O monitoramento periódico é feito através de análises de laboratório que podem gerar resíduos orgânicos e inorgânicos.

No corpo humano, o tório tende a se concentrar no pulmão, fígado, baço, rins e medula óssea. Pode provocar diversos danos biológicos, como câncer ou leucemia, lesões na pele e olhos, esterilidade e outros.

No meio-ambiente, o tório se apresenta sob valência IV, o que torna impossível a biorredução. Na presença de microrganismos, porém, pode sofrer biossorção, tendo sido reportada por diversos autores, como Andrès (1995) no estudo com *Mycobacterium smegmatis*. O cátion Th^{4+} está disponível em solução apenas em baixo pH (em torno de 2,0). Com o aumento do pH, o tório passa a ser encontrado ligado a 1 ou 4 grupos hidroxila. A partir do pH 4,0, é encontrado na forma $\text{Th}(\text{OH})_4$, aumentando a sua absorção por alguns microrganismos (Simonoff, Sergeant *et al.*, 2007).

Os potenciais biosorventes de tório em meio aquoso têm sido estudados, na intenção de proteger o meio-ambiente dos efeitos deste elemento e seus filhos. Volesky (2007) relatou que ambientes contendo metais pesados em baixa concentração comportam-se melhor com relação à biossorção.

2.3 Algas

As algas são organismos aquáticos, que podem se apresentar nas formas unicelulares ou pluricelulares, filamentosos ou coloniais, macro e micro. São organismos livres, mas podem ocorrer em forma de associações simbióticas com fungos (liquens), animais (corais), protozoários e plantas (Bitton, 2005).

As algas são produtores primários nos ambientes aquáticos sendo, portanto, parte fundamental nos ecossistemas. A maioria é fototrófica, ou seja, utiliza energia solar como fonte de energia. Todas contêm clorofila a; algumas contêm clorofila b, c, d e e (em algumas espécies raras), além de outros pigmentos, como carotenóides (xantofilas e carotenos) e ficobilinas (ficocianinas e ficoeritrinas) . Realizam fotossíntese e crescem em meio mineral com suplemento de vitaminas e CO₂ como fonte de carbono. Algumas algas heterotróficas usam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Bitton, 2005).

Segundo Barsanti & Gualtieri (2006), o número estimado de espécies de algas está entre um a dez milhões, sendo microalgas a maior parcela deste número. Estes dados mostram que este é um campo praticamente inexplorado, uma vez que somente em torno de 50 espécies já foram estudadas com detalhes, em níveis fisiológico e bioquímico (Silva, 2006).

As algas fazem parte do domínio Eukarya, e são classificadas com base, principalmente, no tipo de clorofila, estrutura da parede celular e natureza do material de reserva de carbono:

- Filo Chlorophyta (algas verdes): contêm clorofilas a e b, parede celular celulósica e produz amido como material de reserva.
- Filo Chrysophyta (algas marrom-douradas): contêm clorofilas a e c, e sua parede celular contém sílica. Produzem lipídeo como material de reserva.
- Filo Euglenophyta: contêm clorofilas a e b, não possuem parede celular e seu material de reserva é à base de um polímero de glicose (Bitton, 2005).

- Filo Pyrrophyta (dinoflagelados): contém clorofilas a e c, parede celulósica e reservam amido.
- Filo Rhodophyta (algas vermelhas): contém clorofilas a e d, e pigmentos como ficoeritrina. Sua parede celular é feita de celulose, e estocam amido.
- Filo Phaeophyta (algas marrons): contém clorofilas a e c, além de xantofilas. Estocam laminarina (β 1,3-glucano) como material de reserva, e sua parede celular é feita de celulose.

Investigações sobre as propriedades da parede celular mostraram ser esta a principal responsável pela biosorção de elementos, que segue mecanismos complexos como troca iônica, quelação, adsorção e o aprisionamento de íons em espaços da rede de polissacarídeos estruturais. A parede celular dos filos Phaeophyta, Rhodophyta, e muitas Chlorophytas é composta de um esqueleto fibroso e uma matriz amorfa, cujo componente mais comum é a celulose (Davis, Volesky *et al.*, 2003).

Algas aquáticas são encontradas, principalmente, em água tanto doce quanto salgada, apresentando tolerância do pH, temperatura e concentração de O₂ e CO₂. Podem ser planctônicas - como a maioria das algas unicelulares que vivem suspensas em regiões iluminadas - ou bentônicas, que vivem anexadas em sedimentos (Barsanti, 2007). O Filo Chlorophyta é predominantemente de água doce, sendo apenas 10% de suas espécies marinhas. Sua distribuição é cosmopolita, com poucas espécies endêmicas em determinadas áreas (Lee, 2008).

Alguns fatores físicos e químicos podem alterar o crescimento das algas, como a temperatura, pH, nível de oxigênio e concentração de substrato. A temperatura é um dos mais importantes fatores de crescimento e sobrevivência. Altas temperaturas podem

acarretar a desnaturação de proteínas, bem como alterações na estrutura da parede celular e, portanto, na permeabilidade da célula.

Igualmente importante, o pH afeta o grau de ionização de muitas substâncias e, portanto, o seu transporte para o interior das células. Em geral, o pH ideal para crescimento de algas é em torno de 7, embora comumente alguns processos metabólicos acídicos resultem na diminuição do pH.

Algas podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. As aeróbias crescem em presença de oxigênio. As facultativas crescem tanto em presença quanto em abstinência de oxigênio, e os anaeróbios crescem apenas em ambientes sem oxigênio livre. As algas aeróbias utilizam o oxigênio como aceptor terminal de elétrons na respiração. Já as anaeróbias utilizam o oxigênio proveniente de sulfatos, nitratos ou gás carbônico (Bitton, 2005).

Quanto maior a concentração de substrato, maior é a velocidade de crescimento das algas. Dentre os principais componentes do meio, destacam-se alguns nutrientes essenciais como carbono, nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio, compostos derivados do metabolismo da própria comunidade (carboidratos, vitaminas, toxinas) e gases dissolvidos (oxigênio, metano). O nitrogênio é um dos elementos mais importantes, por ser encontrado em maior quantidade na massa seca após o carbono, e por ser responsável pela composição de proteínas. O fósforo também é um importante componente celular, atuando principalmente na geração e transformação de energia através de ATP, GTP e outros. Ainda compõem: ácidos nucleicos, fosfolipídeos, nucleotídeos e fosfoproteínas (Esteves, 1998).

A alta concentração destes nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) nos ecossistemas aquáticos, a turbulência reduzida e o aumento da temperatura da água,

podem acarretar o crescimento desordenado de algas, cujos principais sintomas são espumas de algas e toxinas derivadas de seu florescimento, grandes infestações de plantas aquáticas, maior incidência de doenças hidricamente transmissíveis, turbidez e mau paladar da água, odores fétidos, depleção do oxigênio dissolvido e mortandade de peixes (Tundisi, et.al., 2001).

2.3.1 Microalgas.

O filo Chlorophyta é dividido em quatro grandes classes (Lee, 2008):

- Prasinophyceae – são algas verdes primitivas que deram origem a outras classes. Flageladas, escamosas ou não, com fusos interzonais persistentes durante a citocinese.
- Charophyceae – possuem dois flagelos ligados na posição lateral da célula, e fusos mitóticos sazonais persistentes na telófase.
- Ulvophyceae – com um flagelo na extremidade anterior, possui fusos sazonais persistentes da telófase.
- Chlorophyceae – possui um flagelo ligado na parte anterior da célula e colapsos nos fluxos sazonais.

A classe Chlorophyceae inclui as microalgas unicelulares flageladas e não-flageladas, coloniais móveis e não-móveis. No meio aquático, podem mover-se de duas maneiras: através de flagelos ou por secreção de mucilagem, uma secreção rica em polissacarídeos complexos que tem a função protetora e de âncora de microalgas em plantas aquáticas.

A maioria das algas flageladas, como algumas clorofíceas, mostra possuir movimentos fotostáticos, tendo uma face occipital – sempre dentro do cloroplasto. Usam dois mecanismos para captar a luz. Cada mecanismo pode operar em apenas uma sequência da célula, mudando de direção em relação à fonte luminosa. O fotorreceptor então compara a intensidade da luz com dois diferentes intervalos de tempo. As algas que se movem por secreção de mucilagem utilizam outro tipo de movimento fotostático, apresentando respostas geostáticas à gravidade. Elas exibem geotaxas negativas por nadar contra a gravidade. Esta característica poderia selecioná-la para evolução, porque quando a alga é confrontada com a escuridão ela se move pela superfície a fim de obter luz para reprodução e crescimento (Guillard, 2005).

A reprodução celular no Filo Chlorophyta pode acontecer de forma assexuada (como uma simples fragmentação de colônia em duas ou mais partes formando novas colônias), ou sexuada. A reprodução sexuada pode ser isogâmica, anisogâmica ou oogâmica. Em espécies isogâmicas ou anisogâmicas, os gametas não formam células especializadas. O contrário ocorre em espécies oogâmicas, onde são formados gametângios especializados.

A classe Chlorophyceae, que será objeto deste estudo, é dividida em nove ordens (Lee, 2008):

- **Volvocales:** células vegetativas flageladas e móveis.
- **Tetrasporales:** colônias não-filamentosas com células vegetativas imóveis capazes de dividirem-se; podem conter pseudocílios.
- **Prasiolales:** algas unicelulares marinhas, de água doce ou terrestre com pequenos filamentos.

- **Chlorellales:** colônias de algas unicelulares ou não-filamentosas; células vegetativas não-móveis.
- **Trebouxiales:** algas verdes envolvidas em simbiose com líquens.
- **Sphaeropleales:** filamentos ramificados com novas paredes formadas dentro de velhas paredes de filamentos, resultando em pedaços de parede com forma H.
- **Chlorosarcinales:** células filhas retidas dentro da parede celular; não há plasmodemata presente.
- **Chaetophorales:** filamentos ramificados ou não; presença de plasmodemata.
- **Oedogoniales:** algas de água doce com filamentos uninucleados e um único tipo de divisão celular; esporos móveis e gametas com flagelo em espiral em um pólo.

Os gêneros *Monoraphidium* e *Scenedesmus* pertencem à ordem Chlorellales e são muito comuns entre as clorofíceas, ocorrendo frequentemente como cultura quase pura em plânctons. *Scenedesmus* foram isoladas pela primeira vez em 1893 pelo microbiologista holandês Martinus Willen Beijerinck (Alencar, 2007). Sua célula uninucleada possui um cloroplasto laminado simples. A morfologia da colônia pode variar consideravelmente de acordo com as condições do meio onde estão crescendo (Lee, 2008).

2.4 Quantificação de microalgas

A estimativa do tamanho da população de uma cultura (expressa em número total de células, massa ou volume), assim como a quantidade de indivíduos por volume

de cultura, é muito importante para a avaliação dos efeitos de nutrientes e outras análises específicas realizadas em microrganismos (Roberts, 1998). Uma curva de crescimento é uma excelente forma de mensurar uma resposta biológica, tão amplamente definida e influenciada por diversos fatores como alterações nutricionais, transporte, integridade da membrana e outros. Pode ser realizada através da contagem de células em culturas durante um determinado período de tempo. A quantidade de indivíduos por volume é muito aplicada na estimativa da velocidade de aumento da cultura, equivalente ao aumento da população (Guillard, 2005).

A forma mais tradicional é a contagem, que consiste em adicionar um volume conhecido de cultura em uma câmara de contagem ou hematocitômetro – uma placa plana com área conhecida e dentro dos limites de profundidade do foco da objetiva do microscópio de luz transmitida. A área de observação é identificada no microscópio e contando-se a quantidade de células presentes naquele espaço de volume conhecido, tem-se a quantidade de células por unidade de volume. Esta técnica é utilizada por todas as câmaras de contagem, pois têm área de visão de profundidade especificada, tornando fácil a conversão entre área contada e volume.

No estudo de culturas, a amostra é diluída por procedimentos que fazem considerações estatísticas. A cultura deve ser bem homogeneizada. Embora a incerteza da amostragem tenha tanta importância no estudo, existem apenas três casos onde podem surgir problemas. O principal é quando as algas ficam aderidas à parede do frasco de cultura, ou quando crescem em aglomerados nos quais não é possível visualizá-las individualmente. Outro problema acontece em contagens de colônias que ficam distribuídas sobre a superfície. Neste caso, o número de colônias deve ser computado e o número médio de células por colônia deve ser determinado separadamente. Além disso, podem também surgir problemas no caso de contagem de

células em divisão, quando a célula individual pode ser contada duas vezes por ter quase o dobro de material celular. Células submetidas a vortex-mix em vidros e tubos plásticos após tratamento com formalina ou solução de I₂KI podem se quebrar. Nelson e Brand (1979) descobriram em seus estudos que, de sete espécies flageladas conservadas em formalina, apenas a *Chroomonas salina* Butcher continuou intacta. Seis espécies diatomáceas permaneceram intactas, mas, como a maioria dos flagelados, a *Phaeodactylum Tricornutum* Bohlin também foi lisada (Guillard, 2005).

Fatores como a densidade da cultura, tamanho e forma das células ou colônias a serem contadas e presença de fios extracelulares podem influenciar a escolha da câmara de contagem. Existem vários tipos comercializados atualmente, que diferem nas suas dimensões, presença de divisões e magnificação da objetiva do microscópio. A Tabela 2 mostra as variadas câmaras encontradas, onde o tamanho celular e a densidade de culturas são escolhidos cuidadosamente (Guillard, 2005).

Tabela 2: Câmaras de contagem comerciais (Guillard, 2005)

<i>Câmara de contagem</i>	<i>Tamanho da célula (μm)</i>	<i>Densidade da cultura (células/mL)</i>
Sedgwick-Rafter	50 - 500	$30 - 10^4$
Palmer-Malonet	5 - 150	$10^2 - 10^5$
Speirs-Levy (0,2 mm prof.)	5 - 75	$10^4 - 10^6$
Hematocítômetro (0,2 mm prof.) (Fuchs-Rosenthal)	5 - 75	$10^4 - 10^6$
Hematocítômetro (0,1 mm prof.) (Neubauer)	2 - 30	$10^4 - 10^7$
Petroff-Hausser	<1 - 5	$10^6 - 10^8$

Para culturas densas e de células suficientemente pequenas, hematocítômetros com câmaras de 0,2 mm de profundidade e áreas marcadas são os mais utilizados. Ocasionalmente, pode ser necessária a diluição da cultura em água deionizada ou meio de cultura estéril para contagem. A diluição também é indicada para casos onde há a formação de aglomerados. O fator de diluição tem que ser levado em conta na hora da contagem (Guillard, 2005).

A quantificação de microalgas filamentosas pode ser muito complicada através da contagem direta. Utiliza-se, então, a avaliação da massa seca da amostra, quantificando as células na unidade de massa por volume (mg/L). O processo é bastante simplificado, sendo necessária apenas a secagem de determinado volume de amostra em estufa a 105°C, até que a massa se torne constante, em cadinhos previamente tarados. A quantidade de biomassa é determinada pela diferença de massa entre cadinho vazio e com amostra. A incerteza associada a este processo, porém, é maior já que não é possível quantificar o número exato de indivíduos.

A contagem direta dos microrganismos traz algumas incertezas associadas, como:

- a incerteza introduzida pelo próprio operador;
- a incerteza da diluição;
- a incerteza da repetitividade;

Além disso, a contagem feita de forma direta no microscópio não permite um registro das análises realizadas. Um método computacional para contagem de microrganismos é muito importante, pois acarreta a diminuição destas incertezas. Permite a gravação do registro das contagens realizadas, para que possam ser refeitas posteriormente, e torna desnecessária a diluição da amostra à medida que torna possível

a diferenciação entre itens contados e não-contados, impossibilitando a contagem repetida, ou a falta da contagem de determinado item.

2.4.1 Método eletrônico de quantificação

Uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio permite que sejam feitas gravações de imagens das culturas analisadas. Um programa de computador é capaz de realizar as contagens de células de forma automática ou manual, registrando os dados.

O desenvolvimento de um programa próprio possibilita a adequação às próprias condições de experimento do laboratório e aquisição das imagens pelo microscópio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microalgas

Para este estudo foram escolhidas as microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp., que seguem a classificação taxonômica apresentada na Tabela 3:

Tabela 3: Classificação das microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp.

	<i>Monoraphidium</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.
Domínio	Eukarya	Eukarya
Filo	Chlorophyta	Chlorophyta
Classe	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Ordem	Chlorellales	Chlorellales
Família	Oocystaceae	Scenedesmaceae
Gênero	<i>Monoraphidium</i>	<i>Scenedesmus</i>

Estes gêneros foram escolhidos por apresentarem facilidade de cultivo, rapidez de crescimento e não serem tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Tais características facilitaram o desenvolvimento do cultivo no laboratório para o estudo em questão, além de facilitar o desenvolvimento do programa computacional de contagem, por apresentar estrutura unicelular.

As cepas foram cedidas pelo banco de algas do Laboratório de Toxicologia de Cianobactérias do Centro de Ciências da Saúde (CCS,) do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os experimentos de cultivo das microalgas e de toxicidade do tório foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos do Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos do Instituto de Química da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

3.2 Condições de cultivo dos microrganismos

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o ASM-1 (Gorham Pr, 1964), preparado através da junção de soluções estoque descritas na Tabela 4. O meio foi esterilizado em autoclave (121°C durante 20 minutos). Após atingir a temperatura ambiente, foi adicionada solução de micronutrientes (Tabela 5) para complementação das necessidades nutricionais, na proporção de 1 mL de solução para cada litro de meio de cultura.

Tabela 4: Meio de Cultura ASM-1 usado na manutenção de cianobactérias e microalgas verdes (Gorham Pr, 1964)

	Massa (g)	Observações
Solução estoque A		
NaNO ₃	1,70	Completar para 200 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
Solução estoque B		
K ₂ HPO ₄ ou	0,87	Completar para 100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,14	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou	1,78	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,33	
Solução estoque C		
H ₃ BO ₃	2,48	Completar para 100 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
ZnCl ₂	0,335	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
CuCl ₂	0,0014	

	Massa (g)	Observações
EDTA.Na ₂	1,86	Completar para 100 mL
Para cada litro de ASM-1: Estoque A = 20,0 mL Estoque B = 2,0 mL Estoque C = 0,1 mL Estoque D = 0,4 mL Completar para 1000 mL. Ajustar o pH para 8,0		

Tabela 5: Solução de micronutrientes para complementação nutricional do meio ASM-1.

Vitaminas	Concentração	Observação
Tiamina HCl	0,1 mg/L	Completar para 1000 mL
Biotina	0,5 µg/L	
B ₁₂	0,5 µg/L	

3.2.2 Preparo da cultura inicial

Alíquotas de 5 mL das cepas cedidas pelo laboratório da UFRJ foram inoculadas em frascos de 200 mL, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, em 100 mL de meio de cultura ASM-1. Os frascos foram vedados com tampão de algodão para permitir trocas gasosas. O pH dos meios foi ajustado em medidor de pH da marca Quimis, modelo Q 400/m11.

O crescimento foi mantido em câmara de germinação 347 CDG da marca Fanem – Brasil, em ciclo claro-escuro de 12-12 h e à temperatura constante de 23° C. A manutenção das culturas microbianas foi feita através de subcultivos, necessários para fornecer nutrientes e espaço suficiente para o contínuo crescimento dos

microrganismos. O subcultivo consiste em transferir, a cada sete dias, uma alíquota de 10 mL da cultura em crescimento, para 100 mL de novo meio de cultura.

3.3 Ensaio de toxicidade

Previamente, foi realizado um estudo da bioacumulação dos microrganismos, medindo-se o crescimento em meio ASM-1 com pH ajustado para 6,0 e 8,0. Para o crescimento das microalgas, o pH do meio ASM-1 foi ajustado para um valor inferior, a fim de que não ocorra precipitação do tório na forma de hidróxido. Com isso, o crescimento das espécies foi avaliado no meio ASM-1 em pH 6,0, verificando-se o efeito dessa alteração no crescimento das espécies.

Para todos os experimentos de toxicidade foi escolhido o elemento tório, em solução padrão de Th (NO₃)₄. 5H₂O a 1023 mg Th/L em HNO₃ 1 mol/L (padronizada pelo método de titulação inversa com EDTA, no laboratório do SEANA/IRD). A toxicidade do tório foi estudada adicionando-se o elemento no meio de cultura nas concentrações de 0,5 a 10,0 mg/L, tanto para a microalga *Monoraphidium*, quanto para a *Scenedesmus*. Num segundo grupo de experimentos, o tório foi adicionado na mesma condição do ensaio anterior, em concentrações variáveis de 10,0 a 100,0 mg/L.

Para cada amostra de 200 mL, ou seja, para cada frasco de ensaio, foram adicionados o padrão de tório diluído em meio de cultura ASM-1. As quantidades necessárias para atingir a concentração final definida e completar o volume estão definidas na Tabela 6. Duas amostras foram preparadas sem adição de contaminante, para que suas medidas fossem tomadas como controle. Todas as amostras tiveram o pH ajustado para 6,0, de forma a evitar a precipitação do tório.

Tabela 6: Quantidades de padrão de tório e meio ASM-1 para realização dos experimentos

Concentração final Th (mg/L)	Volume de solução padrão Th 1023 mg/L (mL)	Volume de meio ASM-1 (mL)
0,0 (controle)	0,0	200,0
0,5	0,1	199,9
1,0	0,2	199,8
5,0	1,0	199,0
10,0	2,0	198,0
25,0	5,0	195,0
50,0	10,0	190,0
100,0	20,0	180,0

Todos os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 20 minutos. Em seguida, a cada um foram adicionados 0,2 mL de solução de nutrientes e 15 mL de cultura de microalgas (inóculo).

O crescimento dos microrganismos foi monitorado pela contagem de células ao longo de, no mínimo, vinte e dois dias. Esse período abrange as fases do crescimento microbiano (Marini, 2009). A partir do dia da inoculação, foram feitas contagens sistemáticas das culturas preparadas para o experimento durante aproximadamente 25 dias. As culturas de controle serviram como parâmetro para a avaliação da toxicidade do tório sobre as microalgas, comparando-se as curvas de crescimento em ausência e presença de tório, bem como a produtividade máxima em células que foi obtida em cada caso.

3.4 Método de contagem por microscopia

A quantificação de microrganismos e avaliação do crescimento populacional foi realizada por contagem direta utilizando-se um microscópio óptico Axioskop 40 da marca Zeiss e uma câmara de Fuchs-Rosenthal.

Os microscópios mais comumente utilizados para contagem de algas são os de luz transmitida, e que tenham uma boa qualidade, como o modelo Axioskop 40, da marca Carl-Zeiss (Figura 2).



Figura 2: Microscópio Axioskop 40 do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos da UERJ.

É um modelo bem flexível e que utiliza novas técnicas de medição e contraste. Conta com uma câmera AxioCam acoplada ao tubo trinocular, que combina alta resolução de escaneamento com grande campo de visão. A aquisição de imagens, coloridas ou em preto-e-branco, é feita combinando microscópio, câmera e software

AxioVision a um computador (site: <http://www.zeiss.com.br/C1256D6400256FC1/Contents-Frame/F4EA52F4E9BE62DAC1256D6500494E2F> - acessado em 10/08/2009).

3.4.1 Câmara de Fuchs-Rosenthal

Trata-se de uma lâmina de vidro com duas câmaras de 0,2 mm de profundidade (Figura 3). Cada câmara consiste de 16 quadrados grandes (1 mm) de cada lado, e cada quadrado é dividido em 16 quadrados pequenos, de 250 µm cada. O volume do quadrado é, portanto, de (1 x 1 x 0,2 mm = 0,2 mm³). Desta forma, os 32 quadrados grandes de 1 mm suportam um total de 0,0064 mL de amostra (Figura 4) (Guillard, 2005).



Figura 3: Câmara de Fuchs-Rosenthal.

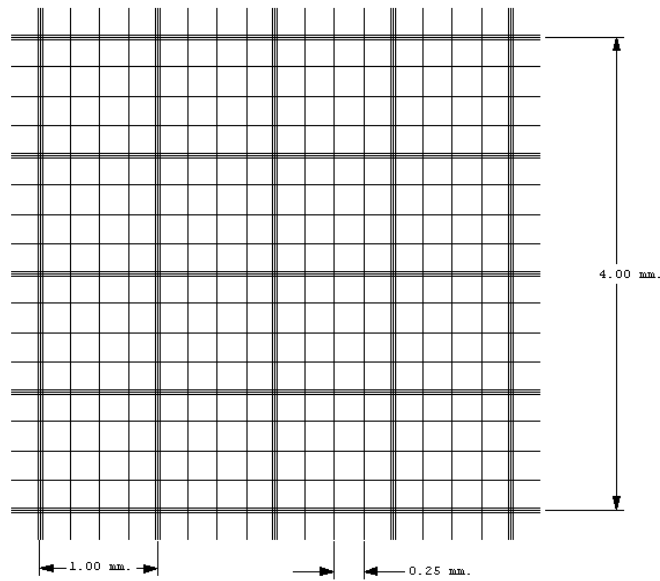


Figura 4: Divisões da Câmara de Fuchs-Rosenthal.

Para a contagem, colocam-se duas gotas de amostra, uma sob cada reticulado da câmara, e os microrganismos que se encontram dentro ou sob as 16 quadrículas que formam cada uma das diagonais desta câmara são contados conforme orientação mostrada na Figura 5. Convencionou-se, a fim de diminuir a incerteza da contagem, que fossem contados os elementos dentro das 16 quadrículas e os que estivessem sobre as linhas triplas nos lados superior e esquerdo. O número de células a serem contadas na diagonal é, no mínimo, 200. Caso a primeira contagem não atinja o mínimo, conta-se a diagonal seguinte, e assim por diante contando, a seguir, verticais e horizontais, até atingir o mínimo. Este é o procedimento corrente para contagem de microalgas e cianobactérias do Laboratório de Toxicologia de Cianobactérias da UFRJ.

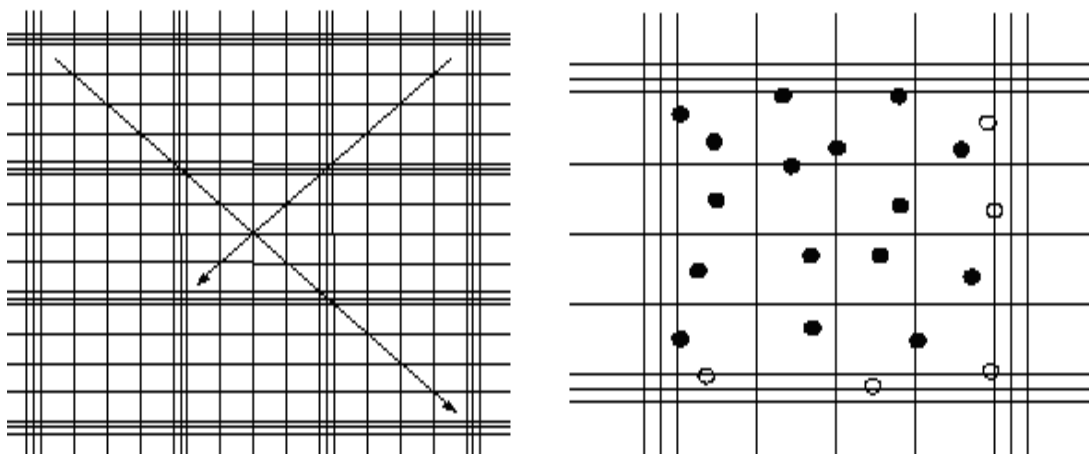


Figura 5: 1 - Orientação da contagem dos micro-organismos na câmara Fuchs-Rosenthal. 2 - representação de células dentro dos quadrados, onde aos círculos claros representam células que não são contadas.

A ampliação usada no microscópio deve ser a de $20 \times$ ocular, correspondendo a um aumento total de 200 vezes. Em situações de alta densidade celular, quando se torna impossível a contagem visual, é necessária a diluição da amostra. O cálculo da densidade celular das microalgas verdes é feito através da Tabela 7.

Tabela 7: Conversão de número de células contadas, em densidade celular, onde A = quadrado maior, \square = quadrado menor, N = número de células contadas e f = fator de diluição. Fonte: UFRJ, 2009.

Área Contada	Densidade celular (mL^{-1})
1/16 de A	$N \times 8000 \times 10 \times f$
1/8 de A	$N \times 4000 \times 10 \times f$
1/4 de A (4 \square)	$N \times 2000 \times 10 \times f$
1/2 de A (8 \square)	$N \times 1000 \times 10 \times f$
1A (16 \square)	$N \times 500 \times 10 \times f$
2A (32 \square)	$N \times 250 \times 10 \times f$
4A (64 \square)	$N \times 125 \times 10 \times f$
8A (128 \square)	$N \times 62,50 \times 10 \times f$
16A (256 \square)	$N \times 31,25 \times 10 \times f$

3.4.2 Aquisição de imagens

Após a contagem direta das microalgas, foi realizada a aquisição das imagens da câmara de contagem. O campo de visualização das imagens não abrange todo o campo de contagem, permitindo apenas uma visão de quatro quadrados pequenos. As imagens são captadas uma a uma, sempre seguindo a mesma ordem, conforme a Figura 6:

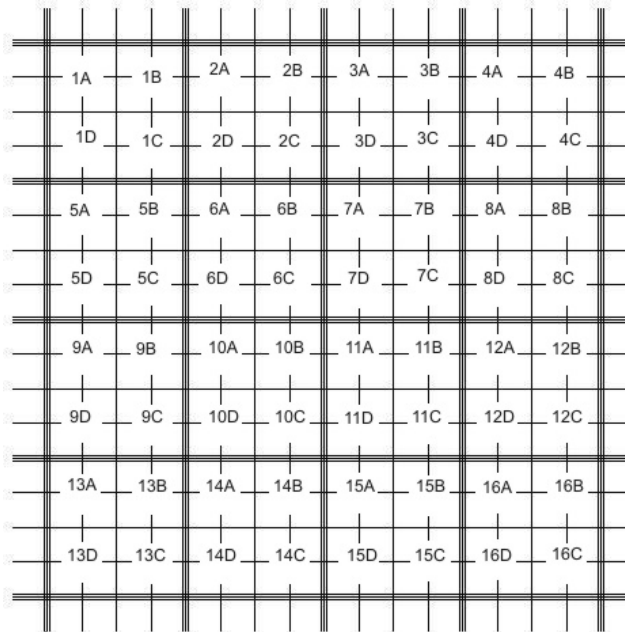


Figura 6: Diagrama de orientação para aquisição de imagens pelo microscópio Axioskop 40

As fotos captadas (Figura 7) são tratadas em Corel Draw X4, versão 14.0.0.567, utilizando-se funções de corte e autocontraste, de forma que torne mais simples sua utilização no programa computacional desenvolvido.

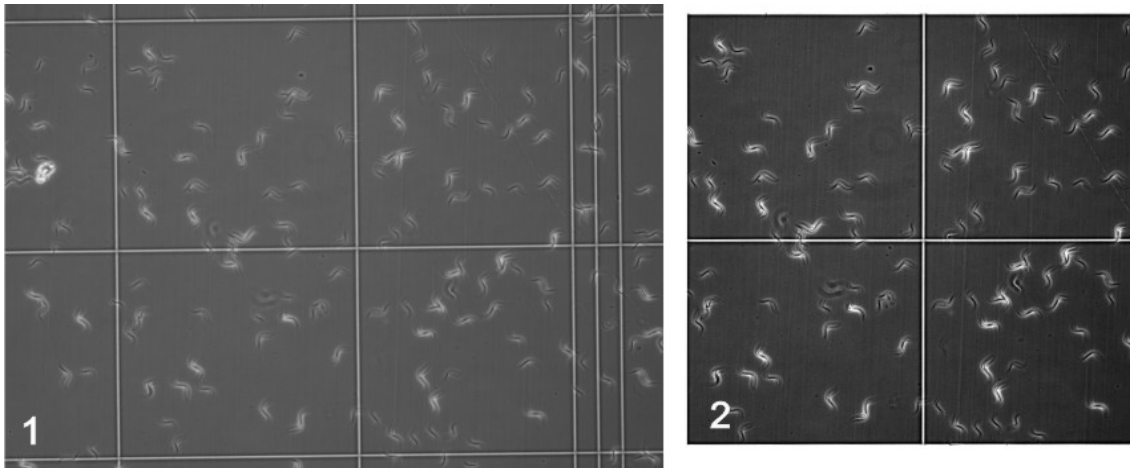


Figura 7: Foto de *Monoraphidium* sp. tirada com microscópio Axioskop 40 e aumento de 20x ocular
 - 1) Foto original; 2) Foto tratada em software Corel Draw X4

3.5 Desenvolvimento de software de contagem

Um programa computacional foi desenvolvido pelo pesquisador Dr. Luis Fernando de Carvalho Conti, do Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear – IRD/CNEN, com o objetivo de aperfeiçoar o sistema de contagem de microalgas, proporcionando uma melhor estimativa da população.

A Figura 8 representa a estrutura do programa, que permite a contagem manual das microalgas presentes nas imagens captadas pelo microscópio. Possui uma barra de ferramentas com as opções ‘Salvar’, ‘Abrir Arquivo’, ‘Nº de contagens’, ‘Reset’, ‘Nível 1’ e ‘Nível 2’.



Figura 8: Software para contagem de culturas - desenvolvido por Dr. Luís Fernando de Carvalho Conti.

No botão ‘Abrir’, escolhe-se a imagem a ser contada, como mostra a Figura 9.

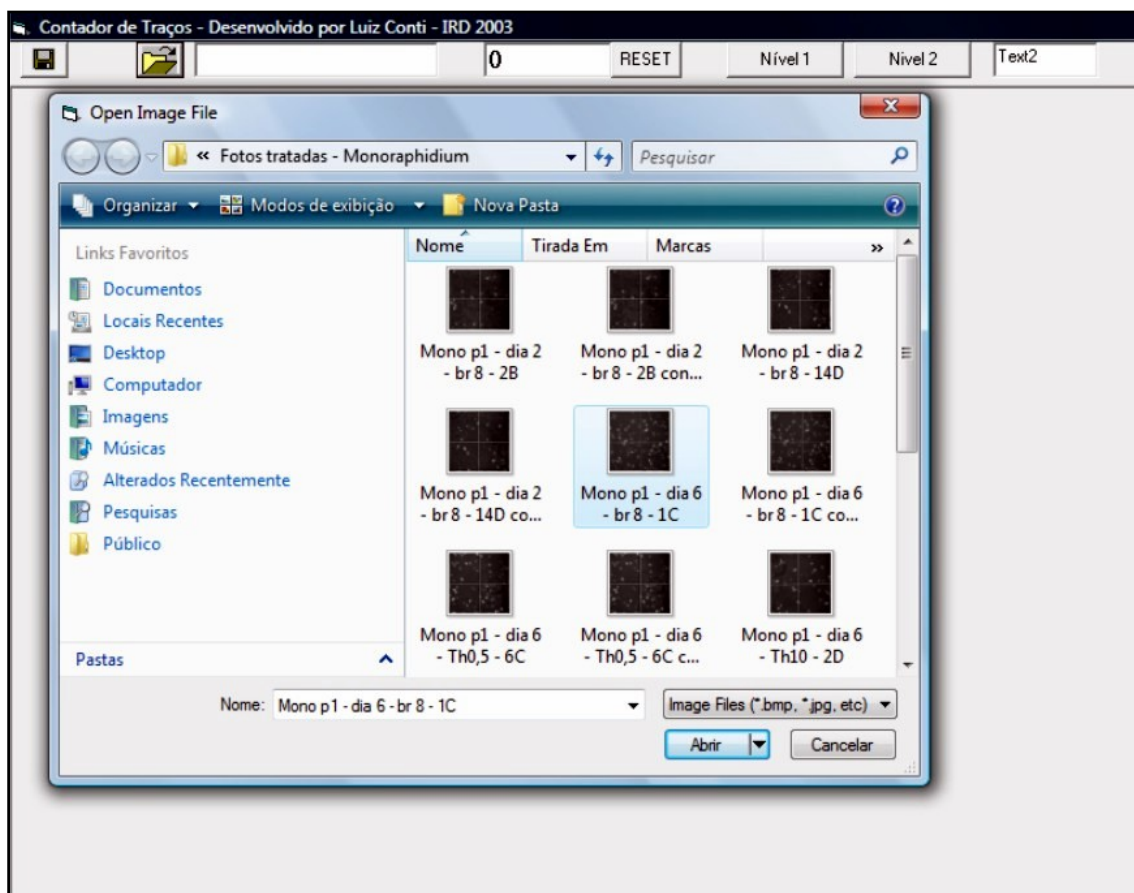


Figura 9: Software para contagem de culturas - janela de seleção de imagem.

A contagem, realizada clicando com o botão esquerdo do mouse sobre cada imagem de microalga que aparecer na foto, ficará marcada com um ponto azul. É possível desmarcá-la clicando com o botão direito, e o ponto ficará vermelho, caso tenha selecionado por engano alguma imagem. O número de elementos contados é indicado no campo circulado, na barra superior (Figura 10).



Figura 10: Representação da imagem de microalga *Monoraphidium* sp. durante contagem através do software.

Ao término da contagem, a imagem é salva com o mesmo nome da original e o número de elementos contados entre colchetes. Por exemplo, a foto 4D, com 27 elementos contados, será salva como 4D[27].

As imagens são contadas na mesma orientação da contagem direta, e a densidade celular também é calculada, conforme apresentado na Tabela 7. Os dados das contagens direta e computacional em função do tempo do experimento são plotados em tabelas e gráficos separados para que se possa avaliar o crescimento das microalgas.

Com o uso do software Microsoft Office Excel 2007, as curvas de crescimento das microalgas do tipo exponencial, conforme mostra a figura 11, passarão por um processo matemático de ajuste linear (ou regressão linear) do $\log(n)$, sendo representados por uma curva de ajuste, associada à equação de regressão linear da reta:

$$y = \alpha + \beta x, \text{ onde:} \quad \text{Equação 1}$$

x e y: correspondem aos valores nos eixos do gráfico

α : constante de interceptação da reta com o eixo vertical

β : constante de declive da reta

O processo de ajuste linear da curva indica que os pontos plotados no gráfico são definidos, ‘modelados’, regredidos a uma reta que corresponde à menor distância possível entre cada ponto plotado e a reta, buscando-se reduzir ao máximo o somatório das médias quadráticas dos pontos.

O Teste de Hipóteses foi realizado através do cálculo da distribuição F de Snedecor e t de Student, tomando-se as hipóteses:

1º: Hipótese H_0 : testada pelo cálculo da distribuição “F de Snedecor”.

$$H_0 = (s_1)^2 = (s_2)^2 = ? \quad \text{Equação 2}$$

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2}, \text{ onde:} \quad \text{Equação 3}$$

F = distribuição

$(s_1)^2$ e $(s_2)^2$ = variância dos coeficientes angulares β das retas de ajuste dos gráficos 13 e 14, respectivamente.

2º: Hipótese H_1 : Testada pelo cálculo da distribuição t de Student

$$H_1 = (X_1) = (X_2) = ? \quad \text{Equação 4}$$

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \text{ onde:} \quad \text{Equação 5}$$

X_1 e X_2 : coeficientes β da regressão linear dos gráficos 13 e 14, respectivamente.

$(s_1)^2$ e $(s_2)^2$ = variância dos coeficientes angulares β das retas de ajuste dos gráficos 13 e 14, respectivamente.

n_1 e n_2 : número de dados dos gráficos 13 e 14, respectivamente.

3.5.1 Comprovação da eficiência do software.

Para que fosse testada a validade do software, foram realizados alguns testes comparativos.

- Estudo comparativo sobre metodologias de contagem direta e com uso de software: As contagens de forma direta e por software de cada amostra foram plotadas em gráficos, separadas por tipo de microalga e concentração de tório no meio, para que se pudesse avaliar cada caso individualmente. Foi adicionada a curva da diferença percentual de contagem entres os métodos, a fim de tornar visíveis os casos com menores e maiores diferenças de contagem. Todos os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes F de Snedecor e t de Student, já descritos anteriormente.
- Estudo da repetitividade de contagens quando se utiliza o software: Foram avaliadas 6 imagens captadas pelo microscópio. A escolha das imagens seguiu o seguinte procedimento: de forma aleatória, foram

selecionadas 3 imagens do experimento com *Monoraphidium* sp. e 3 imagens do experimento com *Scenedesmus* sp. Para cada um destes dois grupos, a escolha das imagens estava relacionada a altas, médias e baixas densidades populacionais, estipuladas por comparação visual. Cada imagem foi contada 10 vezes no software de contagem, e foram calculados, posteriormente, a média e o desvio-padrão. Os resultados foram plotados em gráficos e avaliados estatisticamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do efeito do pH no crescimento das microalgas.

As Figuras 11 e 12 mostram as curvas de crescimento das microalgas em cultivos com diferentes valores de pH (6,0 e 8,0). Os valores das incertezas são pequenos em relação aos valores da densidade e não aparecem no gráfico.

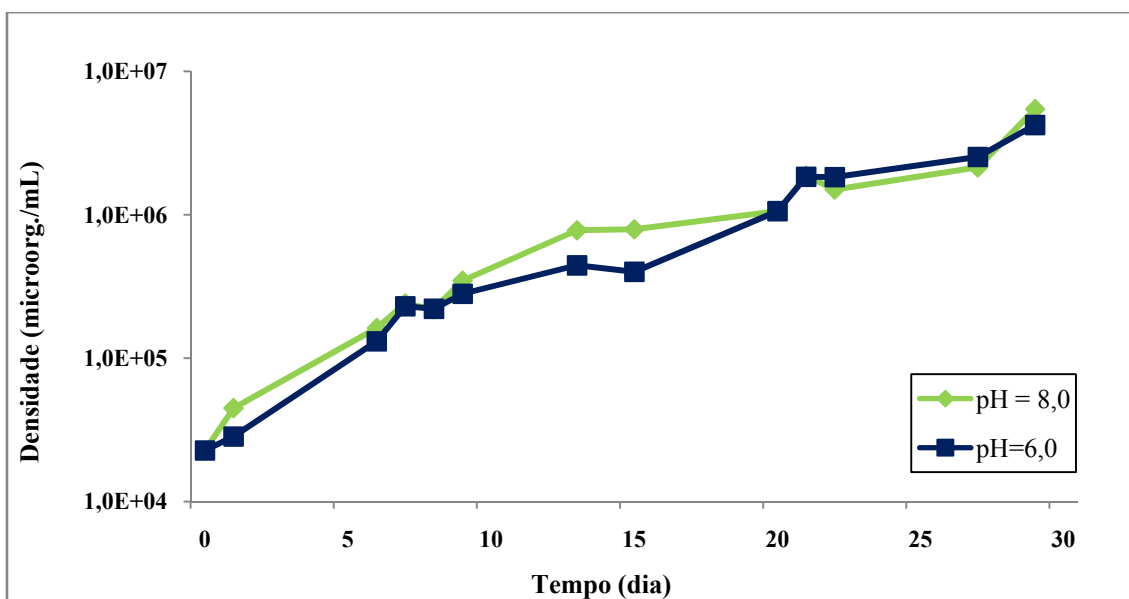


Figura 11: Efeito do pH no crescimento da microalga *Monoraphidium* sp.

Na Figura 11, pode-se observar na Figura 11 que a espécie *Monoraphidium* sp. apresentou crescimento similar, ao longo de 29 dias, tanto em pH 6,0 quanto em pH 8,0.

A espécie saiu da fase *lag* do crescimento em torno do 10º dia, em ambos os casos. A partir desta fase, o crescimento tornou-se mais pronunciado, atingindo $5,45 \times 10^7$ microrganismos/mL no meio em pH 8,0 e $4,23 \times 10^7$ microrganismos/mL no pH 6,0, no 29º dia.

Em comparação com o inóculo inicial, pode-se dizer que houve um crescimento da ordem de 100 vezes, indicando que o pH não teve efeito muito pronunciado no crescimento desta espécie, nos valores testados.

A Figura 12 a seguir mostra o crescimento da cultura de *Scenedesmus* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 e 8,0, sem a presença de tório.

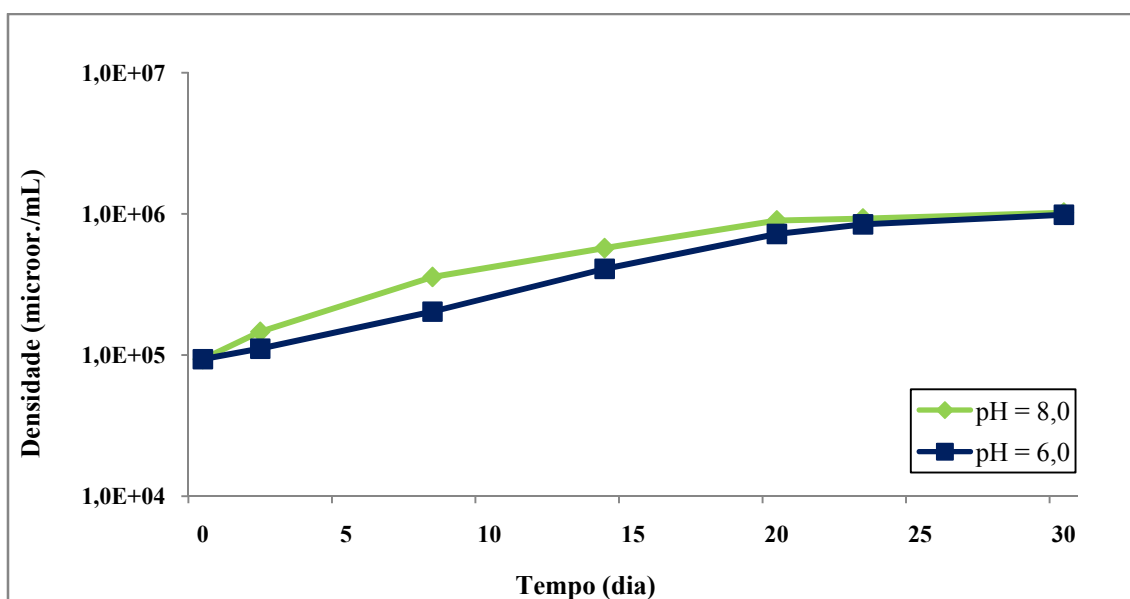


Figura 12: Efeito do pH no crescimento da microalga *Scenedesmus* sp.

A cultura teve um crescimentos similares em ambos os valores de pH durante os 30 dias.

No início do experimento, a população de microrganismos possuía $9,35 \times 10^5$ microrganismos/mL.

A partir do 2º dia até o final do experimento, houve um aumento do crescimento, chegando a $9,86 \times 10^6$ microrganismos/mL no meio em pH 6,0 e $1,02 \times 10^7$ microrganismos/mL no meio em pH 8,0, tendo atingido densidades muito próximas (a diferença foi de apenas 3,3%).

A Figura 13 mostra a aproximação (ou regressão) linear para a curva de crescimento de *Monoraphidium* sp. em pH 6,0 e seus coeficientes.

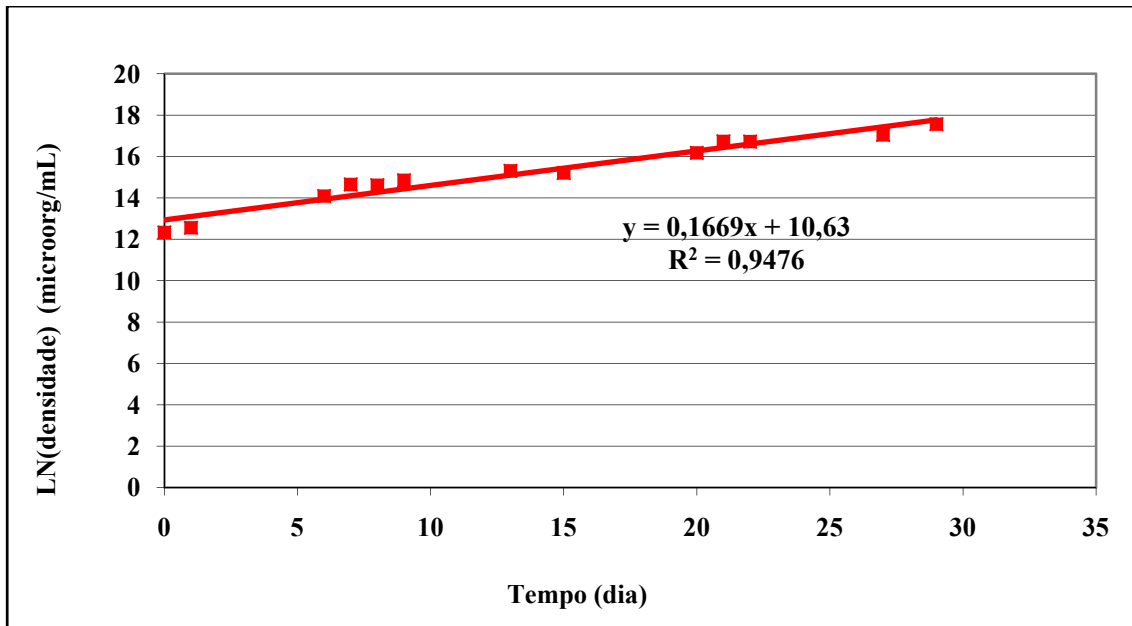


Figura 13: Aproximação linear do crescimento de *Monoraphidium sp.*, em meio ASM-1 em pH 6,0

Esta aproximação tornou possível o estudo estatístico dos resultados. A incerteza associada ao coeficiente linear, calculado pelo software Excel levando em conta os coeficientes da equação, foi de +/- 0,012.

A Figura 14 mostra a aproximação linear para a curva de crescimento de *Monoraphidium sp.* em pH 8,0, com seus coeficientes.

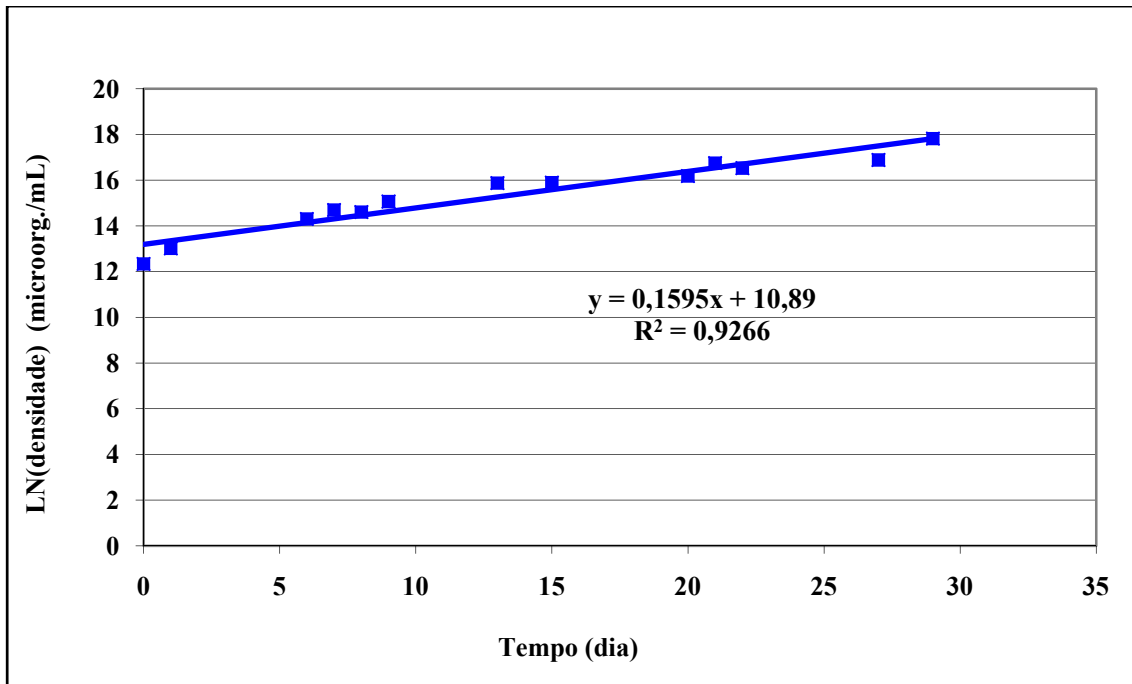


Figura 14: Aproximação linear do crescimento de *Monoraphidium sp.*, em meio ASM-1 em pH 8,0, em ausência do elemento tório.

A incerteza associada ao coeficiente linear, calculado pelo software Excel levando em conta os coeficientes da equação, foi de +/- 0,014. Estes dados servirão como parâmetros para a realização do Teste de Hipóteses abaixo.

O Teste de Hipóteses das aproximações lineares do crescimento de *Monoraphidium sp* obteve os seguintes resultados:

- Testando-se a Hipótese H_0 (através do teste F de Snedecor):

Substituindo os dados da Equação 2 pelos devidos valores, tem-se:

$$F = \frac{0,014^2}{0,012^2} = 1,36$$

O $F_{\text{crítico}}$ é determinado através da tabela de distribuição F, onde v_1 e v_2 representam os graus de liberdade da sequência de dados dos gráficos 3 e 4, e 0,975 representa o intervalo de confiança bi-caudal.

$$F_{\text{crítico}} = F_{v1, v2, 0,975} = \mathbf{2,69}$$

Por definição, o F calculado menor do que o $F_{\text{crítico}}$ indica a igualdade dos desvios-padrão de β .

$$\mathbf{\text{Como } F < F_c, (s_1)^2 = (s_2)^2}$$

- Testando-se a Hipótese H_1 (através do teste t de Student):

Substituindo os dados da Equação 4, tem-se:

$$t = \frac{0,166861 - 0,159469}{\sqrt{\frac{(13 - 1) \cdot 0,012^2 + (13 - 1) \cdot 0,014^2}{13 + 13 - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{13} + \frac{1}{13}}}$$

$$t = \mathbf{1,48}$$

O $t_{\text{crítico}}$ é determinado através da tabela de distribuição t , onde n_1 e n_2 representam a quantidade de dados dos gráficos 19 e 20, e 0,975 representa o intervalo de confiança bi-caudal.

$$t_{\text{crit}} = t_{(n1+n2-2), 0,975} = \mathbf{2,064}$$

Por definição, o t calculado menor do que o $t_{\text{crítico}}$ indica a igualdade dos coeficientes angulares.

$$\mathbf{\text{Como } t < t_c \text{ então, } X_1 = X_2}$$

Estes testes mostram que, em um intervalo de confiança de 95%, os resultados do estudo do efeito do pH no crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. são iguais, ou seja, a diferença entre os pHs 6,0 e 8,0 não interfere nas curvas de crescimento das microalgas.

O resultado dos testes de hipótese inferiu na decisão de realizar todos os ensaios de toxicidade do tório para as microalgas em pH 6,0, onde não há precipitação do tório na forma de hidróxido. Os testes de hipóteses foram utilizados para verificação de todos os resultados utilizando-se o mesmo procedimento, o que torna desnecessária a repetição ao longo do texto.

4.2 Estudos de toxicidade do tório sobre a espécie *Monoraphidium sp*

4.2.1 Culturas contaminadas com tório nas concentrações de 0 a 10 mg/L

As Figuras 15 e 16 representam, respectivamente, as contagens direta e por software dos ensaios de crescimento da microalga *Monoraphidium sp.* em meio ASM-1 em pH 6,0, em ausência de tório e contaminado com o radionuclídeo.

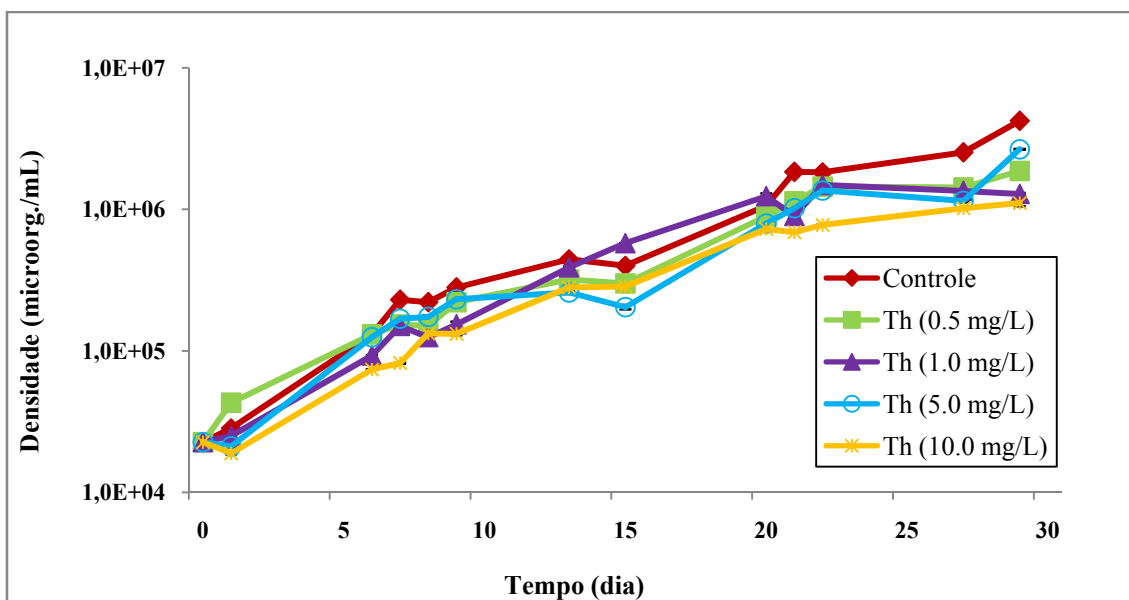


Figura 15: Crescimento de *Monoraphidium sp.* em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ^{232}Th .

Pela contagem direta, o controle obteve um maior crescimento ao final do período em relação às culturas contaminadas com tório, chegando a $4,23 \times 10^7$ microrganismos/mL.

Para todas as culturas, a fase *lag* de crescimento se estendeu até o 15º dia, embora somente a partir do 20º dia elas passem a ter comportamentos diferentes.

As culturas contaminadas com 0,5, 1,0 e 5,0 mg/L de tório cresceram de forma semelhante.

A cultura contaminada com 10,0 mg/L de tório cresceu de forma suave, alcançando $1,11 \times 10^7$ microrganismos/mL e indicando certo grau de inibição do crescimento pela presença do tório.

A contagem do crescimento de *Monoraphidium* sp. através do software é representada na Figura 16.

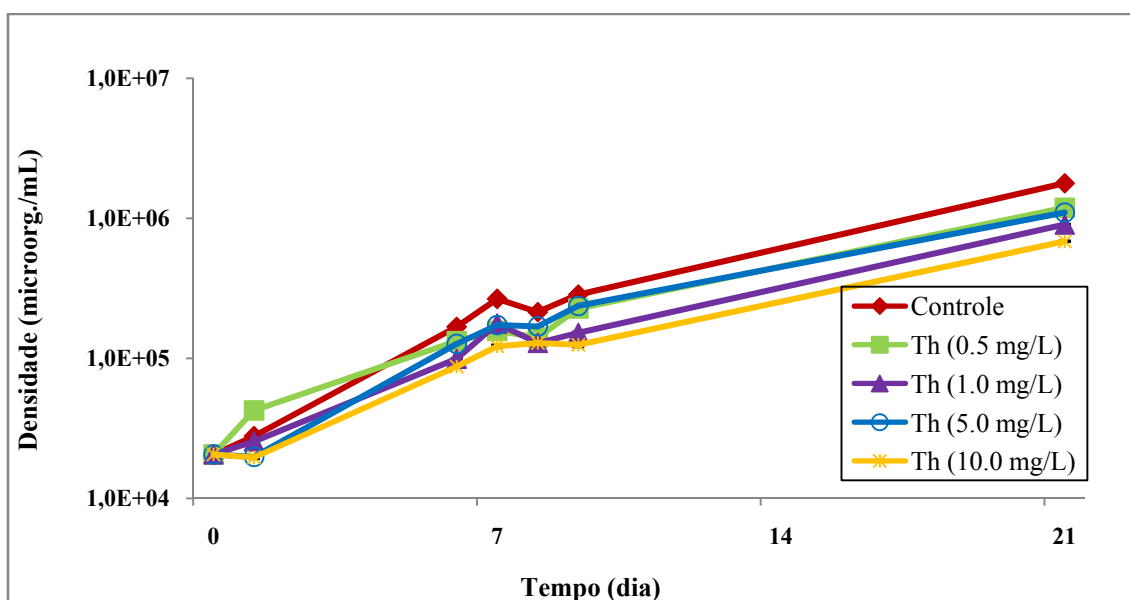


Figura 16: Crescimento de *Monoraphidium* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software).

Ao início do experimento, as culturas de *Monoraphidium* sp. apresentavam $2,06 \times 10^5$ microrganismos/mL na contagem pelo software.

A saída da fase *lag* e diferenciação no comportamento das microalgas são evidenciadas já a partir do 9º dia, e não no 15º e 20º como mostrou a contagem direta.

O controle cresceu até a densidade de $1,78 \times 10^7$ microrganismos/mL. A cultura contaminada com 0,5 mg/L de tório obteve um crescimento 33% menor, chegando até $1,19 \times 10^7$ microrganismos/L, semelhante ao crescimento da cultura contaminada com 5,0 mg/L de tório, que atingiu a densidade de $1,10 \times 10^7$ microrganismos/mL.

A cultura contaminada com 10,0 mg/L de tório obteve o menor crescimento entre todas, 61,5% menor do que o controle.

4.2.2 Culturas contaminadas com tório nas concentrações de 10 a 100 mg/L

A Figura 17 mostra, por contagem direta, o crescimento da microalga em cultivos com meio ASM-1 em pH 6,0 contaminadas com tório nas concentrações de 10 a 100 mg/L, além dos dados de uma cultura controle, isto é, sem a presença da solução de tório.

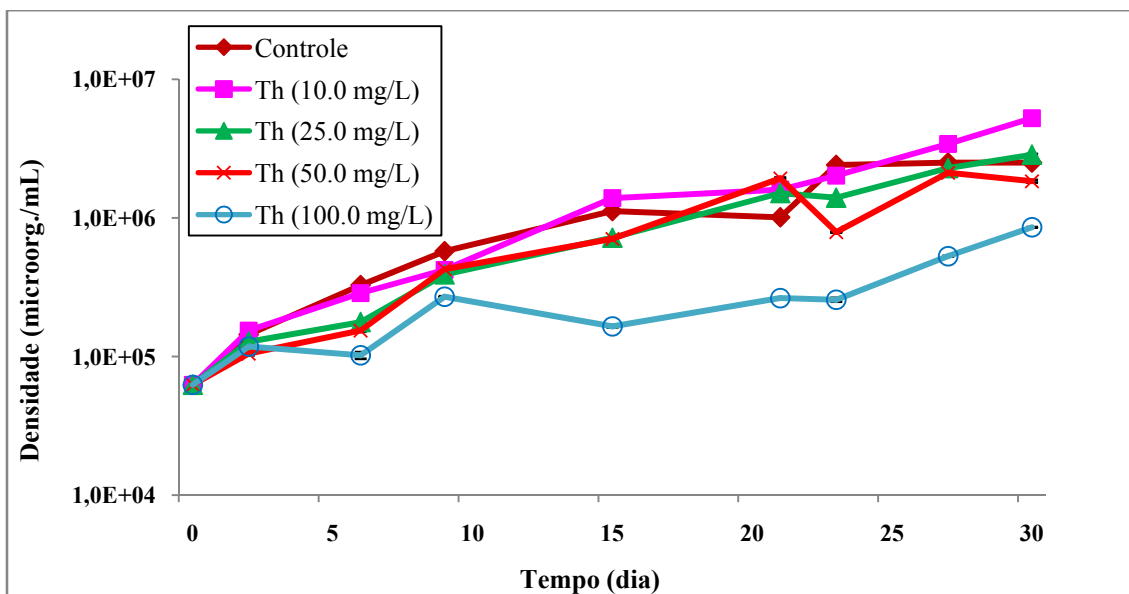


Figura 17: Crescimento de *Monoraphidium* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ²³²Th.

O crescimento das culturas, que partiram de $6,25 \times 10^5$ microrganismos/mL, torna-se diferenciado depois do 9º dia.

Ao final do experimento, a cultura com solução de 10 mg/L de tório foi a que mais se destacou, chegando a $5,25 \times 10^7$ microrganismos/mL, mostrando que o tório, neste caso, estimulou o crescimento da espécie em relação ao controle.

O controle atingiu o crescimento máximo no 23º dia, chegando a $2,41 \times 10^7$ microrganismos/mL e seguindo estacionado até o fim do experimento

Nas concentrações de 10,0 e 25,0 mg/L, o tório, além de não apresentar toxicidade para a *Monoraphidium* sp, ainda estimulou o seu crescimento.

As culturas com soluções de concentrações de 50 e 100 mg/L de tório, geraram valores inferiores de concentração, atingindo $1,84 \times 10^7$ e $8,57 \times 10^6$ microrganismos/mL, respectivamente.

A contagem do crescimento da *Monoraphidium* sp. através de contagem por software é representada na Figura 18:

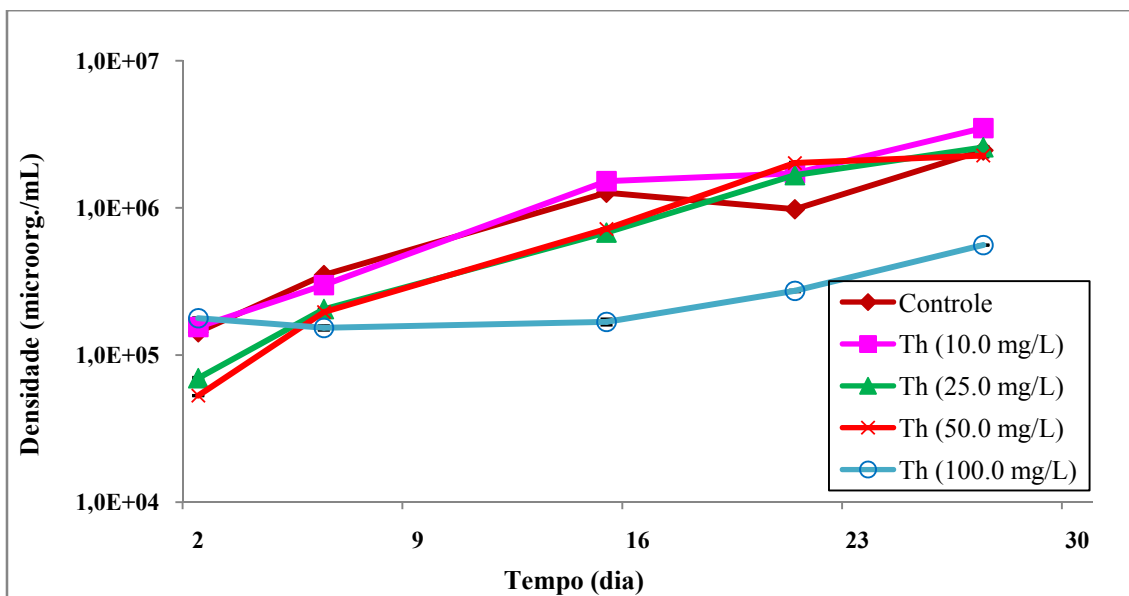


Figura 18: Crescimento de *Monoraphidium* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software).

As culturas passam a ter um crescimento diferenciado a partir do 6º dia. O comportamento é semelhante ao da contagem direta.

O controle obteve um crescimento intermediário em relação às culturas contaminadas com tório, e muito semelhantes às com concentração de 25,0 mg/L e 50,0 mg/L de tório que cresceram, respectivamente, 4,6% mais e 12% menos.

A cultura contendo 10,0 mg/L de tório chegou a $3,49 \times 10^7$ microrganismos/mL no 27º dia, 70% mais que o controle.

A contaminação com 100,0 mg/L de tório foi a que se mostrou mais tóxica à microalga, limitando seu crescimento de $1,78 \times 10^6$ no início até $5,59 \times 10^6$ microrganismos/mL apenas.

4.3 Estudos de toxicidade do tório sobre a espécie *Scenedesmus* sp

4.3.1 Culturas contaminadas com tório nas concentrações de 0 a 10 mg/L

As Figuras 19 e 20 representam, respectivamente, as contagens do número de células obtidas nos ensaios de crescimento da microalga na falta e na presença de tório, através da técnica direta por microscopia e por software.

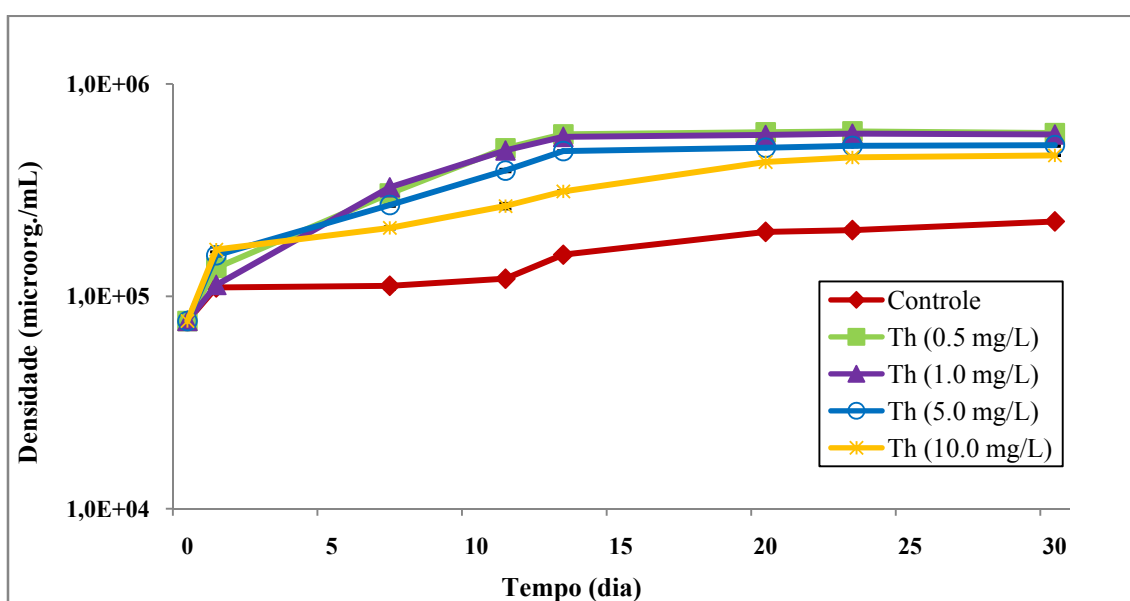


Figura 19: Crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ^{232}Th .

É possível observar, na Figura 19, um crescimento mais acentuado nas culturas contaminadas com tório em comparação ao controle. Uma primeira análise deste fato sugere que a presença do íon nitrato (NO_3^{2-}) proveniente da solução padrão de tório sirva de nutriente para os microrganismos. Além disso, existe a possibilidade de que o EDTA presente no meio de cultura ASM-1 tenha ação complexante do tório, impedindo-o de interagir com as microalgas. Assim, o real comportamento do tório poderia ser observado apenas em concentrações superiores à quantidade total de EDTA no meio. Estas sugestões, porém, requerem uma investigação posterior.

O controle apresentou um crescimento 61% menor do que a cultura contendo 0,5 mg/L de tório, que obteve o maior crescimento.

Embora menor do que a cultura com 0,5 mg/L de tório, o crescimento em meio com 10,0 mg/L de tório também se mostrou bem pronunciado, chegando a $4,61 \times 10^6$ microrganismos/mL.

A cultura contaminada com 1,0 mg/L de tório obteve quase o mesmo crescimento, passando de $7,65 \times 10^5$ microrganismos/mL (no início) para aproximadamente $5,8 \times 10^6$ microrganismos/mL, no 30º dia de experimento.

As concentrações de 5,0 e 10,0 mg/L de tório tiveram crescimentos intermediários.

Nas mesmas condições de ensaio, a microalga *Monoraphidium* sp. se mostrou inibida pela presença de tório, tendo seu crescimento diminuído em relação ao controle. Isto evidencia a maior resistência da *Scenedesmus* sp. ao radionuclídeo.

A contagem através do software para o experimento com a *Scenedesmus* sp. em presença de tório é mostrada na Figura 20.

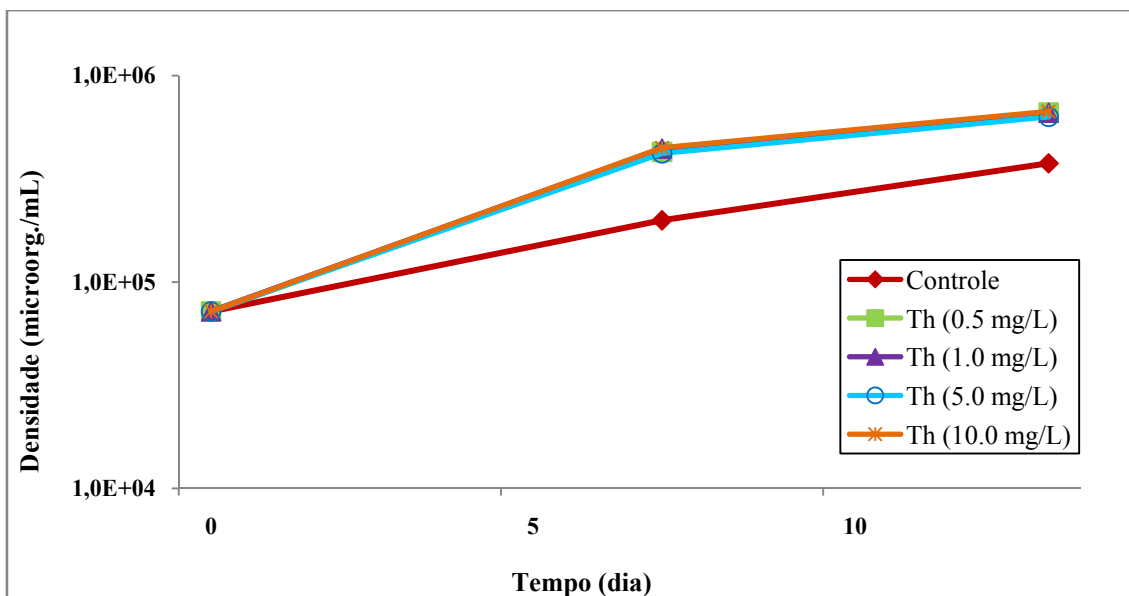


Figura 20: Crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ²³²Th (contagem por software).

O gráfico indica um crescimento muito superior de todas as culturas de *Scenedesmus* sp. contaminadas com tório, em relação ao controle.

A densidade inicial, de $7,20 \times 10^5$ microrganismos/mL, atingiu $3,76 \times 10^6$ microrganismos/mL para o controle.

A densidade de microalgas das culturas contaminadas com tório, ao final dos 13 dias de experimento, alcançou valores até 72,9% maiores do que o controle, chegando, em média, a $6,5 \times 10^6$ microrganismos/mL.

Não foi possível realizar a contagem das microalgas através do software até o fim da fase de crescimento por problemas técnicos.

4.3.2 Culturas contaminadas com tório nas concentrações de 10 a 100

mg/L

O crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. nas culturas contaminadas com tório nas concentrações de 10 a 100 mg/L teve um comportamento um pouco diferenciado, conforme mostrado nas Figuras 21 e 22. A Figura 21 apresenta a contagem direta das microalgas.

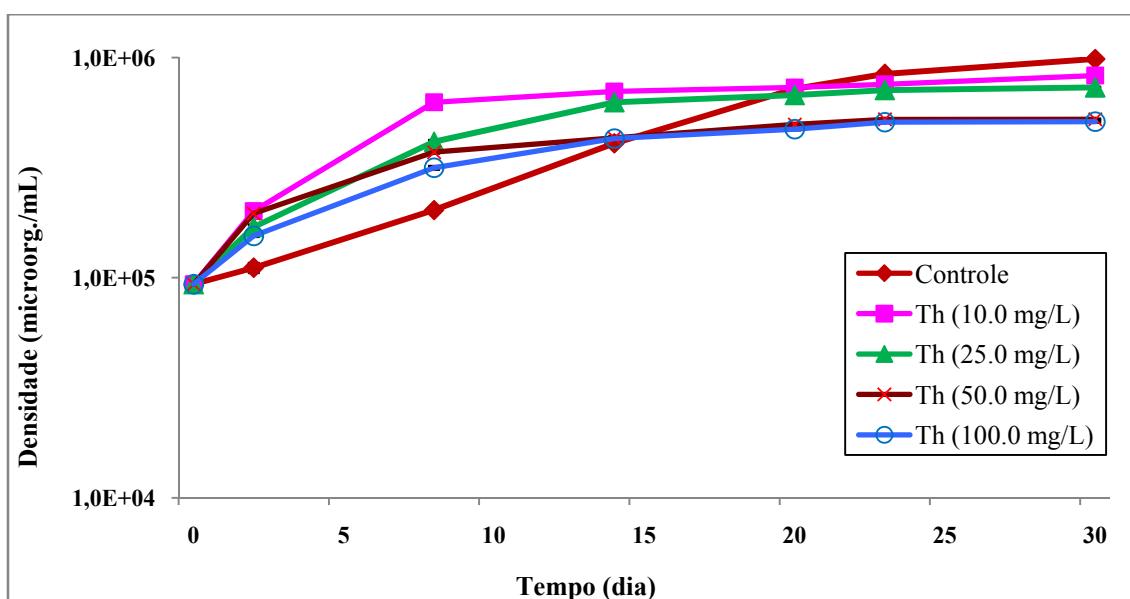


Figura 21: Crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ²³²Th.

A cultura de controle apresentou como resultado um maior crescimento em relação às culturas contaminadas com tório.

O controle apresentou um crescimento da ordem de 10 vezes, indo de $9,35 \times 10^5$ microrganismos/mL no início do experimento a $9,86 \times 10^6$ microrganismos/mL no 30º dia.

Pode-se observar uma tendência decrescente de crescimento conforme o aumento da concentração de tório. As culturas contendo 10,0 mg/L e 25,0 mg/L de tório cresceram 16% e 25,7% menos que o controle, respectivamente.

As culturas com 50,0 mg/L e 100,0 mg/L de tório obtiveram os menores resultados, atingindo a densidade de $5,25 \times 10^6$ microrganismos/mL (culturas com 50,0 mg/L de Th) e $5,12 \times 10^6$ microrganismos/mL (culturas com 100,0 mg/L de Th), mostrando certo grau de toxicidade do tório em altas concentrações para o crescimento de *Scenedesmus* sp, assim como aconteceu com a cultura de *Monoraphidium* sp..

A Figura 22 representa a contagem por software da cultura de *Scenedesmus* sp.

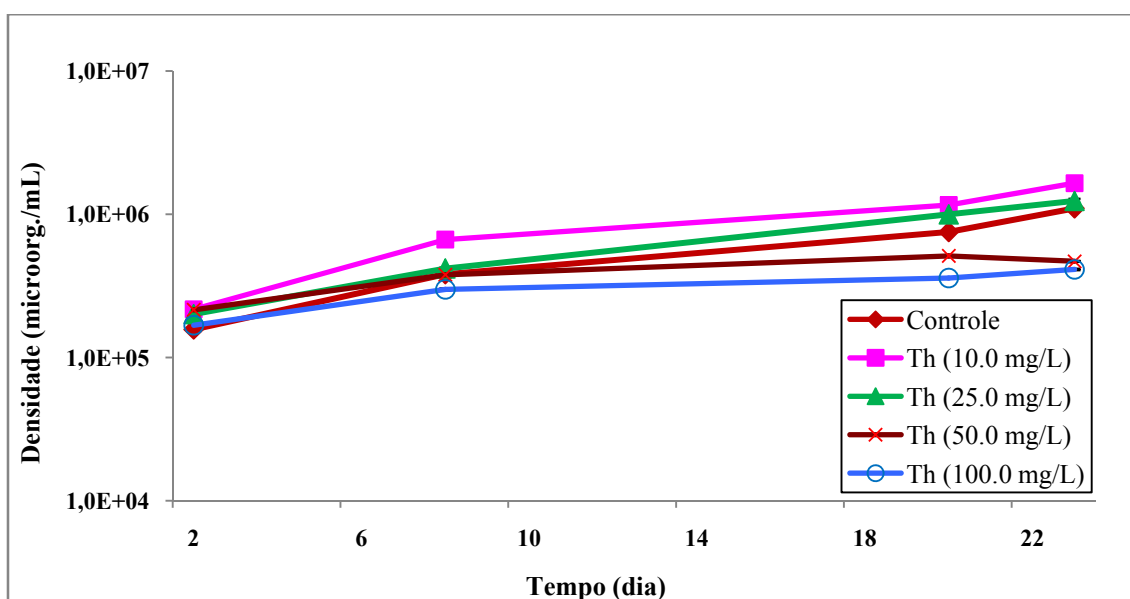


Figura 22: Crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, com e sem contaminação do meio com ^{232}Th (contagem por software).

A contagem direta tornou-se difícil à medida que as culturas atingiam uma alta densidade de microrganismos.

A alta concentração de elementos no campo de visão pelo microscópio dificulta a diferenciação apenas visual dos elementos. Nesta situação, é passível a superestimação (contando alguns elementos por repetidas vezes) ou a subestimação (deixando de contar alguns elementos) do valor real.

Na contagem através do software, a imagem da câmara de contagem pode ser vista em tamanho maior e os elementos podem ser marcados, impedindo esta confusão entre contados e não-contados.

Observou-se que os resultados estão de acordo com o experimento para concentrações menores (Figura 20), onde a cultura com 10,0 mg/L de tório apresentou crescimento superior ao controle. O mesmo comportamento é observado para a cultura com 25,0 mg/L de tório.

Analogamente ao comportamento da microalga *Monoraphidium*, as culturas de *Scenedesmus* contendo 50,0 e 100,0 mg/L de tório não tiveram crescimento satisfatório nas duas formas de contagem, corroborando com a idéia de que em altas concentrações o tório passa a ser tóxico para a microalga.

4.4 Estudo comparativo sobre metodologias de contagem direta e com uso de software.

A representação gráfica das contagens de forma direta e através de software mostra a viabilidade do uso da técnica a fim de evitar erros na estimativa da população de microrganismos. Foram comparadas todas as curvas de crescimento de microalgas analisadas através de ambos os métodos de contagem. As situações onde houve as menores e as maiores diferenças entre os métodos foram selecionadas para apresentação.

A Figura 23 mostra a comparação entre a contagem direta e por software do crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0 contaminado com 1,0 mg/L de tório, onde houve a menor diferença entre resultados.

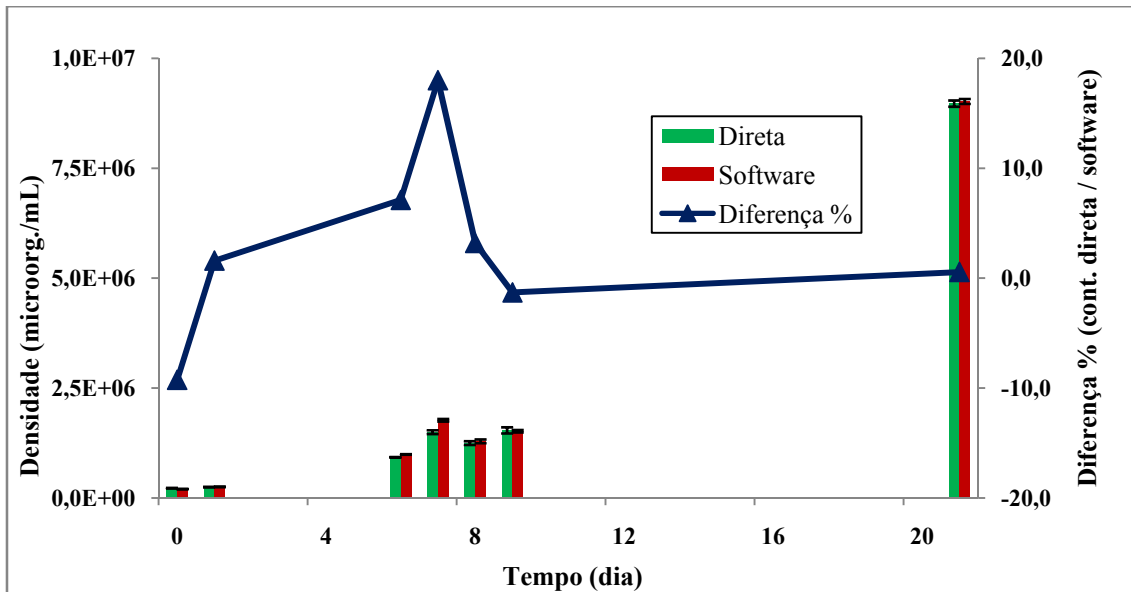


Figura 23: Comparação entre contagem direta e por software para cultura de *Monoraphidium* sp. em meio ASM-1 em pH 6,0, contaminado com 1,0 mg/L de ²³²Th.

A diferença entre os tipos de contagem é estatisticamente insignificante. Nestes casos, o software é uma importante ferramenta para comprovação dos resultados encontrados, cujos registros podem ser guardados para conferências posteriores (rastreamento dos resultados).

É possível inferir, pela curva da diferença percentual entre os métodos, que o software otimiza muito a contagem celular para altas populações. Na situação onde se tem a menor diferença entre métodos, o software possibilita uma melhoria de até 20% nas contagens, como no 7º dia do experimento com *Monoraphidium* sp em meio de cultura em pH 6,0 contaminado com 1,0 mg/L de tório.

A Figura 24 mostra a comparação entre contagens direta e por software de uma cultura de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura ASM-1 em pH 6,0 sem adição de tório, representando a situação com a maior diferença de contagem entre os métodos.

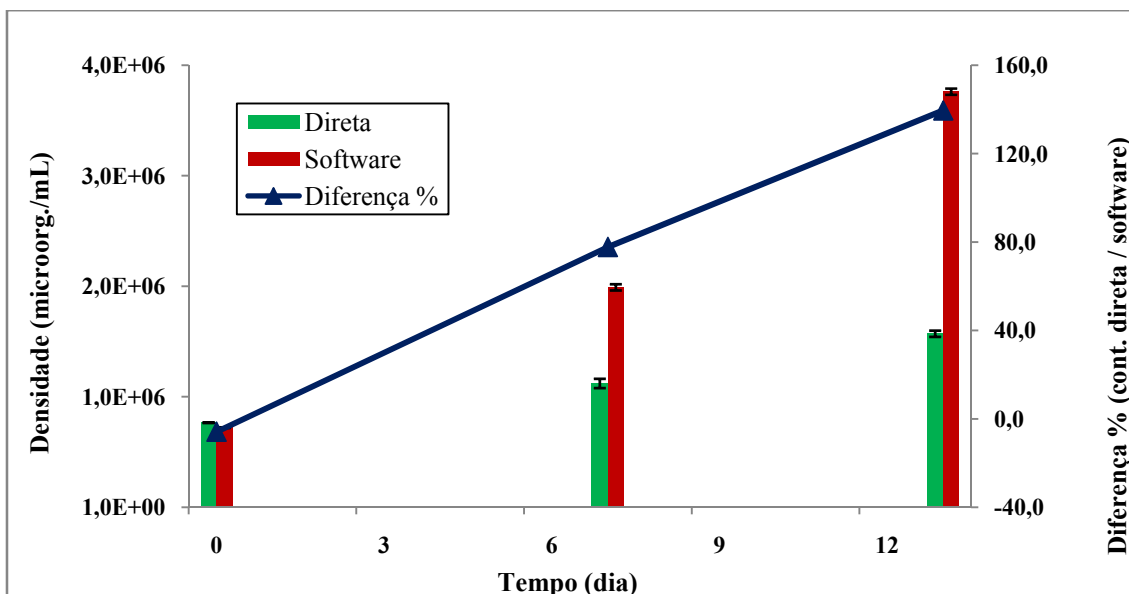


Figura 24: Comparação entre contagem direta e por software para cultura de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura ASM-1 em pH 6,0 e sem contaminação de ^{232}Th .

A alta densidade de microrganismos torna difícil a contagem a olho nu. A não diferenciação dos microrganismos já contados dos não-contados possibilita a super ou subestimação das contagens.

A curva da diferença percentual entre os métodos mostra que, no caso de altas populações, esta diferença pode chegar a 140%, como no 13º dia do experimento com *Scenedesmus* sp. em meio de cultura em pH 6,0 e sem a presença de tório.

4.4.1 Estudo da repetitividade de contagens quando se utiliza o software.

O teste de repetitividade das contagens quando se utiliza o software, tanto para *Monoraphidium* sp. quanto para *Scenedesmus* sp. comprovou a validade do programa para a contagem dos microrganismos.

A Figura 25 mostra o estudo da repetitividade das contagens para *Monoraphidium* sp.

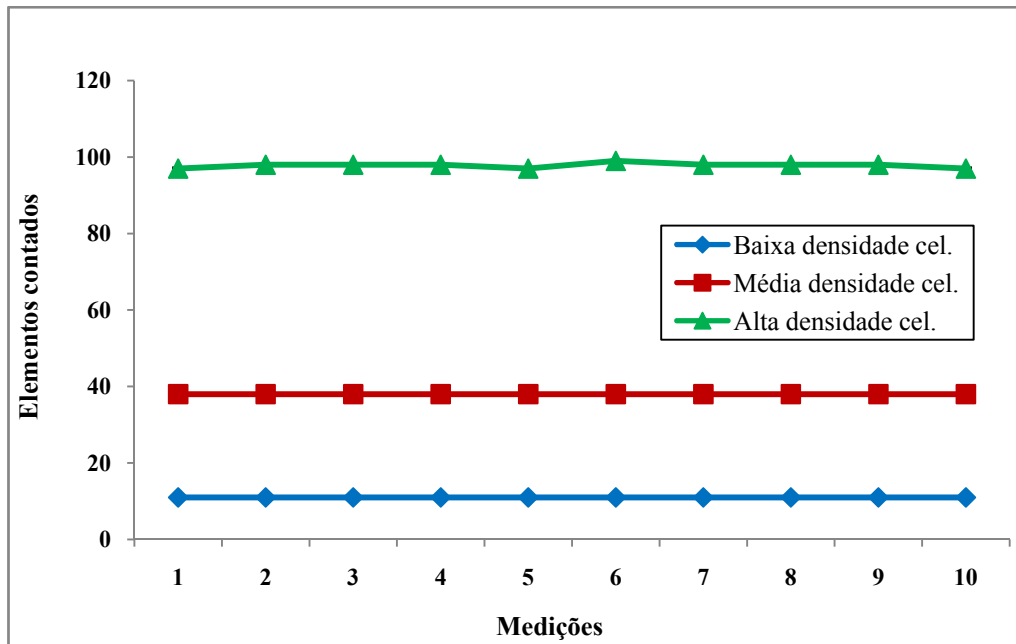


Figura 25: Repetitividade de contagens de *Monoraphidium* sp. através de software.

A sucessão de contagens obteve um desvio-padrão relativo de até 0,63 para as contagens de alta densidade de *Monoraphidium* sp., mostrando que o método é confiável e preciso, podendo melhorar muito a estimativa da densidade das culturas.

A Figura 26 mostra o estudo de repetitividade de contagens para *Scenedesmus* sp.

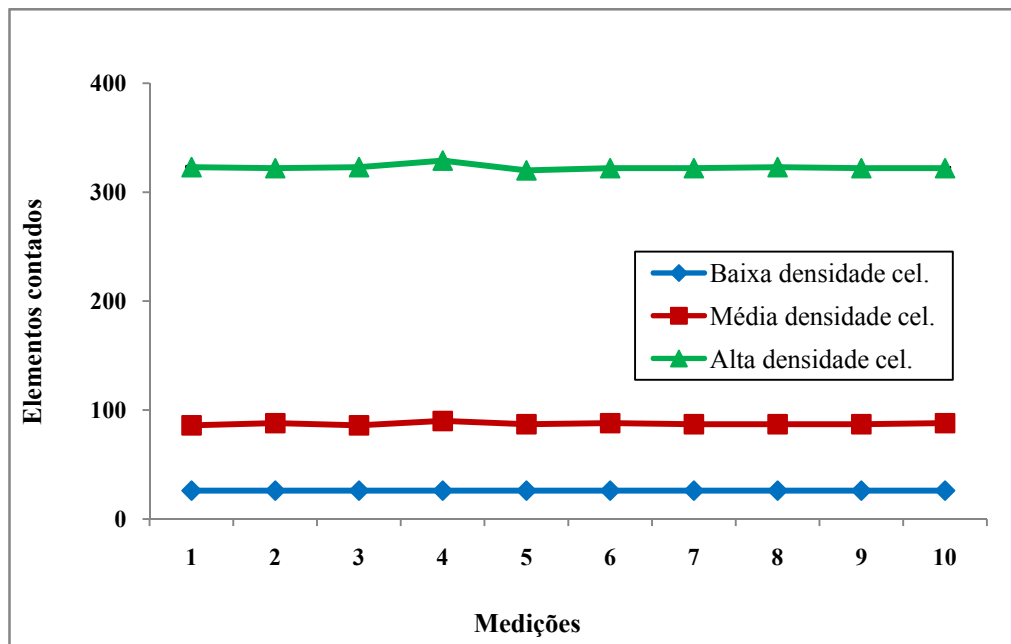


Figura 26: Repetitividade de contagens de *Scenedesmus* sp. através de software.

As contagens obtiveram um desvio-padrão relativo de até 2,35 para as contagens de alta densidade de *Scenedesmus* sp., mostrando que, também para as culturas desta microalga, o método é preciso e pode ser usado com confiança para estimativa da população.

4.5 Galeria de imagens

4.5.1 *Monoraphidium* sp.

A Figura 27 representa a imagem da cultura de *Monoraphidium* sp. em meio de cultura sem a presença de tório e em pH 8,0, no segundo dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular.

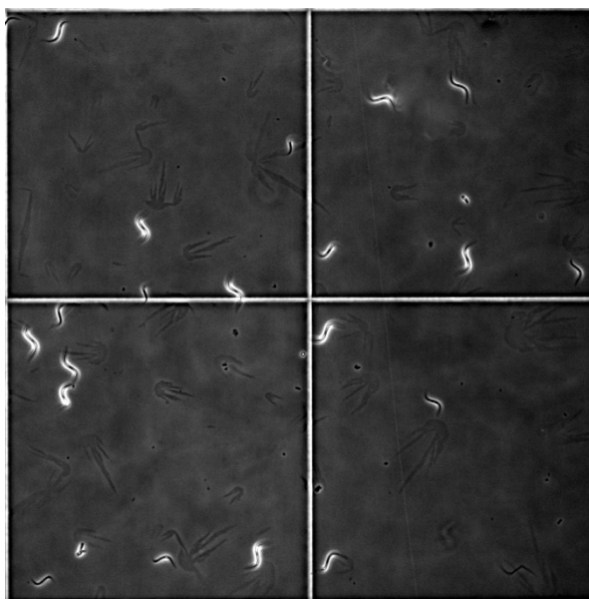


Figura 27: *Monoraphidium* sp. em meio sem contaminante e pH 8,0 - 2º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

Pode-se observar baixa concentração de microrganismos, os quais se encontram bem separados uns dos outros. A Figura 28 representa a imagem da cultura de *Monoraphidium* sp. em meio de cultura contaminado com 0,5 mg/L de tório e em pH 6,0, no sexto dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular.

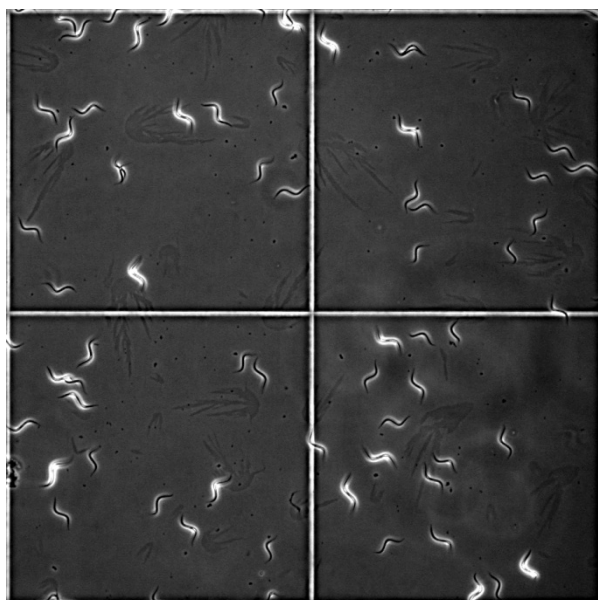


Figura 28: *Monoraphidium* sp. em meio contaminado com 0,5 mg/L Th e pH 6,0 - 6º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

Há um aumento na concentração de microalgas, que continuam separados e em apenas um plano de visão.

A Figura 29 mostra a imagem da cultura de *Monoraphidium* sp. em meio de cultura contaminado com 10,0 mg/L de tório e em pH 6,0, no sexto dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular.

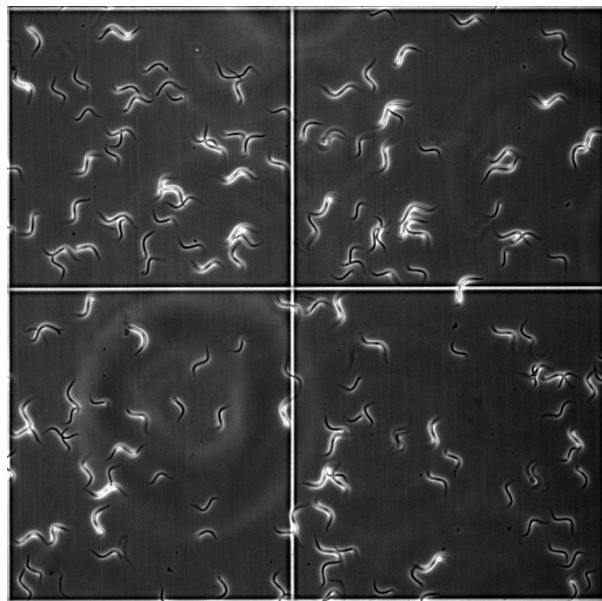


Figura 29: *Monoraphidium* sp. em meio contaminado com 10,0 mg/L Th e pH 6,0 – 6º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

Neste caso, é observada uma alta concentração de microalgas no meio. Há uma tendência de que as microalgas comecem a se unir e haja formação de pequenas micelas, dificultando a contagem.

4.5.2 *Scenedesmus* sp.

A Figura 30 mostra a imagem da cultura de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura sem contaminação de tório e em pH 6,0, no primeiro dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular.

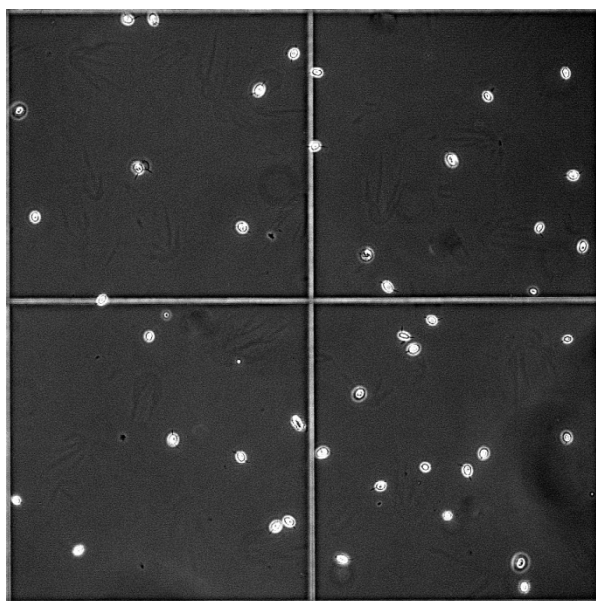


Figura 30: *Scenedesmus* sp. em meio sem contaminante e pH 6,0 - 1º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

Há uma baixa concentração de microalgas no meio, que tendem a ficar espalhadas e em um único plano.

A imagem da cultura de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura sem contaminação de tório e em pH 6,0, no 23º dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular é representada na Figura 31.

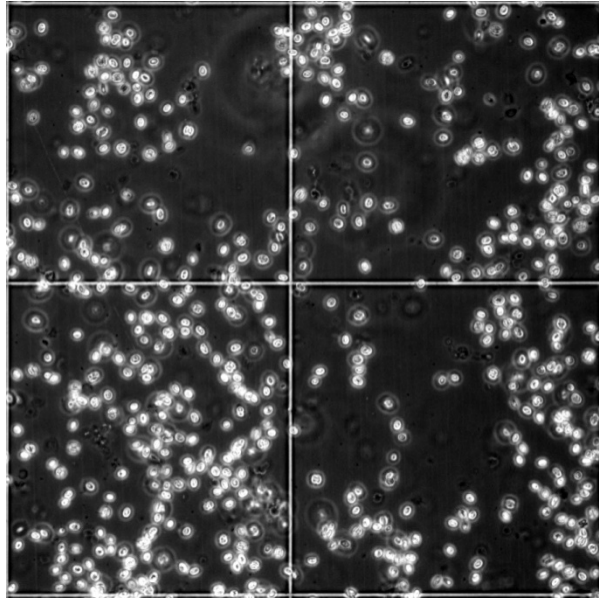


Figura 31: *Scenedesmus* sp. em meio sem contaminante e pH 6 - 23º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

Com a alta concentração, as microalgas passam a ficar agregadas, formando micro colônias. Também é possível visualizar a distribuição dos microrganismos em outros planos espaciais, tornando desfocadas as microalgas que aparecem em segundo e terceiro planos e dificultando a contagem através do microscópio. As microalgas em primeiro plano aparecem brancas e menores, ao passo que as que estão em segundo ou terceiro planos aparecem mais claras e com um maior diâmetro.

A imagem da cultura de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura contaminado com 0,5 mg/L de tório e em pH 6,0, no sétimo dia de experimento, captada pela AxioCam com aumento de 20x ocular é representada na Figura 32.

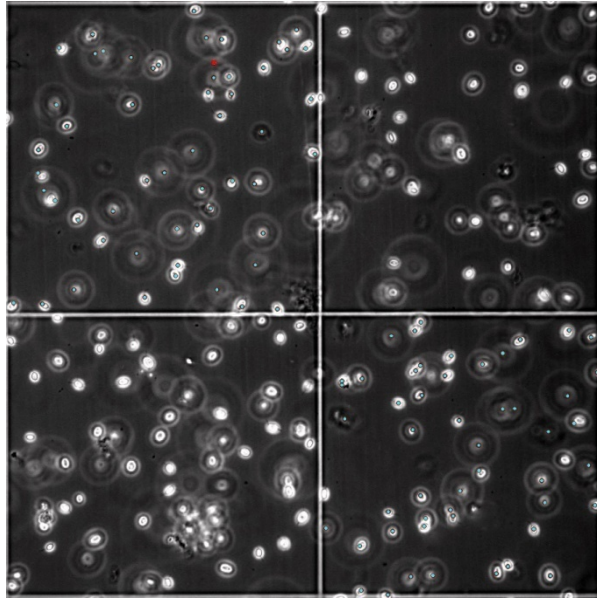


Figura 32: *Scenedesmus* sp. em meio contaminado com 0,5 mg/L Th e pH 6,0 - 7º dia de experimento (aumento: 20x ocular).

É possível visualizar com mais nitidez a distribuição dos microrganismos em outros planos, por haver uma menor densidade de microrganismos.

5. CONCLUSÕES

A diferença entre os pHs 6,0 e 8,0 não interfere no crescimento das microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp., de acordo com o estudo realizado e a análise estatística dos resultados obtidos.

A cultura de *Monoraphidium* sp. foi razoavelmente resistente à presença de tório, seguindo seu ciclo de crescimento, porém a uma taxa menor do que o controle (meio sem tório). A concentração de 100 mg/L de tório foi a mais eficaz em inibir o seu crescimento.

A microalga *Scenedesmus* sp. foi bem resistente à presença de tório no meio de cultura. Em baixas concentrações do radionuclídeo observou-se um aumento da quantidade de microalgas em relação ao controle, sugerindo uma interação positiva entre elemento e organismo. Apenas as concentrações de 50,0 e 100,0 mg/L de tório foram capazes de inibir seu crescimento.

De forma geral, o tório não apresentou toxicidade em relação às microalgas. É possível que este comportamento seja observado devido à presença do íon NO_3^{2-} na solução padrão de tório, servindo como nutriente para as microalgas. Há ainda a possibilidade de complexação do tório pelo EDTA presente no meio de cultura, tornando-o indisponível no meio. Neste caso, apenas nas altas concentrações de tório haveria radionuclídeos disponíveis para interagir com os microrganismos.

O software de contagem desenvolvido foi muito eficiente, impedindo erros de contagem e melhorando a exatidão dos resultados, principalmente em culturas com alta densidade de microrganismos. O uso do software torna dispensável a diluição das amostras, diminuindo a incerteza operacional. Apresentou também boa repetitividade de contagens, evidenciando a confiabilidade de sua utilização.

Alguns trabalhos futuros podem ser sugeridos, como:

- Investigar o mecanismo de interação de tório com espécies de microalgas;
- Estudar o efeito do tório no crescimento das espécies, utilizando solução padrão de cloreto de tório;
- Fazer a modelagem cinética da captação do tório pelas espécies;
- Estudar o equilíbrio do tório em condições de crescimento das espécies testadas;
- Fazer a modelagem do equilíbrio da captação do tório;
- Validar o software com o emprego de outras espécies microbianas;
- Validar o software com o emprego de outros elementos metálicos, estáveis e radioativos.

BIBLIOGRAFIA

ALENCAR, R. M. M.; NERY, R. M. C.; SILVA, E. P.; *et. al.*, 2007. Isolamento da Chlorophyceae Scenedesmus sp. *VI Jornada de ensino, pesquisa e extensao da UFRPE*. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. 3 pp.

ANDRÈS, Y.; MACCORDICK, H. J.; HUBERT, J. C., 1995. Selective biosorption of thorium ions by an immobilized mycobacterial biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.44, n.1, 271-276 pp.

BARKAY, T.; SCHAEFER, J., 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, n.3, 318-323 pp.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P., 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biothechnology*. Flórida, USA: Boca Raton.

BARSANTI, L.; CORTELLI, P.; EVANGELISTA, V.; *et. al.*, 2007. The World of Algae. In: NATO Public Diplomacy Division. *Algal Toxins: Nature, Ocurrence, Effect and Detection*. Pisa, Italy: Springer, p.398.

BHAINSA, K. C.; D'souza, S. F., 2009. Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, v.165, n.1-3, 670-676 pp.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R.M.T., 1970. *Algas de águas continentais brasileiras* São Paulo, SP - Brasil: USP. 228 pp.

BITTON, G., 2005. *Wastewater microbiology*. Hoboken, New Jersey - USA: A John Wiley & Sons, Inc., 765 pp.

CNEN., 2005. *Requisitos de Segurança e Proteção Radiológica para Instalações Mínero-Industriais NN 4.01*. Comissão Nacional de Energia Nuclear. D.O.U em 06/01/2005: 20 pp.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; ALFONSO, M., 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, v.37, n.18, 4311-4330 pp.

ESTEVES, F. A., 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência.

GORHAN, Pr, MCLACHLAN, J., HAMMER, U, *et. al.*, 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae* (Lingb.). *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie*, v.15, 769-780 pp.

GUILLARD, R. R. L.; SIERACKI, M. S., 2005 Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. In: *Algal Culturing Techniques*: Elsevier Academic Press, 239-252 pp.

KELLER, C., 1981. *Radioquímica*. Recife: Editora Universitária - Universidade Federal de Pernambuco. 348 pp.

LEE, R. E., 2008. *Phycology*: Cambridge University Press.

MALIK, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, v.30, n.2, 261-278 pp.

MARINI, C. B., 2009. *Toxicidade e bioacumulação de cobre em micro-organismos fotoautotróficos*. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, UERJ, Rio de Janeiro. 86 pp.

MARQUES, A. L.; DOS SANTOS, W.; GERALDO, L. P., 2004. Direct measurements of radon activity in water from various natural sources using nuclear track detectors. *Applied Radiation and Isotopes*, v.60, n.6, 801-804 pp.

NELSON, D. M.; BRAND, L. E., 1979. Cell-division periodicity in 13 species of marine-phytoplankton on a light-dark cycle. *Journal of Phycology*, v.15, n.1, 67-75 pp.

PICARDO, M. C.; FERREIRA, A. C.; COSTA, A. C., 2009. Continuous thorium biosorption - Dynamic study for critical bed depth determination in a fixed-bed reactor. *Bioresource Technology*, v.100, n.1, 208-210 pp.

RICHMOND, A., 2004. *Handbook of microalgal culture*. Canadá: Blackwell Science Ltda. 566 pp.

ROBERTS, P. E.; MATHER, J. P. 1998. *Introduction to cell and tissue culture : theory and technique*. South San Francisco, California: Plenum Press. 314 pp.

ROLLEMBERG, M. D. C. E.; VIDOTTI, C., 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, v.27, n.1, 7 pp.

SANTSCHI, P. H., MURRAY, J. W. *et al.*, 2006. Thorium speciation in seawater. *Marine Chemistry*, v.100, n.3-4, 250-268 pp.

SAR, P., KAZY, S. K.; D'SOUZA, S. F., 2004. Radionuclide remediation using a bacterial biosorbent. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.54, n.2-3, 193-202 pp.

SATOH, A.; VUDIKARIA, L. Q.; *et al.*, 2005. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environment International*, v.31, n.5, 713-722 pp.

SILVA, F. D., 2006. *Biorremocão de nitrogênio, fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico, através do uso de Chlorella vulgaris*. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis - SC - Brasil.

SIMONOFF, M.; SERGEANT, C.; *et al.*, 2007. Microorganisms and migration of radionuclides in environment. *Comptes Rendus Chimie*, v.10, n.10-11, 1092-1107 pp.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; *et. al.*, 2006. *Radioproteção e Dosimetria - Fundamentos*. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetria. 242 pp

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; *et. al.*, 2001. Limnologia e Gerenciamento integrado de Represas na América do Sul: Avanços recentes e novas perspectivas. *BID, IWRA, Brasil*, v.1.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, v.26, 26 pp.

VOLESKY, B., 1987. Biosorbents for metal recovery. *Trends in Biotechnology*, v.5, n.4, 96-101 pp.

VOLESKY, B., 2007. Biosorption and me. *Water Research*, v.41, 13 pp.

WON, S. W., CHOI, S. B.; YUN, Y., 2005. Interaction between protonated waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* and anionic dye Reactive Red 4. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.262, n.1-3, 175-180 pp.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)