

Ana Gabriela Itokazu Canzian da Silva

**Tolerância ao metal zinco e crescimento em diferentes pH em uma cepa de microalga (*Chlamydomonas* sp.)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Itokazu, Ana Gabriela

TOLERÂNCIA AO METAL ZINCO E CRESCIMENTO EM DIFERENTES  
pH EM UMA CEPA DE MICROALGA (*Chlamydomonas* sp.) / Ana  
Gabriela Itokazu ; orientador, Leonardo Rubi Rörig -  
Florianópolis, SC, 2015.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Microalgas. 3. pH. 4. Zinco.  
I. Rörig, Leonardo Rubi. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Ana Gabriela Itokazu Canzian da Silva

**TOLERÂNCIA AO METAL ZINCO E CRESCIMENTO EM DIFERENTES pH EM  
UMA CEPA DE MICROALGA (*Chlamydomonas* sp.)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 31 de Julho de 2015.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Dr. Leonardo Rubi Rörig

---

Dr. Paulo Antunes Horta

---

Msc. Maria Cecília Miotto

---

Msc. Pablo Gressler



Dedico este trabalho ao Marcelo e ao Felipe, quase tão pequenos quanto microalgas.



## AGRADECIMENTOS

Agradecerei sempre aos meus pais, Maria Cristina Itokazu e Nelson Canzian da Silva, por me ensinarem bem mais do que a cartilha manda, por nunca negarem carinho e pelas longas conversas sobre qualquer coisa. Se a gente reflete a influência de quem nos é mais próximo, sou genial.

Ao Rafael Bidese, que além de me dar uma família e um lar, me deu um porto seguro. Pelas noites mal dormidas, seja por causa de nenéns ou por causa de trabalhos da faculdade, pelas jantinhas agradáveis, e pelos passeios nem sempre desejados por ele, mas tão importantes pra mim.

À minha irmã, Maria Luíza Itokazu Canzian da Silva, por nunca me deixar ser mais do que sou, e por ser alguém que eu gostaria de ser.

Agradeço zilhões de vezes sem parar ao Leonardo Rubi Rörig, pai posição pra vida e orientador nos meus anos de iniciação. Por nunca desistir de mim, e por sempre me ajudar a buscar uma solução razoável. Pelas (muitas) noites mal dormidas, pelas madrugadas de coleta, e pelas dezenas de horas em meio a experimentos, análises e leituras. Pelas desorientações para orientar, e pelos conselhos. Desculpe a perda de cabelos por estresse!

À minha banca, Paulo Horta, muitas vezes co-orientador, amigo e colega de área; Pablo Gressler e Maria Cecília Miotto, pela ajuda sempre que preciso, e pelas conversas jogadas fora para espairar do trampo.

Aos meus queridos, Laura Freitas, Gustavo Flores e Tábata Burkhardt. Sem eles, nem os PPCCs, nem as filas do RU teriam sido toleráveis. Pelas risadas, pelas tardes no LABUFSC, e pelas comidinhas.

A quem me apresentou as algas, e a quem devo o amor que carrego comigo por essas bolinhas verdes, Roselane Laudares. Por aceitar uma aluna caída de paraquedas, pelas horas de microscópio, e pela amizade que perdura.

Aos colegas de lab e de perrengues, Pablo Gressler, João Vitor Heberle Lins, Luana Souza, Maria Cecília Miotto, e a todos que passaram ou ficaram pelo LAFIC durante esses anos que vivi lá. Pelas idas à Barra, pelas conversinhas no café, e pela ajuda acadêmica.

Aos “irrelevantes” (não tem muito o que explicar). Se a UFSC e o LAFIC foram minha segunda casa, os “irrelevantes” foram minha segunda família. Passei mais tempo com eles nos últimos anos do que com meus pais. E como eles, me ajudaram e me escutaram, sempre que preciso. A faculdade foi bem mais linda com eles.

Ao Hopchange, à Johns Hopkins University, e ao Programa Ciências sem Fronteiras, por me proporcionar um ano maravilhoso em Baltimore. Pelas jantas no Nolan's, pelas corridinhas no Rec Center, pelos cinemas no Rotunda. Por ser meu lar e família tão longe de casa. Paula Higasi, Lucas Monteiro, Lucas Levy, Maarten Sap, Artur Vaz, Claire McDonagh, Camélia Viallet, Chiaki Yamagami, Béatrice Leydier, Johannes Frey, thank you so so much. You'll always have a place to stay in Floripa, and in my heart.

À secretaria do curso, em especial à Aninha Moraes, por aturar a mim e a meus colegas, nossas perguntas estúpidas e inconveniências irritantes.

Ao Departamento de Botânica da UFSC e a todos os professores e alunos de lá que de algum modo fizeram parte dessa minha segunda casa.





*“Science is a way of thinking much more than is a body of knowledge”*

- Carl Sagan

*“Research is what I’m doing when I don’t know what I’m doing”*

- Wernher von Braun

*“You have come this far, don’t give up now”*

- Todo mundo

*“If the wind will not serve, take to the oars”*

- Provérbio Latino



## RESUMO

O carvão mineral foi amplamente utilizado no século passado e a sua extração ainda causa extensos impactos ambientais, como o devido à Drenagem Ácida de Mina (DAM), que atinge bacias hidrográficas inteiras, diminuindo o pH e elevando as concentrações de metais pesados. A necessidade de criar projetos com o objetivo de minimizar os danos causados pela DAM é clara e os estudos com organismos isolados do próprio ambiente atingido para uso como remediador são promissores. Como estes ambientes são altamente desfavoráveis, a biota é reduzida a poucos organismos e entre eles encontramos as microalgas. Microalgas têm grande potencial para uso biotecnológico em biorremediação de metais por serem uma opção natural de tratamento que pode ser produzida em larga escala e a baixo custo, e por não impor severas limitações com relação ao pH, à temperatura e mesmo à composição do meio, além de apresentar uma alta taxa de recuperação de metais da biomassa. Com o objetivo de conhecer melhor a fisiologia de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. isolada da área atingida por DAM em Santa Catarina, foram realizados testes de crescimento em diferentes pH e testes de tolerância ao metal zinco, além de análises do rendimento fotossintético, e análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão da alga exposta a uma concentração mediana do metal zinco. Os resultados demonstraram que esta cepa é acidofílica e acidotolerante, podendo viver em pH 2 a 9 com crescimento ótimo em pH 3,6 a 4. Além disso, a alga demonstrou uma alta tolerância ao metal zinco, com uma concentração mediana de 2.958,89  $\mu\text{M}$ . As análises de rendimento fotossintético e de Microscopia Eletrônica de Transmissão se mostraram insatisfatórias para quaisquer conclusões sobre as características analisadas. O estudo mais aprofundado desta cepa e de outras isoladas de áreas de mineração se faz importante devido ao potencial destes organismos para a biorremediação de locais impactados por DAM. Trabalhos que envolvam as características fisiológicas relacionadas a adsorção, absorção e metabolismo de metais pesados são particularmente interessantes e de grande valor para esta área.

**Palavras-chave:** *Chlamydomonas* sp.; Drenagem Ácida de Mina; Biorremediação;



## ABSTRACT

Coal was widely used in the last century and the environmental impacts of its extraction are still present, like those caused by Acid Mine Drainage (AMD) which may affect whole hydrographic basins by bringing the pH to lower values and increasing heavy metal concentrations. The need to create projects to minimize the damage caused by AMD is clear, and the studies using organisms isolated from the impacted environment for bioremediation are promising. This kind of environment is highly adverse to life, so there are just a few organisms, including microalgae. Microalgae have a great potential for biotechnological use in heavy metal bioremoval because they are a natural option and can be cheaply produced in abundance; it can operate in a wide range of physicochemical conditions regarding temperature, pH, and media composition, and it has a good rate of bound heavy metal recovery from the biomass. With the goal of learning more about a *Chlamydomonas* sp. strain isolated from a zone impacted by AMD in Santa Catarina – Brazil, growth tests in different pH and zinc tolerance tests were made, in addition to quantum yield analysis, and Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis with a median zinc concentration. The results show that this strain is acidophilic and acid tolerant, living in pH ranging from 2 to 9, with optimum growth in pH from 3,6 to 4. Moreover, the algae showed a high tolerance to zinc, with a median concentration of 2.958,89  $\mu\text{M}$ . The quantum yield and TEM analysis were unsatisfactory. The importance of more profound studies about this strain and others that can be found in those areas impacted by AMD for use in bioremoval is palpable. Studies that involve physiological characteristics related to heavy metal adsorption, absorption and metabolism are particularly interesting and valuable for this field.

**Key-words:** *Chlamydomonas* sp.; Acid Mine Drainage; Bioremediation;



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Local de coleta de Drenagem Ácida de Mina (DAM). Fotos superiores, localização da cidade de Criciúma e vista aérea do local. Foto inferior, lagoa ácida em que foi coletado material para análises ..... 25
- Figura 2.** Localização dos pontos de coleta para isolamento de algas localizados em duas lagoas de DAM no município de Siderópolis ..... 26
- Figura 3.** *Chlamydomonas* sp. isolada de áreas impactadas por rejeitos piritosos de carvão mineral na região de Criciúma – SC. A: fotomicrografia óptica; B: fotomicrografia eletrônica ..... 30
- Figura 4.** Taxa de crescimento por dia ( $\mu\text{.dia}^{-1}$ ) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)..... 38
- Figura 5.** Taxa de crescimento por dia ( $\mu\text{.dia}^{-1}$ ) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de contagem de células em câmara de Sedgewick-Rafter. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3)... 38
- Figura 6.** Resultados das médias da análise de clorofila extraída de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. submetida a tratamento com uma concentração mediana do metal zinco ( $CE_{50}$ ) nos tempos inicial, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Teste realizado em triplicatas..... 41
- Figura 7.** Micrografia eletrônica da *Chlamydomonas* sp. (A): controle , células não tratadas; (B): células tratadas com 4.000  $\mu\text{M}$  de zinco por 96 horas ..... 42
- Figura 8.** Eletromicrografias da *Chlamydomonas* sp. Coluna da esquerda, detalhes dos vacúolos; coluna da direita, detalhes dos tilacóides. (A) e (B): células não tratadas; (C) e (D): células tratadas com 4.000  $\mu\text{M}$  de zinco ..... 43
- Figura 9.** Eletromicrografias da *Chlamydomonas* sp. Coluna da esquerda, detalhes do pirenóide; coluna da direita, detalhes dos grãos de amido. (A) e (B): células não tratadas; (C) e (D): células tratadas com 4.000  $\mu\text{M}$  de zinco ..... 44





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração de metais em DAM e limites estabelecidos pela CONAMA 357/2005 para águas de classe II .....	24
<b>Tabela 2.</b> Resultados do teste de tolerância ao metal zinco com a espécie <i>Chlamydomonas</i> sp. (72h) pH ajustado para 3.6; Teste realizado em triplicata .....	39
<b>Tabela 3.</b> Comparação dos valores de CE <sub>50</sub> (Concentração Efetiva: concentração que inibe 50% da atividade fisiológica avaliada em relação ao controle) da cepa de <i>Chlamydomonas</i> sp. utilizada com outras microalgas após 72 e 96 horas de exposição ao zinco.....	40



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 O USO DO CARVÃO MINERAL E A MINERAÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA .....	22
1.2 IMPACTOS AMBIENTAIS, DAM E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE A MINERAÇÃO .....	23
1.3 MICROALGAS EM AMBIENTES IMPACTADOS POR DAM.....	27
1.4 O GÊNERO <i>Chlamydomonas</i> E A CEPA ISOLADA DE ÁREAS IMPACTADAS POR REJEITOS PIRITOSOS DE CARVÃO MINERAL .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	32
3.1 MANUTENÇÃO DA CEPA .....	32
3.2 EXPERIMENTO DE AFINIDADE AO pH DO MEIO .....	32
3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA/TOXICIDADE AO ZINCO .....	33
3.4 ANÁLISE DO RENDIMENTO FOTOSSINTÉTICO .....	34
3.5 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	35
3.6 TRATAMENTO DE DADOS .....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
4.1 EXPERIMENTO DE AFINIDADE AO pH DO MEIO .....	37
4.2 TOLERÂNCIA/TOXICIDADE DA MICROALGA AO ZINCO .....	39
4.3 ANÁLISE DO RENDIMENTO FOTOSSINTÉTICO .....	40
4.4 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	41
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
APÊNDICE I Composição das soluções estoque do meio ácido modificado M.A.E (pH 3.6)	56



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O USO DO CARVÃO MINERAL E A MINERAÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA

O carvão mineral é uma das mais importantes fontes de energia não-renováveis da humanidade. Uma das primeiras a ser utilizada em larga escala, foi um dos pilares da Primeira Revolução Industrial no século XVIII, com a aplicação na geração de vapor para movimentar as máquinas. No fim do século XIX, o carvão já era aproveitado para a produção de energia elétrica. Porém, com o avanço tecnológico, o carvão mineral foi perdendo espaço para outras fontes, como o petróleo e o gás natural. Entretanto, a partir da década de 70, com a crise do petróleo, observou-se uma tendência para o aumento do uso do carvão, dadas as grandes reservas mundiais [1].

No Brasil, as maiores reservas de carvão se localizam no sul, e o estado de Santa Catarina possui uma reserva de cerca de 1,4 bilhões de toneladas [2]. No fim do século XIX, a atividade carbonífera em Santa Catarina teve um início entusiasmado, caracterizado pela construção de ferrovias e pela exploração de minas por uma companhia britânica. Contudo, devido à baixa qualidade do carvão catarinense, os britânicos recuaram e o governo federal concedeu a exploração a indústrias cariocas. Durante a Primeira Guerra Mundial, com a redução nas importações de carvão, a produção de carvão mineral catarinense ganhou força. Com isso, novas ferrovias foram construídas e, entre os anos de 1917 e 1922, companhias mineradoras e carboníferas foram fundadas. A segunda ascensão da indústria carbonífera catarinense se deu durante o governo de Getúlio Vargas, com a obrigatoriedade do uso do carvão nacional em 1931 e com o início das operações da Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), em 1946. Na década seguinte, muitas minas de pequenos proprietários locais, grandes empreendedores cariocas e uma estatal (subsidiária da CSN) operavam na região. Na década de 60 mudanças muito significativas ocorreram e, já na década de 70, apenas 11 mineradoras estavam ativas e a maioria pertencia a empresários locais. Em 1973 aconteceu um boom na mineração com a crise do petróleo, mas no início da década de 90 houve uma

desregulamentação do setor pelo Governo Federal, o que deixou o sul de Santa Catarina em crise.

Recentemente, em 2000, o faturamento do setor carbonífero de Santa Catarina cresceu 55% em relação ao ano anterior, atingindo a marca de 50% do total da produção de carvão mineral no país. Desde então, o carvão representa uma boa parcela da produção mineral no sul do estado e apesar de estar perdendo aos poucos sua importância econômica, ainda tem grande impacto na economia catarinense.

Em 2012, foram explorados no estado de Santa Catarina 2.064.043 toneladas de carvão mineral, sendo que 95% da produção foi utilizada no setor energético [3].

## 1.2 IMPACTOS AMBIENTAIS, DAM E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE A MINERAÇÃO

O carvão mineral de Santa Catarina é considerado de baixa qualidade, pois apresenta altos teores de matéria mineral não combustível. Isso reduz o seu poder calorífico e libera muitos poluentes gasosos na combustão [4]. Nas usinas termelétricas, ocorre uma intensa liberação de gases estufa ( $\text{CO}_2$ ), além de outros gases oriundos da oxidação de frações minerais ( $\text{SO}_x$  e  $\text{NO}_x$ ). Estes gases, quando em contato com a umidade presente na atmosfera, produzem chuva ácida [5].

Já durante o beneficiamento,  $1,5 \text{ m}^3$  de efluentes ácidos são liberados e 30 a 60% do material minerado é refogado, sendo seu componente principal a pirita ( $\text{FeS}_2$ ) e a arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), os quais são depositados em áreas a céu aberto [6] [7]. A oxidação da pirita ocorre pelo próprio oxigênio atmosférico [8], podendo ser catalisada por bactérias quimiolitotróficas, como a *Thiobacillus ferroxidans* [9]. Esta reação gera ácido sulfúrico, que forma a Drenagem Ácida de Mina de Carvão (DAM) [10]. As águas contaminadas com DAM geralmente atingem um pH em torno de 2, mas podem chegar a valores negativos, como mostraram Nordstrom & Alpers [11]. Como consequência da acidificação das águas de drenagem e da percolação, ocorre a solubilização e a concentração de muitos metais com elevada toxicidade

[12] [13], atingindo bacias hidrográficas inteiras [14]. No sul de Santa Catarina, 786 km de rios estão contaminados por DAM [7].

As concentrações de metais em DAM [15] ultrapassam todos os limites estabelecidos pela Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente [16] para águas superficiais de Classe II. Em alguns casos, essa concentração é mais de 80 vezes maior do que limite (Tabela 1). A alta concentração de metais pesados tóxicos é mais preocupante do que a acidez para o ambiente, causando graves alterações tanto na qualidade da água quanto nas comunidades aquáticas [7] [17]. Como consequência desta contaminação, esses ambientes tornam-se severos e somente alguns poucos organismos tolerantes à acidez extrema (pH de 1 a 4) e à elevada concentração de metais pesados podem sobreviver [18]. Entre estes organismos predominam as bactérias, os fungos, e as microalgas.

Tabela 1. Concentração de metais em DAM e limites estabelecidos pela CONAMA 357/2005 para águas de classe II

Metal	Concentração em DAM (mg/L) (A)	Limite CONAMA (mg/L) (B)	A : B
Zinco	1,53	0,18	8.5
Cádmio	0,084	0,001	84
Níquel	0,142	0,025	5.68
Cromo	0,146	0,05	2.92

O local onde foram realizadas as coletas que geraram as análises dos metais em DAM no trabalho de Silva (2011) [15] pode ser visto na Figura 1, e o local das coletas de onde foi isolada a cepa utilizada no presente trabalho pode ser visto na Figura 2.



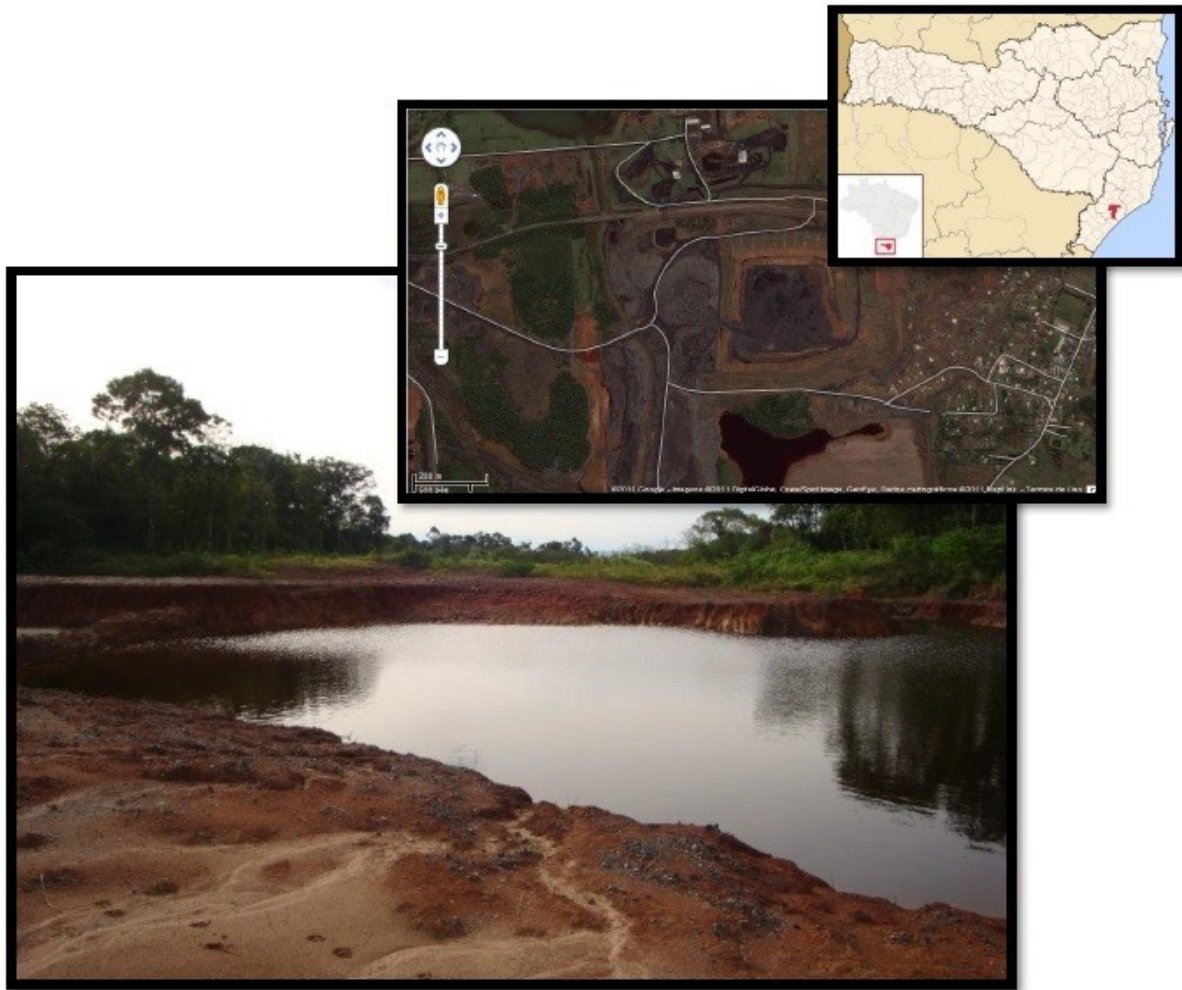


Figura 1. Local de coleta de Drenagem Ácida de Mina (DAM). Fotos superiores, localização da cidade de Criciúma e vista aérea do local. Foto inferior, lagoa ácida em que foi coletado material para análise. Modificado de Silva (2011) [15].



Figura 2. Localização dos pontos de coleta para isolamento de algas em duas lagoas de DAM no município de Siderópolis [64].

A necessidade da criação de projetos com o objetivo de minimizar os danos de DAM é clara [19]. Desde 1981, com a regulamentação da Política Nacional do Meio Ambiente, busca-se a responsabilização e a solução de danos ao meio ambiente causados pela exploração do carvão mineral [20]. Além disso, o CONAMA vem estabelecendo uma série de resoluções a respeito do setor, muitas vezes aumentando as restrições à atividade de mineração, já que a legislação ambiental brasileira é relativamente recente e conflitante com a legislação sobre a mineração, que carrega consigo o cenário do ano de 1967. Apesar dos esforços legislativos, a fiscalização e o licenciamento no âmbito estadual são extremamente deficientes, e não existe um número suficiente de profissionais competentes para suprir a demanda atual. Os órgãos federais para o licenciamento e fiscalização da atividade mineradora no Brasil são o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Estes são melhor estruturados quando comparados com os órgãos estaduais correspondentes, mas ainda há brechas nas leis [21]. A atividade do setor

minerador começou há muito tempo e os impactos gerados vêm se acumulando durante o último século; os danos persistem por muitos anos, mesmo após o fim dos depósitos minerais [22], o que leva a um grande empenho por parte da sociedade científica para buscar soluções mitigatórias.

### 1.3 MICROALGAS EM AMBIENTES IMPACTADOS POR DAM

O pH é um fator ambiental dos mais importantes em ecossistemas aquáticos, devido à sua grande influência na comunidade biótica, nos processos biogeoquímicos, no balanço de CO<sub>2</sub>, na solubilidade dos sais e na especiação geoquímica dos metais, determinando a biodisponibilidade dos mesmos no ambiente [7]. Em ambientes muito ácidos, o organismo precisa lidar com as altas concentrações de H<sup>+</sup> e uma das maiores dificuldades neste caso é manter a alcalinidade do citosol, pois várias enzimas são dependentes do pH podendo ser desnaturadas nestes baixos valores de pH. A manutenção do pH do citosol exige um alto gasto de energia para a superação do gradiente de prótons, o que pode significar um decréscimo da taxa fotossintética devido ao custo metabólico [23] [24].

A maioria dos ambientes ácidos contém concentrações relativamente baixas de carbono orgânico dissolvido [25], e a maioria do carbono inorgânico dissolvido se apresenta na forma de CO<sub>2</sub> [26], que é rapidamente consumido na fotossíntese. Nestes baixos níveis de pH, porém, o CO<sub>2</sub> é complementado pela atmosfera com rapidez [27]. Ainda assim, a produção primária depende de muitos outros fatores, como as concentrações de nutrientes e de fósforo, além da intensidade de luz [28].

Em ambientes impactados por DAM, os organismos têm de enfrentar as altas concentrações de metais tóxicos solúveis (Tabela 1). Apesar de muitos metais serem essenciais para a vida (e.g. sódio, potássio, cobre, zinco, cálcio, magnésio, ferro), quando em altas concentrações podem ser tóxicos [29]. Por exemplo, a alta concentração de ferro (Fe<sup>3+</sup>) muitas vezes leva à precipitação de hidróxido de ferro (Fe(OH)<sub>3</sub>), que forma um manto colorido e espesso (“*yellow boy*”) que bloqueia a luz solar e dificulta a fotossíntese, perturbando assim o ecossistema [30]. Outros metais, como o césio, o alumínio, o mercúrio e o chumbo, sequer possuem funções metabólicas essenciais conhecidas e têm potencial para causar sérios danos aos

organismos, mesmo em baixas concentrações [13] [32]. Os metais afetam muitos dos processos metabólicos essenciais das microalgas, através da desnaturação de proteínas, bloqueio de grupos funcionais, alterações estruturais em moléculas ativas, deslocamento de metais, e até na integridade das membranas organelares. As altas concentrações de metais levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) num intervalo de tempo intolerável, causando danos celulares sérios [30] [31]. Além disso, metais pesados reconhecidamente envenenam e inativam sistemas enzimáticos; por isso, muitos dos processos fisiológicos, e.g. a respiração, a síntese proteica e a fotossíntese, são severamente afetados diante de altas concentrações destes metais [29].

Organismos vivendo em ambientes atingidos por DAM têm de enfrentar todos estes problemas e por isso a diversidade biológica nestes locais é muito baixa [7] [13] [33] e dominada por organismos acidofílicos e acidotolerantes [34]. Microalgas acidofílicas são definidas por Norris & Johnson [35] como aquelas que possuem pH ótimo de crescimento menor ou igual a 3, podendo crescer até em pH 0. Microalgas acidotolerantes, por sua vez, são classificadas por Grimmer [36] como aquelas que podem crescer em pH tão baixo quanto pH 4, mas também vivem bem em pH neutro e fracamente alcalino. Ainda existem algumas inconsistências na abordagem da comunidade científica a respeito dos organismos acidofílicos/acidotolerantes, discutidas mais a frente.

Estudos de laboratório mostraram um aumento na produção de substância extracelular polimérica (EPS) por *Chlorococcum* sp. e *Phormidium* sp. como uma resposta ao aumento de cobre e zinco [59]. Na água do mar, verificou-se que *Nitzschia closterium complexa* cobre fora da membrana celular [60]. Entretanto, esse mecanismo não é universal: um estudo de *Oocystis nephrocytioides* indicou que a resistência ao cobre deveu-se à acumulação e sequestro desse metal nos tilacóides, sendo a adsorção superficial à célula menos importante [61]. Em suma, a habilidade que as microalgas têm de adsorver e metabolizar metais-traço está associada à sua grande razão superfície/volume, à presença de grupos sequestrantes de metais com alta afinidade em suas paredes celulares e à eficiente absorção e estocagem de metais a nível intracelular [62] [63].

#### 1.4 O GÊNERO *Chlamydomonas* E A CEPA ISOLADA DE ÁREAS IMPACTADAS POR REJEITOS PIRITOSOS DE CARVÃO MINERAL

O gênero *Chlamydomonas* é composto por algas unicelulares, com dois flagelos anteriores, um cloroplasto basal, um ou mais pirenóides tipicamente envoltos por amido e dois vacúolos contráteis [37].

A ocorrência de *Chlamydomonas* em ambientes ácidos é bastante conhecida. Por exemplo, em lagos ácidos de mineração, bem como em lagoas vulcânicas, locais caracterizados por altas concentrações de metais, é comum encontrar a *Chlamydomonas acidophila* [38] [39]. Gerloff-Elias *et al.* [40] trabalham com a possibilidade de que a explicação para a tolerância ao pH do gênero *Chlamydomonas* seja a capacidade de manter um pH intracelular neutro, mesmo quando exposta a valores extremos de pH.

Algumas espécies do gênero *Chlamydomonas* vêm sendo estudadas por Battah [41], Garbayo *et al.* [42], Aguilera & Amils [43], Tittel *et al.* [44] e Pawlik-Skowronska [45] com a finalidade de adicionar conhecimentos para o esclarecimento da resistência, do crescimento e do acúmulo de metais na fisiologia destes organismos.

A cepa de *Chlamydomonas* sp. usada neste trabalho (Figura 3) foi isolada de áreas impactadas por rejeitos piríticos de carvão mineral na região de Criciúma – SC por alunos do Laboratório de Ficologia Microscópica da Universidade Federal de Santa Catarina, e é mantida no cepário do laboratório em caráter permanente.

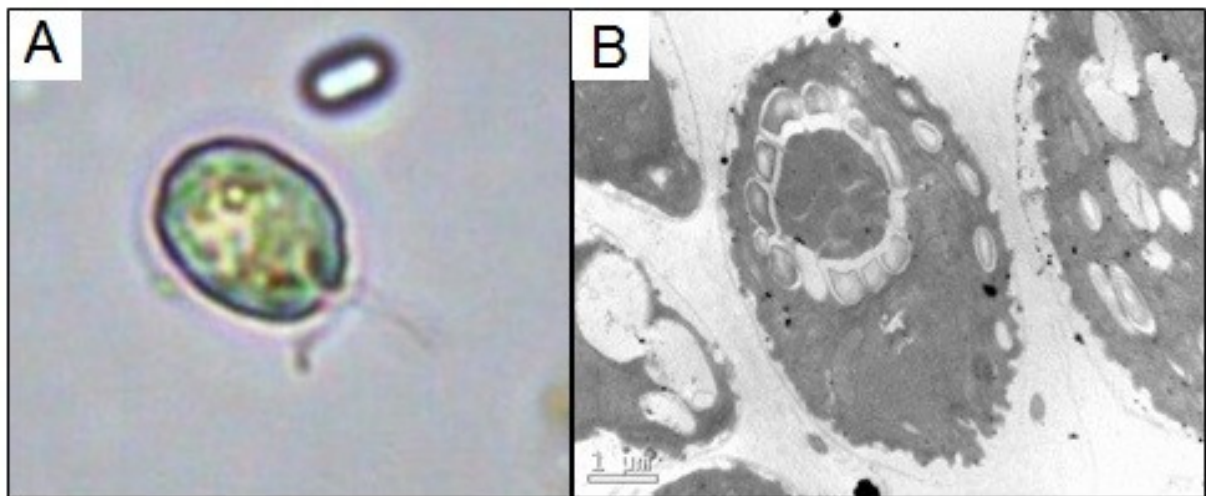


Figura 3. *Chlamydomonas* sp. isolada de áreas impactadas por rejeitos piritosos de carvão mineral na região de Criciúma – SC. A: fotomicrografia óptica; B: fotomicrografia eletrônica.

O potencial biotecnológico das microalgas em geral para a biorremoxão de metais pesados tem mérito principalmente pela grande quantidade de evidências geradas ao longo dos anos sobre a acumulação de metais pesados por estes organismos [46] [47]. Além disso, o uso de algas na biorremediação garante algumas vantagens sobre outros processos: utiliza biomateriais abundantes e naturais que podem ser produzidos em grande escala e a um baixo custo; possibilita o tratamento de grandes volumes de água devido à vantagem que estes organismos têm sobre outros por causa de uma relação superfície/volume favorável; apresenta alta seletividade em termos de remoção e armazenamento de metais pesados específicos; demonstra habilidade ao lidar com vários metais pesados ao mesmo tempo; mostra boa capacidade de operação em uma grande variação de temperatura, pH, e composição do meio; e apresenta uma alta taxa de recuperação de metais da biomassa [48].

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento disponível a respeito de aspectos da ecofisiologia de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. isolada de ambientes de Drenagem Ácida de Mina de carvão da região de Criciúma – SC.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o crescimento da cepa de *Chlamydomonas* sp. em diferentes pH.

Avaliar o crescimento da cepa de *Chlamydomonas* sp. em diferentes concentrações de zinco, e determinar CEO, CENO, e CE<sub>50</sub>.

Avaliar a eficiência fotossintética da cepa de *Chlamydomonas* sp. após exposição à uma concentração mediana (CE<sub>50</sub>) de zinco.

Investigar indivíduos da cepa de *Chlamydomonas* sp. em microscopia eletrônica de transmissão (MET) após exposição a uma concentração mediana de zinco.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa de *Chlamydomonas* utilizada no presente trabalho pertence ao Laboratório de Ficologia Microscópica do Departamento de Botânica na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O cultivo foi mantido em Meio Ácido para Euglenas (MAE), conforme Olavenson & Nalewajko [49] (Apêndice I), com pH 3,6, que é similar ao do ambiente onde foram isoladas (2,2 a 3,8). A manutenção por repiques foi realizada a cada 15 dias em média, com controle quanto à contaminação. Paralelamente aos cultivos líquidos, foram mantidas também reservas em MAE sólido, caso houvesse algum tipo de contaminação do cultivo líquido.

O cultivo foi mantido em condições controladas com fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 horas de escuro, temperatura de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  e irradiância de  $70 \mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  aproximadamente.

#### 3.2 EXPERIMENTO DE AFINIDADE AO pH DO MEIO

Com o propósito de compreender a afinidade da microalga ao pH, foi realizado um experimento em meio de cultura MAE. As categorias de pH analisadas no experimento foram 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, e 14, ajustados com Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e Hidróxido de Sódio (NaOH). O experimento consistiu em triplicatas de cada pH, usando como controle o meio MAE pH 3,6, por ser o meio de manutenção da alga. Foi inoculado 1 mL de cultivo saudável em cada frasco teste, com 220 mL de meio. Este experimento foi realizado em duas etapas: a primeira com os pH de 0 a 8 mais o controle, e a segunda com pH de 9 a 14 mais o controle, totalizando 51 frascos Erlenmeyer com capacidade de 300 mL.

Os frascos foram mantidos em agitador orbital sob iluminação de aproximadamente  $70 \mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A fim de evitar diferenças na recepção de luz, a



posição dos frascos foi randomizada a cada 24 horas. O programa utilizado para a randomização está disponível em [50].

As amostragens foram realizadas no tempo 0h, 72h, 96h, e 144h, com análise da densidade óptica com espectrofotometria (750 nm) e fixação com lugol para a contagem celular em câmara de Sedgewick-Rafter [51] para determinação da biomassa. As taxas de crescimento foram calculadas usando a equação de crescimento com logaritmo natural (Equação 1).

$$\mu = \frac{(\ln N_f - \ln N_o)}{T_f} \quad (1)$$

onde  $\mu$  é a taxa de crescimento celular,  $N_o$  é a fluorescência de clorofila-a inicial,  $N_f$  é a fluorescência de clorofila-a final e  $T_f$  é o tempo da medida final após o começo do teste.

### 3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA/TOXICIDADE AO ZINCO

Para avaliar o crescimento da cepa em diferentes níveis de zinco, foi realizado um teste de tolerância/toxicidade ao zinco no pH de manutenção (3,6). A alga foi submetida a diferentes concentrações de zinco definidas com base em pré-testes e dados da literatura para espécies similares, seguindo metodologia padrão de ensaio toxicológico [52].

Os frascos foram mantidos em agitador orbital sob iluminação de aproximadamente  $80 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . A fim de evitar diferenças na recepção de luz, a posição dos frascos foi randomizada a cada 24 horas. O programa utilizado para a randomização está disponível em [50].

As concentrações de zinco utilizadas foram 183,44  $\mu\text{M}$  (1); 366,89  $\mu\text{M}$  (2); 733,78  $\mu\text{M}$  (3); 1.467,56  $\mu\text{M}$  (4); 2.934,90  $\mu\text{M}$  (5); 5.869,70  $\mu\text{M}$  (6); e 7.337,80  $\mu\text{M}$  (7), obtidas a partir da dissolução de cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) no meio MAE de manutenção da alga. Foram feitas triplicatas de cada concentração do metal e como controle, as algas foram mantidas em meio de manutenção puro, totalizando 24

frascos Erlenmeyer com capacidade de 300 mL. Os inóculos foram de 1 mL de cultivo saudável para cada frasco contendo 220 mL de meio.

Para representar a tolerância da alga ao zinco, ou a toxicidade do zinco para esta alga, foram gerados os parâmetros CEO (Concentração de Efeito Observável: mínima concentração que gera efeito tóxico), CENO (Concentração de Efeito Não Observável: máxima concentração que não gera efeito tóxico) e a CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva: concentração que inibe 50% da atividade fisiológica avaliada em relação ao controle). A CE<sub>50</sub> foi calculada pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* [53].

### 3.4 ANÁLISE DO RENDIMENTO FOTOSSINTÉTICO

A fim de conhecer o rendimento fotossintético da *Chlamydomonas* sp. foram realizados testes no pH de manutenção da alga (3,6), com a concentração efetiva mediana (CE<sub>50</sub>) de zinco, definida nos testes descritos no item 3.3. O teste consistiu em dois grupos, o controle e o teste, com triplicatas para cada um, totalizando 6 frascos Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL. Cada frasco continha 500 mL de meio, e foram inoculados 20 mL de cultivo saudável. Os frascos foram colocados sob agitação em um agitador orbital, com condições de cultivo de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, temperatura de 20±2°C e irradiância uniforme de 50 μmolphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para este experimento, utilizou-se o equipamento Diving PAM (Fluorômetro de Pulso de Amplitude Modulada). Esse equipamento realiza a quantificação do sinal de fluorescência dos elétrons da clorofila-a do fotossistema II. Para realizar esta leitura, foram produzidas folhas artificiais com os cultivos dos frascos testes. Para isso, foram filtrados 50 mL de cultivo, com filtro GF/F 25 mm. Com a camada de células algais sobre o filtro de papel, simula-se uma folha vegetal, e a leitura pôde ser feita prendendo o sensor sobre o filtro em abrigo de luz. As folhas artificiais foram envoltas com papel alumínio e após cinco minutos de adaptação ao escuro foram feitas as leituras de fluorescência. As amostras foram submetidas a oito irradiâncias crescentes e os parâmetros escolhidos para a análise foram a taxa de transporte de elétrons relativo (ETR<sub>R</sub>), que dá uma indicação da fotossíntese global,

e o rendimento quântico efetivo (EQR,  $\Phi_{PSII}$ ), que é a capacidade de converter a energia luminosa em energia química.

Com os valores de  $F'_m$  e  $F_t$  pôde-se calcular o rendimento quântico efetivo do PSII (Equação 1).

$$\Phi_{PSII} = \frac{(F'_m - F_t)}{F_m} \quad (2)$$

onde  $\Phi_{PSII}$  é o rendimento quântico efetivo do fotossistema II,  $F'_m$  é fluorescência máxima em organismos adaptados a luz e  $F'$  é fluorescência transiente.

Os valores da taxa de transporte de elétrons foram representados como curvas de resposta à luz que obedecem a uma função exponencial representada por uma equação chamada *waiting-in-line*.

### 3.5 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Com a expectativa de verificar o destino e os efeitos dos metais na ultraestrutura das células da cepa, amostras da microalga foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As culturas-teste foram expostas por 96 horas à concentração de 4.000  $\mu\text{M}$  do metal zinco. As células foram recuperadas por centrifugação e fixadas em solução glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1% em refrigeração por duas horas. Depois de fixadas, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram lavados com tampão fosfato 0,1% e deixados em repouso por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. A lavagem se repetiu por mais duas vezes e uma solução de ágar a 2% foi adicionada aos *pellets* para facilitar a manipulação da amostra. O bloco formado pelo ágar permite que as amostras sejam removidas dos microtubos com facilidade e com totalidade. O excesso de ágar foi descartado e os blocos contendo a amostra foram colocados em novos tubos, onde foram pós-fixados com tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 2% e

mantidos em refrigeração por 24 horas. Após esse período, o  $\text{OsO}_4$  foi descartado e foram realizadas 2 lavagens com tampão fosfato e uma última com água destilada.

O passo seguinte foi a desidratação dos *pellets*, realizada com lavagens de solução de acetona em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) repetidas duas vezes, por 20 minutos em cada concentração. Uma vez desidratados, os *pellets* foram infiltrados em resina, através de tratamentos sucessivos com concentrações crescentes de resina diluída em acetona (acetona:resina – 3:1, 2:1, 1:1, 1:2) e por fim resina pura. Este processo de infiltração foi repetido duas vezes, com as amostras tratadas por 12 horas em cada concentração. Por fim, foi feita a polimerização dos *pellets* através de manutenção em resina pura por 24 horas. Esta metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular Vegetal, na Universidade Federal de Santa Catarina. Após esse processamento, as amostras puderam ser armazenadas para a realização de cortes em micrótomo e posterior análise em microscopia eletrônica. As imagens foram obtidas através de um Microscópio de Transmissão Eletrônica JEOL, com o apoio do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

### 3.6 TRATAMENTO DE DADOS

Os resultados dos diferentes testes de crescimento foram analisados em termos da comparação das taxas de crescimento com os controles através do software TOXSTAT 3.3. Para os testes paramétricos utilizou-se ANOVA, e teste Dunnett.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXPERIMENTO DE AFINIDADE AO pH DO MEIO

Com os dados obtidos através de espectrofotometria (750 nm) (Figura 4) e contagem celular (Figura 5) dos testes de afinidade da alga ao pH do meio, as taxas de crescimento demonstraram que esta cepa tem um incremento considerável na faixa de pH 1 a 8, com bom crescimento entre os pH 2 e 6, e crescimento máximo entre os pH 3 e 4. Como dito anteriormente, segundo Norris & Johnson [35] e Grimmer [36], para fins de classificação, microalgas que possuem pH ótimo de crescimento menor ou igual a 3 são ditas acidofílicas e as acidotolerantes são aquelas que podem crescer em pH tão baixo quanto 4, mas vivem em pH neutro e fracamente alcalino. Seckbach & Oren [54], por outro lado, preferem não manter um marco tão duro sobre os limites da classificação: “organismos que vivem na extremidade inferior da escala de pH são denominados acidófilos (...)”. Satyanarayana *et al.* [55] usa o relativismo para nomear os organismos, condicionando a classificação de um à classificação de outro, mas também deixa em aberto o uso de uma série de nomenclaturas diferentes para um mesmo organismo. No caso da cepa *Chlamydomonas* sp., usarei acidofílica e acidotolerante, devido ao seu crescimento num intervalo muito grande de pH, mas com uma predileção pela banda ácida.

A análise da turbidez em espectrofotometria para crescimento celular ficou comprometida nos pH 9, 10, 11, 12, 13 e 14, uma vez que em pH tão elevados os metais contidos no meio de cultura precipitam [13], causando uma turbidez esbranquiçada que gera erro na leitura. O erro de leitura pôde ser verificado através de leituras do meio puro, sem qualquer adição de inóculo algal. Além do erro de leitura, a ausência de crescimento algal foi comprovada pelos dados de contagem celular.

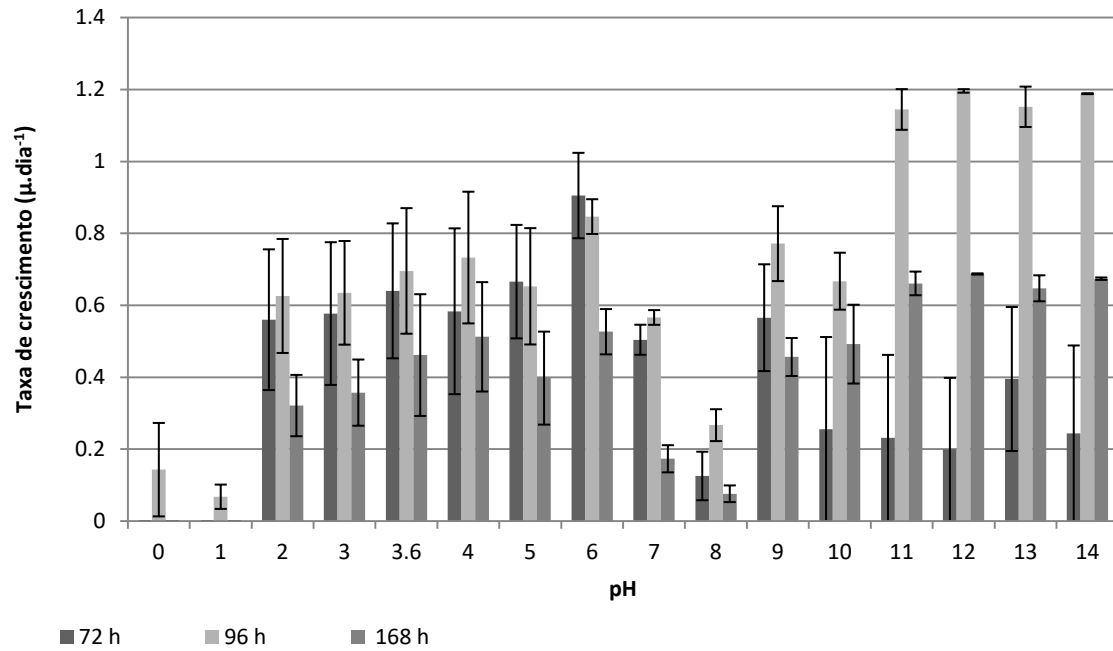


Figura 4. Taxa de crescimento por dia ( $\mu.\text{dia}^{-1}$ ) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

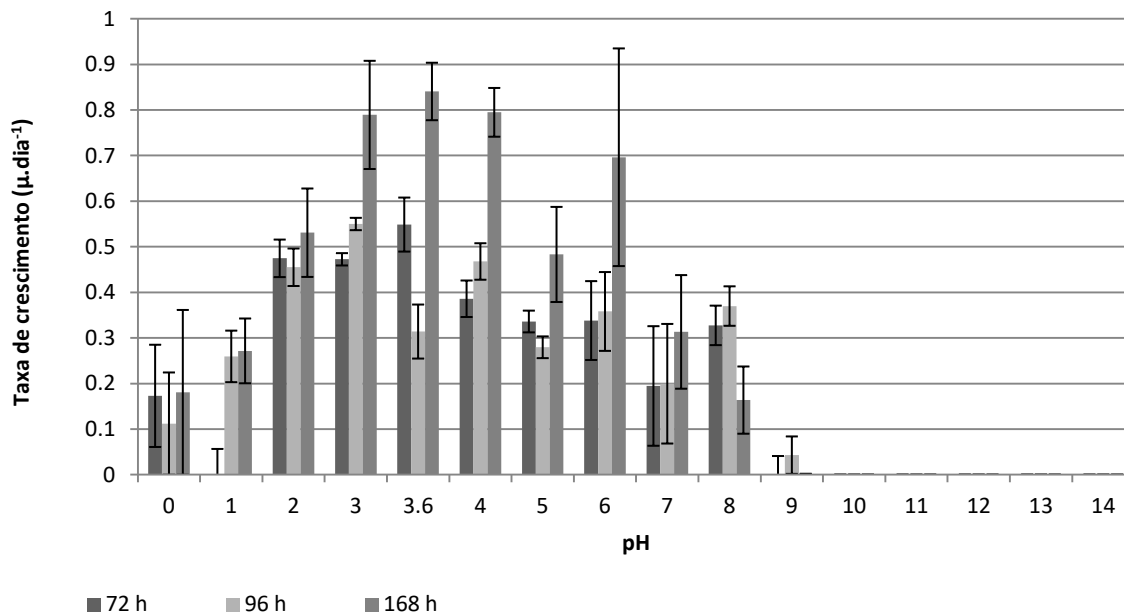


Figura 5. Taxa de crescimento por dia ( $\mu.\text{dia}^{-1}$ ) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de contagem de células em câmara de Sedgewick-Rafter. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3).

## 4.2 TOLERÂNCIA/TOXICIDADE DA MICROALGA AO ZINCO

As taxas de crescimento que resultaram do teste de tolerância/toxicidade da microalga *Chlamydomonas* sp. ao zinco encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do teste de tolerância ao metal zinco com a espécie *Chlamydomonas* sp. (72h) com pH ajustado para 3.6; Teste realizado em triplicata.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Taxa de crescimento (médias originais)	T - estatístico
0 (controle)	0,267	
183,44 (1)	0,333	-257
366,89 (2)	0,345	-2,410
733,78 (3)	0,311	-1,350
1.467,56 (4) #	0,279	-0,374
2.934,90 (5) @	0,134	4,166 *
5.869,70 (6)	0,005	8,175 *
7.337,80 (7)	0,002	8,269 *

\*: Taxas de crescimento significativamente menores em relação ao controle.

#: Valor de CENO (Concentração de Efeito Não Observável: máxima concentração que não gera efeito tóxico)

@: Valor de CEO (Concentração de Efeito Observável: mínima concentração que gera efeito tóxico)

Como mostra a tabela, o teste resultou numa CEO de 2.934,90  $\mu\text{M}$  e CENO de 1.467,56  $\mu\text{M}$ ; o valor de  $\text{CE}_{50}$  calculado pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* foi de 2.958,80  $\mu\text{M}$ , demonstrando que a espécie é muito tolerante ao metal zinco quando comparada a outras espécies de microalgas (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos valores de CE<sub>50</sub> (Concentração Efetiva: concentração que inibe 50% da atividade fisiológica avaliada em relação ao controle) da cepa de *Chlamydomonas* sp. utilizada com outras microalgas após 72 e 96 horas de exposição ao zinco.

	Organismo	CE <sub>50</sub> (µM)	Referências
	<i>Chlamydomonas</i> sp.	2.958,8	Presente estudo
72 horas de exposição	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	1160,0	Nishikawa & Tominaga, 2001 [38]
	<i>Chlorella kessleri</i>	14,0	Rojcková-Padtrová & Marsálec, 1999 [56]
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	4,9	Rojcková-Padtrová & Marsálec, 1999 [56]
96 horas de exposição	<i>Scenedesmus obliquus</i>	260	Monteiro <i>et al.</i> , 2010 [57]
	<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>	74,5	Monteiro <i>et al.</i> , 2010 [57]

#### 4.3 ANÁLISE DO RENDIMENTO FOTOSSINTÉTICO

A análise do rendimento fotossintético realizada com o auxílio do PAM não mostrou resultados satisfatórios. Os dados de ETR e EQR não apresentaram diferenças significativas entre tratamento e controle, nem entre os dias de incubação. Em condições de manutenção e nos outros experimentos contemplados neste trabalho, esta cepa apresenta um crescimento muito satisfatório em cinco dias, mas nesta etapa do projeto isso não foi observado. Além disso, ao longo dos dias de experimento, os sinais de fluorescência foram ficando mais fracos, e os dados perderam a confiabilidade. Sobre a fotossíntese em algas acidofílicas, de qualquer modo, Oesterhelt *et al.* [27] ressalta que é uma questão difícil de ser abordada e analisada de maneira geral, principalmente devido às baixas concentrações de carbono inorgânico dissolvido em ambientes de baixo pH.

As curvas de clorofila-a extraída (Figura 6) mostram crescimento nos cultivos do experimento. Nos tempos 0 horas, 24 horas e 48 horas percebem-se mudanças significativas na concentração de clorofila-a, mas nos tempos 72 horas e 96 horas não houve diferença entre controle e tratamento. Como evidenciam os dados de contagem celular, a diferença entre controle e tratamento não se deu em termos de taxa de crescimento, e sim na amplitude dos valores de clorofila-a. Os frascos de tratamento com zinco mostraram logo no tempo zero uma redução da concentração



de clorofila-a em relação ao controle, diferença que se manteve ao longo das 96 horas.

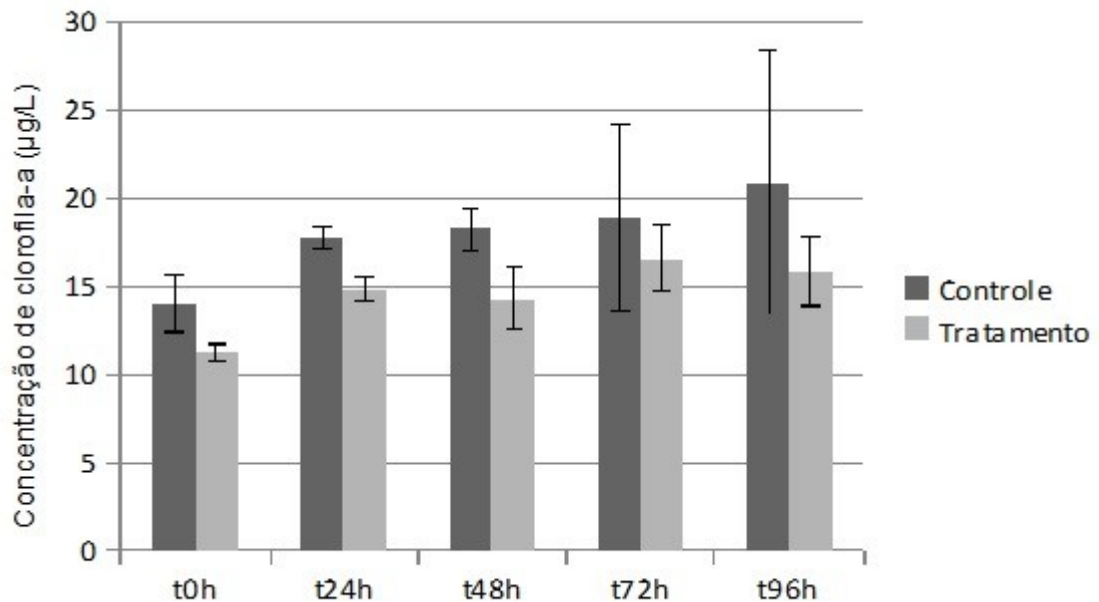


Figura 6. Resultados das médias da análise de clorofila extraída de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. submetida a tratamento com uma concentração mediana do metal zinco ( $CE_{50}$ ) nos tempos inicial, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Teste realizado em triplicatas.

#### 4.4 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica foram insatisfatórias para fins de análise a respeito do destino ou efeitos dos metais na estrutura celular da microalga. Um dos fatores que pode ter levado a este resultado foi a metodologia extensa e a inexperiência com vários procedimentos dentro do método. Além disso, existe um fator em relação aos cortes e às análises em MET que pode ser definido como casualidade ou chance. Nos cortes analisados no Laboratório de Microscopia Eletrônica não conseguimos encontrar nenhuma boa representação da estrutura celular de uma microalga. A concentração celular pode não ter sido alta o suficiente, ou, ainda, as algas não coincidiram com os cortes analisados.

A respeito das expectativas dos resultados nesta etapa do trabalho, Silva [15]

nos dá um bom parâmetro. O autor utilizou a mesma metodologia do presente estudo e os resultados (Figuras 7, 8, e 9) mostraram que os tratamentos com o metal apresentaram células consideravelmente maiores, com aproximadamente 9,0  $\mu\text{m}$  de comprimento por 6,5  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 7-B), em comparação com as células do controle, com 6,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, em média, e 4,0  $\mu\text{m}$  de largura, em média (Figura 7-A). Além disso, as células não tratadas apresentaram uma organização estrutural maior no citosol, comparadas às células tratadas com zinco.

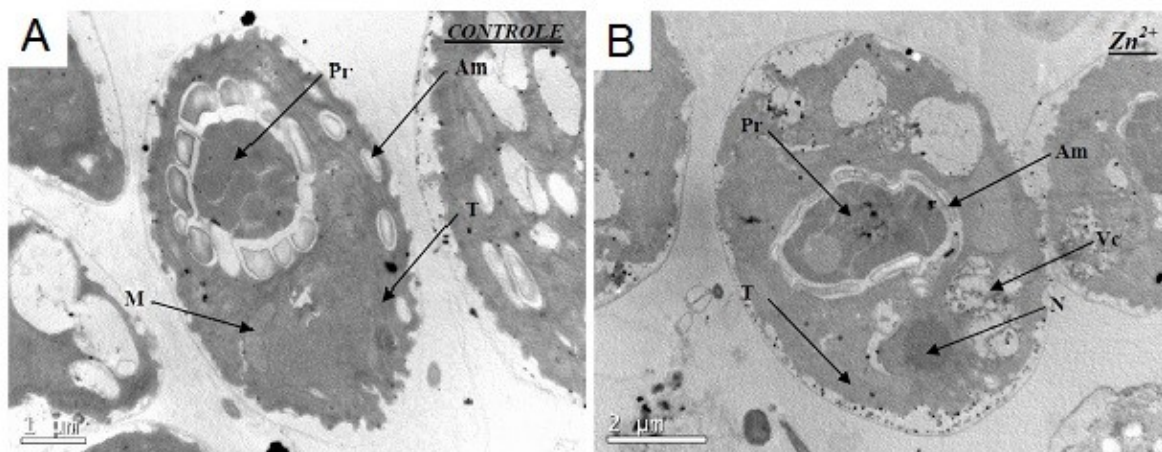


Figura 7. Micrografia eletrônica da *Chlamydomonas* sp. (A): controle, células não tratadas; (B): células tratadas com 4.000  $\mu\text{M}$  de zinco por 96 horas.

**Am:** amido; **M:** mitocôndria; **N:** núcleo; **Pr:** pirenóide; **T:** tilacóide; **Vc:** vacúolo; **Vs:** vilosidades. Modificado de Silva (2011) [15].

A Figura 8 mostra detalhes do pirenóide e grãos de amido em células do controle e do tratamento. As células do controle apresentam pirenóide rodeado por grãos de amido bem formados e alguns tilacóides atravessam estes grãos e adentram no pirenóide (Figura 8-A); os grãos de amido do cloroplasto são numerosos, bem formados e possuem tamanhos grandes (Figura 8-B). As células do tratamento com zinco apresentam pirenóides maiores e muitas vezes duplicados ou triplicados (Figura 8-C); foram vistos poucos e pequenos grãos de amido (Figura 8-D). Os grãos de amido são produtos de armazenamento temporário e se acumulam somente quando a fotossíntese é ativa na alga. Desta maneira, a ausência de amido nas células tratadas indica que os sistemas de defesa contra íons metálicos estão consumindo muita energia e o amido é degradado em açúcar para suprir a demanda de carbono no processo.

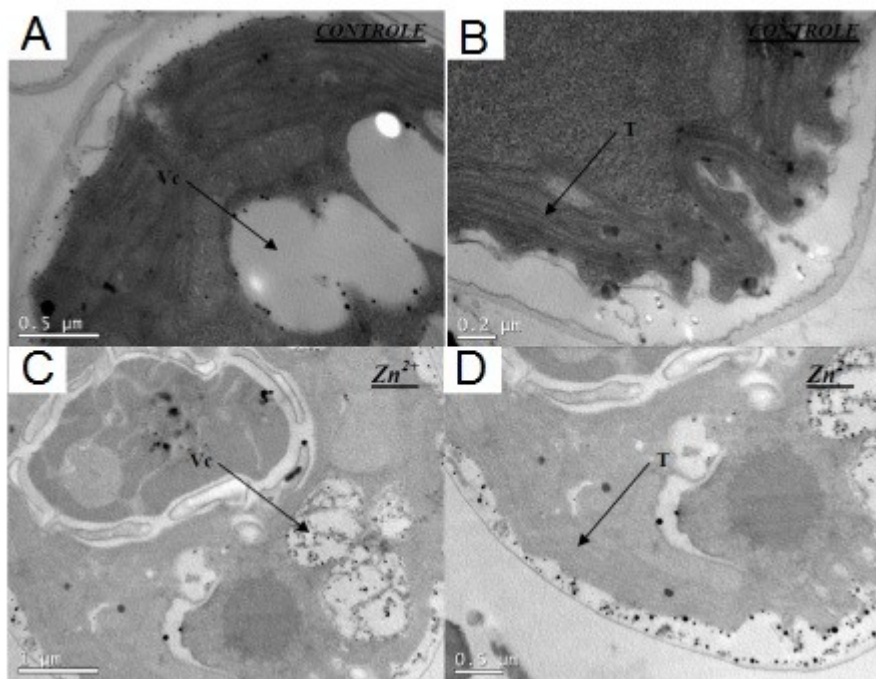


Figura 8. Eletromicrografias da *Chlamydomonas* sp. Coluna da esquerda, detalhes dos vacúolos; coluna da direita, detalhes dos tilacóides. (A) e (B): células não tratadas; (C) e (D): células tratadas com 4.000 μM de zinco.

**T:** tilacóide; **Vc:** vacúolo. Modificado de Silva (2011) [15].

Detalhes dos vacúolos e tilacóides podem ser vistos na Figura 9. Nas células do controle, os vacúolos, a parede celular e o citoplasma apresentaram algumas granulações escuras (Figura 9-A) e tilacóides saudáveis (Figura 9-B). As células tratadas com zinco apresentaram vacúolos repletos de grânulos e redes de pontuações pretas (Figura 9-C) e os tilacóides estavam bem preservados (Figura 9-D). A função dos vacúolos é armazenar metabólitos e substâncias tóxicas, e pôde-se perceber o aumento no número de vacúolos e nos produtos armazenados em seu interior, evidenciando o acúmulo do metal zinco. Nishikawa *et al.* [58] mostrou que estes depósitos possuem polifosfatos e que são estes polifosfatos que teriam a capacidade de se associar aos metais e acumulá-los e então proteger as células contra os seus efeitos tóxicos.

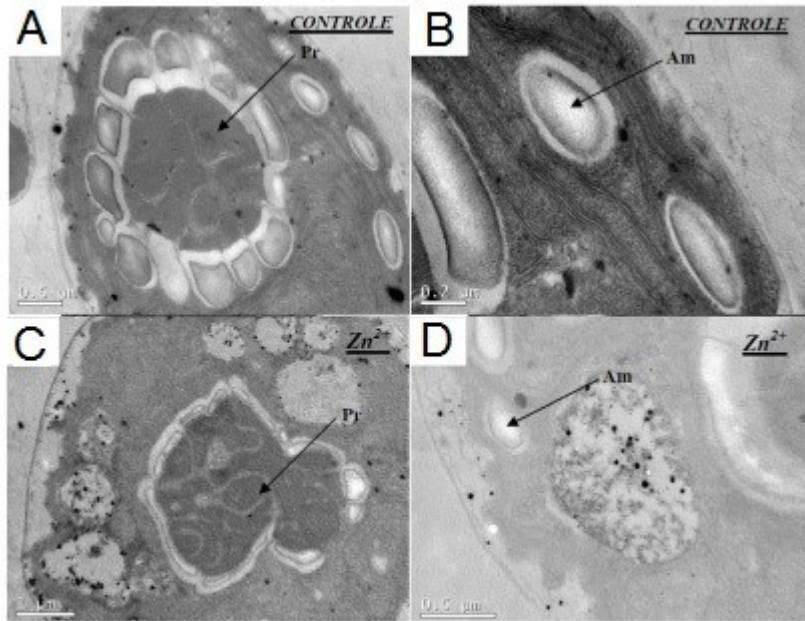


Figura 9. Eletromicrografias da *Chlamydomonas* sp. Coluna da esquerda, detalhes do pirenóide; coluna da direita, detalhes dos grãos de amido. (A) e (B): células não tratadas; (C) e (D): células tratadas com 4.000  $\mu\text{M}$  de zinco.

**Am:** amido; **Pr:** pirenóide. Modificado de Silva (2011) [15].

## 5 CONCLUSÕES

A cepa de *Chlamydomonas* sp. analisada apresentou crescimento em diferentes pH, variando de 1 a 8, entretanto, seu crescimento máximo foi observado nos pH entre 3 e 4, caracterizando-a como uma espécie acidofílica e acidotolerante.

A cepa estudada demonstrou grande tolerância ao metal zinco, com  $CE_{50}$  estabelecida em 2.958,80  $\mu\text{M}$ . A concentração de efeito observável equivale a 2.934,90  $\mu\text{M}$ , e a concentração de efeito não-observável a 1.467,56  $\mu\text{M}$ .

O fato de as algas crescerem em águas com características tão extremas em termos de metais tóxicos e acidez, apesar de não garantir o potencial da espécie para processos de biossorção, pelo menos indica uma grande tolerância a essas condições e a existência de importantes processos de detoxificação de metais e de manutenção do pH intracelular. O primeiro passo para se verificar o potencial para biossorção de metais é a elevada tolerância. Posteriormente, devem-se aprofundar os estudos fisiológicos para descobrir o destino dos metais a que as algas são expostas. A resistência de muitas algas aos impactos da DAM é em grande parte devida à sua habilidade em complexar metais fora das células, prevenindo a entrada no citoplasma.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos para aumentar o *pool* de conhecimentos básicos sobre a fisiologia desta microalga são necessários para se ter um bom quadro geral a fim de avaliar o potencial desta para a biorremediação de metais pesados de locais como as lagoas formadas por DAM. Entre os projetos relacionados à aquisição destes conhecimentos, podem ser citados: novos testes de rendimento fotossintético, com metodologias melhoradas, e com o uso de concentrações medianas de outros metais além do zinco (e.g. cádmio, chumbo, níquel); testes de toxicidade com outros metais, como cádmio, chumbo e níquel; testes multifatoriais com diferentes pH e concentrações de metais, como zinco e cádmio, para avaliar tanto o crescimento da alga em diferentes situações quanto para estabelecer hipóteses sobre os efeitos da especiação de metais sobre o crescimento das algas; testes de toxicidade e multifatoriais citados anteriormente com coletas para análise em MET, a fim de

avaliar o destino dos metais na fisiologia das algas, bem como se o processo envolve adsorção e/ou absorção de metais;

Apenas quando os aspectos da fisiologia da alga em relação aos metais estiverem claros será possível realizar testes em maior escala, a fim de utilizar este organismo como biotecnologia aplicada na biorremediação de áreas impactadas por Drenagem Ácida de Mina.

## REFERÊNCIAS

- [1] Brasil, Agência Nacional de Energia Elétrica. (2008). Atlas de energia elétrica do Brasil. 3. ed. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas3ed.pdf>>. Acesso em: 13 abr 2015.
- [2] Brasil, Ministério do Meio Ambiente. (2015). Carvão. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/energia/fontes-convencionais-de-energia/carvao>>. Acesso em: 13 abr 2015.
- [3] Brasil, Sindicato Indústria de Extração de Carvão do Estado de Santa Catarina (2015). Histórico do carvão em Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.satc.edu.br/siecesc/teste/historico.asp>>. Acesso em: 13 abr 2015.
- [4] Gaivizzo, L.B.; Vidor, C.; Tedesco, M.J. (2000). Recuperação de áreas utilizadas para depósitos de rejeitos de minas de carvão *In*: Centro de Ecologia/UFRGS. Carvão e meio ambiente. Porto Alegre. 21p.
- [5] Teixeira, E.C.; Feltes, S.; Santana, E.R.R. (2008). Estudo das emissões de fontes móveis na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Quim. Nova*, 31(2). 4p.
- [6] Silva, S.R.; Procópio, S.O.; Queiroz, T.F.N.; Dias, L.E. (2004). Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais traço e arsênio e revegetação local. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 28. 7p.
- [7] Schneider, H.C. (2006). Controle da Drenagem Ácida de Minas na Mineração de Carvão de Santa Catarina: Caso da Mina Um II – Verdinho. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 133p.
- [8] Singer, P.C.; Stumm, W. (1970). Acidic Mine Drainage: The Rate-Determining Step. *Science*, 167(3921). 2p.
- [9] Kontopoulos, A. (1998). Acid mine drainage control. *In*: Castro S.H.; Vergara, F; Sánchez, M.A. (eds). *Effluent treatment in the Mining Industry*. University of Concepción, Chile, 57(118).
- [10] Zancan-Filho, L.C.; Luca, S.J. (2000). Remoção por lixiviação de enxofre de carvões do RS como forma de atenuação nas emissões de SO<sub>2</sub>. *In*: Centro de Ecologia/UFRGS. Carvão e Meio Ambiente. Porto Alegre. 7p.

- [11] Nordstrom, D.K.; Alpers, C.N. (1999). Negative pH, efflorescent mineralogy and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 41. 5p.
- [12] Gomes, C.K. (2005). Caracterização de *Geitlerinema* UFV – E01 (Cianobactéria) e *Stigeoclonium* UFV – 02 (Chlorophyta) cultivadas em presença de arsênio. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 79p.
- [13] Naja, G.M.; Volesky, B. (2009). Metals in the Environment: Toxicity and Sources. *In: Wang, L.K.; Chen, J.P.; Hung, Y.T.; Shammass, N.K. (eds) Handbook on Heavy Metals in the Environment. Taylor & Francis CRC Press. 48p.*
- [14] Vassiliou, M; Dick, T. (2000). Metais tóxicos associados ao particulado atmosférico da região carbonífera do Baixo Jacuí, RS, Brasil. *In: Centro de Ecologia/UFRGS. Carvão e Meio Ambiente. Porto Alegre. 10p.*
- [15] Silva, M.V. (2011). Avaliação do potencial de uma microalga acidofílica quanto à biorremediação de metais traço em diferentes compartimentos ambientais. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. 97p.
- [16] Brasil, Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005). Resolução n 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 27 abr 2015.
- [17] Sheoran, A.S; Sheoran, V. (2006). Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical view. *Minerals Eng.*, 19. 11p.
- [18] Castro-Silva, M.A; Lima, A.O.S.;Gerchenski, A.V.; Jaques,D.B.;Rodrigues, A.L.;Souza, P.L.; Rörig, L.R. (2003). Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Braz. Jour. Microb.*, 34(1). 2p.
- [19] Ubaldo, M.O.; Souza, V.P. (2008). Controle e mitigação dos impactos da drenagem ácida em operações de mineração. Relatório Técnico elaborado pelo CETEM. 32p.
- [20] Nascimento, F.M.F.; Mendonça, R.M.G.; Macedo, M.I.F., Soares, P.S.M. (2002). Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina. Relatório Técnico elaborado pelo CETEM. 12p.



- [21] Farias, C.E.G. (2002). Mineração e Meio Ambiente no Brasil. Relatório preparado para o CGEE. 40p.
- [22] Barbosa, J.P.; Soares, P.S.M.; Borma, L.S.; Santos, M.D.C; Possa, M.V.; Trindade, R.B.E; Castilhos, Z.C.; Huyssteen, E.V.; Gomes, C.J.B.; Zancan, F.L.; França, L.C.G. (2001). Projeto conceitual para recuperação ambiental da bacia carbonífera sul catarinense. Relatório técnico elaborado pelo CETEM. 78p.
- [23] Gross, W. (2000). Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiol.* 433. 6p.
- [24] Gerloff-Elias, A.; Spijkerman, E.; Proschold, T. (2005). Effect of external pH on growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2,6). *Plant, Cell and Environment*, 28. 11p.
- [25] Johnson, D.B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27. 10p.
- [26] Stumm, W.; Morgan, J.J. (1970). *Aquatic chemistry*. 283p.
- [27] Oesterhelt, C.; Schmalzin, E.; Schmitt, J.M.; Lokstein, H. (2007). Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *The plant journal*, 51. 11p.
- [28] Harding, J.S.; Boothroyd, K.G. (2004). Impacts of mining. *In*: Harding, J.S.; Mosley, M.P.; Pearson, C.P.; Sorrell, B.K. (eds). *Freshwaters of New Zealand*. New Zealand Hydrological Society Inc. and New Zealand Limnological Society Inc., 36. 10p.
- [29] Rai, L.C.; Gaur, J.P.; Kumar, H.D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.*, 26(2). 52p.
- [30] Novis, P.; Harding, J.S.; (2007). Extreme acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. *In*: Seckbach, J. (ed). *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. J Springer, Netherlands. 23p.
- [31] Das, B.K.; Row, A.; Koschorreck, M.S.; Mandal, M.; Wendt-Potthoff, K.; Bhattacharya, J. (2009). Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Research*, 43. 11p.

- [32] Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156. 34p.
- [33] Niyogi, D.K.; Lewis, W.M.; McKnight, D.M. (2002). Effects of stress from mine drainage on diversity biomass and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems*, 5. 13p.
- [34] Valente, T.M.; Gomes, C.L. (2007). The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology*, 33(2). 11p.
- [35] Norris, P.R.; Johnson, D.B. (1998). Acidophilic microorganisms. *In: Horikoshi, K; Grant, W.D. (eds). Extremophiles: Microbial life in extreme environments. Wiley, NY. 21p.*
- [36] Grimmer, H. (2001). Acidophilic and acidotolerant algae. *In: Rai, L.C.; Gaur, J.P. (eds). Algal adaptation to environmental stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. Heidelberg. Springer Press. 31p.*
- [37] Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. (2007). *Biologia Vegetal*, 7 ed. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- [38] Nishikawa, K.; Tominaga, N. (2001). Isolation, growth, ultrastructure and metal tolerance of the green algae *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(12). 6p.
- [39] Spijkerman, E; Barua, D.; Gerloff-Elias, A; Kern, J; Gaedke, U.; Heckathorn, S.A.; (2007). Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles*, 11. 11p.
- [40] Gerloff-Elias, A.; Barua, D.; Mölich, A.; Spijkerman, E. (2006). Temperature and pH dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *Microbiological Ecology*, 56. 15p.
- [41] Battah, M.G. (2010). Impact of different concentrations of zinc and cadmium chloride on microalgae *Chroococcus minutus*. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 4(12). 4p.
- [42] Garbayo, I.; Dominguez, M.J.; Vigarà, J.; Veja, J.M. (2007). Effect of abiotic stress on *Chlamydomonas acidophila* viability. *In: Méndez-Vilas (ed). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Formatex. 4p.*

- [43] Aguilera, A.; Amils, R. (2005). Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic Toxicology*, 75. 13p.
- [44] Tittel, J.; Bissinger, V.; Gaedke, U.; & Kamjunke, N. (2005). Inorganic carbon limitation and mixotrophic growth in *Chlamydomonas* from an acidic mining lake. *Protist*, 156(10). 12p.
- [45] Pawlik-Skowronska, B. (2003). Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquatic Botany*, 75. 9p.
- [46] Maeda, S.; Skaguchi, T. (1990). Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. *In: Akatsuka, I. (ed) Introduction to Applied Phycology*. Academy publishing, The Hague. 37p.
- [47] Greene, B.; Beldell, G.W. (1990). Algal gelsor immobilized algae for metal recovery. *In: Akatsuka, I. (ed) Introduction to Applied Phycology*. Academy publishing, The Hague. 37p.
- [48] Wilde, E.W.; Benemann, J.R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11(4). 31p.
- [49] Olavenson, M.M.; Nalewajko, C. (2000). Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia*, 433. 17p.
- [50] Silva, N.C. (2011). Randomizador. Disponível em: <<http://www.fsc.ufsc.br/~canzian/random>>. Acesso em: 20 jun 2011.
- [51] UNESCO, Intergovernmental Oceanographic Commission. (2010). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. *In: Karlson, B; Cusack, C.; Bresnan, E. (eds). IOC Manuals and Guides n55*.
- [52] Knie, J.W.; Lopes, E.W.B. (2004). Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis. FATMA. 289p.
- [53] Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7). 5p.

- [54] Seckbach, J.; Oren, A. (2005). Introduction to the extremophiles. *In: Origins*. Springer Netherlands. 25p.
- [55] Satyanarayana, T.; Raghukumar, C.; Shivaki, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. 89(1). 12p.
- [56] Rojcková-Padrťová, R.; Marsálek, B. (1999). Selection and sensitivity comparisons of algal species or toxicity testing. *Chemosphere*, 38. 9p.
- [57] Monteiro, M.C.; Fonseca, S.C.; Castro, P.M.L.; Marcata, F.X. (2010). Toxicity of cadmium and zinc on two algae, *Scenedesmus obliquos* and *Desmodesmus pleiomorphus* from northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 22. 3p.
- [58] Nishikawa, K. Yamakoshi, Y.; Uemura, I; Tominaga, N. (2003). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 44. 6p.
- [59] García-Meza, J. V.; Barrangue, C.; Admiraal, W. (2005). Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(3) 8p.
- [60] Stuber, J.L.; Benning, R.J.; Hales, L.T.; Eriksen, R.; Nowak, B. (2000). Copper bioavailability and amelioration of toxicity in Macquarie Harbor, Tasmania, Australia. *Mar. Freshw. Res.*, 51. 10p.
- [61] Soldo, D.; Hari, R.; Sigg, L.; Behra, R. (2005). Tolerance of *Oocystis nephrocystioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquat. Toxicol.*, 71. 10p.
- [62] Gin, K.Y.; Tang, Y.; Aziz, M.A. (2001). Heavy metal uptake by algae. *In: Kojima, H.; Lee, Y.K. (eds) Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology*. Hong Kong Springer. 31p.
- [63] Rajamani, S.; Surasak, S.; Falcão, V; Torres, M.; Colepicolo, P.; Sayre, R. (2007). Phycoremediation of heavy metals using transgenic. *In: León, R.; Gaván, A.; Fernandez, E. (eds). Transgenic microalgae as Green Cell Factories*. Austin Springer & Landes Bioscience.
- [64] Philippi, V.P. (2014). Microalgas de drenagem ácida de mina de carvão de Santa Catarina – Brasil: levantamento florístico e parâmetros ecofisiológicos de uma

cepa isolada de *Chlamydomonas* sp. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 60p.



## APÊNDICE I

Composição das soluções estoque do meio ácido modificado M.A.E (pH 3.6) conforme Olavenson & Nalewajko [49].

<b>Solução Estoque</b>	<b>Preparo da Sol. Estoque</b>	<b>Volume (ml/L)</b>
1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 g/L	10 mL
2. CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1 g/L	10 mL
3. MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	50 g/L	10 mL
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/L	10 mL
5. NaCl	3 g/L	10 mL
6. Na <sub>2</sub> EDTA	20 g/L	0.5 mL
7. Metais Traços	Tabela abaixo	1 mL
8. FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	4.98 g/L	1 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1mL
9. Vitaminas F/2	Tabela abaixo	1 mL

### Composição da Solução de metais traços

<b>Componente</b>	<b>g/Litro</b>
1. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
2. MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81
3. ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.222
4. NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.390
5. CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.079
6. Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0494

### Composição da Solução de Vitaminas F/2

<b>Solução Estoque</b>	<b>Preparo da Sol. Estoque</b>	<b>/100ml</b>
1. Biotina	0.1 mg/mL	1mL/100mL
2. Vitamina B12	5mg/mL	0.1mL/100mL
3. Tiamina HCL		20mg/100mL