

Vivian Prá Philippi

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 submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal
Orientador: Prof. Dr. Leonardo R. Rörig

Florianópolis
2014

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

Philippi, Vivian Prá

Parâmetros ecofisiológicos de uma cepa de microalga acidofílica (*Chlamydomonas* sp.) isolada de águas de drenagem ácida de mina de carvão de Santa Catarina ? Brasil. / Vivian Prá Philippi ; orientador, Leonardo R. Röhrig - Florianópolis, SC, 2014.

40 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. *Chlamydomonas* sp.. 3. Drenagem ácida de mina. 4. Algas acidófilas. I. Röhrig, Leonardo R.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me norteia em todos os passos de minha vida, a minha família e ao Tiago apoio, força, incentivo e carinho. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelo uso irrestrito de suas dependências.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação, pelo conhecimento compartilhado durante o mestrado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação Priscila Martinhago Machado pelo auxílio e disponibilidade.

Ao meu orientador Leonardo pelo enorme aprendizado, apoio e carinho, nesta etapa de minha vida. Com ele percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto. Meus mais sinceros agradecimentos.

A minha sócia Keith que segurou as pontas da empresa quando necessário, que além de sócia é amiga e companheira.

A Sheila que muitas vezes era mais que secretária.

Aos colegas de laboratório e de risadas Pablo, Cecília, Elise, Rodrigo, Maevi e Dudu, já sinto saudades.

A indispensável Gabi, flor de pessoa, sempre disposta a mais umas horas de trabalho e parceria.

Agradeço de forma especial a Pati Chiossi, amiga fiel que esteve ao meu lado em momentos em que pensei em desistir, sempre dando apoio e força para continuar esta busca. Sem ela teria sido ainda mais difícil.

Não poderia deixar de agradecer algumas professoras que se tornaram especiais pelas palavras de confiança e motivação. Áurea, Roselane e Zenilda.

E a todos que me ajudaram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

A poluição da água causada pela drenagem ácida de mina (DAM) é, provavelmente, o impacto mais significativo na região sul do estado de Santa Catarina. A DAM é caracterizada pela alta acidez, alta concentração de metais pesados e deposição de óxidos metálicos. Nestas condições, a diversidade biológica é restrita e dominada por organismos acidófilos e ácido tolerantes. Apesar das condições físicas e químicas serem extremas, algumas algas crescem bem, podendo formar grandes biomassas nestes locais. Este trabalho teve como objetivo conhecer a composição da ficoflora e aspectos fisiológicos de *Chlamydomonas* sp. que ocorrem em duas DAM no município de Siderópolis/SC. A determinação taxonômica da ficoflora foi realizada através da observação das amostras em microscópio óptico e com auxílio de bibliográfica especializada. Para os estudos fisiológicos de *Chlamydomonas* sp., a cepa foi isolada e cultivadas em Meio Ácido para Euglenas (MAE). Foi determinada as taxas de crescimento da cepa em diferentes valores de pH, temperatura e concentrações de zinco. Foram identificados 22 táxons distribuídos em 13 gêneros. *Euglena mutabilis* e *Euglena* sp. foram dominantes e exclusivas do ponto DA-01, formando um biofilme sobre o substrato e *Klebsormidium* sp. e *Mougeotia* sp. foram dominantes e exclusivas do ponto amostral DA-02, formando densos tufos de filamentos. Com relação aos aspectos fisiológicos de *Chlamydomonas* sp., foi verificado que a cepa é capaz de crescer em valores de pH que vão do 2 ao 8 com crescimento ótimo em pH 3,6 caracterizando-a como uma espécie acidofílica; seu crescimento ótimo foi em 22°C e apresentou alta tolerância ao zinco. As taxas de crescimento da cepa foram semelhantes em diferentes concentrações de zinco e diferentes valores de pH, evidenciando uma adaptação ao ambiente de ocorrência da espécie que apresenta altas concentrações de metais.

Palavras-chave: Drenagem ácida de mina; Algas acidófilas; *Chlamydomonas* sp.

ABSTRACT

Water pollution caused by acidic mine drainage (AMD) is probably the most significant impact in the southern region of the state of Santa Catarina - Brazil. The AMD is characterized by high acidity, high concentration of heavy metals and deposition of metal oxides. In these conditions, biological diversity is restricted and dominated by acidophilic species. Although the physical and chemical conditions are extreme, some algae grow well and can form large biomasses in these environments. This study aimed to know the composition of the microalgal assemblages and to determine physiological aspects of *Chlamydomonas* sp. occurring in two AMD sites at the municipality of Siderópolis/SC. The taxonomic determination of microalgae was performed by qualitative analysis under an optical microscope using proper specialized literature. For the physiological studies a strain of *Chlamydomonas* sp. was isolated and cultured in Euglena Acidic Media (EAM), and growth rates of the strain under different pH, temperature and concentrations of zinc was determined. Taxonomic analysis showed 22 microalgal taxa distributed in 13 genera. *Euglena mutabilis* and *Euglena* sp. were dominant in one station (DA-01), forming a biofilm on the substrate and *Klebsormidium* sp. and *Mougeotia* sp. were in the other station (DA-02), forming dense tufts of filaments. Regarding the physiological aspects of *Chlamydomonas* sp., it was found that the strain is able to grow at pH values ranging from 2-8 with optimum growth at pH 3.6 characterizing it as an acidophilic species; its optimum growth was at 22°C and showed high tolerance to zinc. The growth rates of the strain were similar at different zinc concentrations and different pH values, indicating an adaptation to the extreme environment.

Keywords: Acidic mine drainage; acidophilic algae; *Chlamydomonas* sp.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A MINERAÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA	13
1.2	DRENAGEM ÁCIDA DE MINA.....	14
1.3	ALGAS EM AMBIENTES ÁCIDOS	17
1.4	O GÊNERO <i>Chlamydomonas</i>	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	ÁREA DE ESTUDO	20
3.2	LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA	20
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS	22
3.4	DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA DA FICOFLORA.....	23
3.5	ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>Chlamydomonas</i> sp.	23
3.6	TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	25
3.7	TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	27
3.8	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ZINCO EM DIFERENTES VALORES DE pH	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS	29
4.2	COMPOSIÇÃO DA FICOFLORA.....	29
4.3	TAXA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	33
4.4	TAXA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	36
4.5	TOLERÂNCIA AO ZINCO EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	37
	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
5	APÊNDICE	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MINERAÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Em Santa Catarina, o início das atividades carboníferas aconteceu no final do Século XIX, realizadas por uma companhia britânica que construiu uma ferrovia e explorava as minas. Em 1885 foi inaugurado o primeiro trecho da ferrovia Dona Tereza Cristina, ligando Lauro Müller ao Porto de Laguna, e chegando, em 1919, a São José de Crescúma (atual cidade de Criciúma). Como o carvão catarinense era considerado de baixa qualidade, sua exploração não despertou muito o interesse por parte dos ingleses. Diante desse quadro, o Governo Federal repassou a concessão para indústrias cariocas (SOCIESC, 2013).

As dificuldades de importação de carvão mineral durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918) aceleraram a busca deste minério no território nacional. Aliado a esse interesse, soma-se o rápido avanço científico e tecnológico que estava acontecendo no mundo, inclusive no Brasil, que partiu em busca do aperfeiçoamento de seu nascente parque industrial. Ferrovias foram construídas para escoar a produção cujo transporte em muitos locais era realizado em carros de bois (BELLOTI *et al.*, 2002).

Durante o Governo Federal Getúlio Vargas, com decreto determinando o consumo do carvão nacional e com a construção da Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), a obrigatoriedade da utilização do carvão nacional foi estabelecida em 10% em 1931, aumentando esta cota para 20% em 1940. A CSN foi construída em 1946. Já nos anos 40 e 50 várias minas operavam na região. Ao longo dos anos 60 ocorrem profundas mudanças no setor e, no início dos anos 70, estavam em atividade apenas 11 mineradoras, sendo a maioria pertencente a empresários locais. O último “boom” no setor foi com a crise do petróleo em 1973, com as atenções voltadas novamente para o uso do carvão nacional (SOCIESC, 2013).

Em 1990, o governo liberou as importações, e devido à qualidade inferior do carvão catarinense, com teores elevados de enxofre (2% a 4%) e cinzas (40% a 60%), o produto perdeu o mercado e a produção nacional de carvão metalúrgico foi paralisada, sendo mantida apenas a do carvão energético. Em 1991, o setor ressentia-se de uma queda na produção de 92% em relação a 1989 (1.006.000

toneladas) e aguardava a instalação de novas termelétricas para sua recuperação. Em 1997, após ampliação da Usina Jorge Lacerda IV, houve um aumento na produção de carvão beneficiado de 35% em relação ao ano anterior. Em 1998 a usina Jorge Lacerda IV, antes pertencente à Gerasul foi adquirida pelo Grupo Suez e renomeada em fevereiro de 2002 para Tractebel Energia S.A. (NASCIMENTO *et al.*, 2002).

Em 2012, foram produzidos no estado de Santa Catarina 2.064.043 toneladas de carvão mineral, sendo que 95% da produção foi utilizada no setor energético (SOCIESC, 2012).

O carvão extraído em minas a céu aberto ou subterrâneas é enviado a usinas de beneficiamento e gera 60% de resíduos sólidos e 1,5 m³ de efluentes ácidos para cada tonelada lavrada. Nos últimos 100 anos, as atividades de mineração desenvolvidas na Bacia Carbonífera Catarinense, resultaram cerca de 5.000 ha de superfícies impactadas (SCHNEIDER, 2006). Consequentemente, a qualidade ambiental do solo e corpos d'água influenciados pela carga de acidez e metais drenados foi seriamente comprometida.

De acordo com o resultado do Quarto Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais (GTA, 2010), a bacia do rio Araranguá apresenta 8% de trechos impactados com drenagem ácida em relação à extensão total da rede hidrográfica. A bacia hidrográfica do Urussanga que, proporcionalmente, apresenta o maior número de trechos impactados por drenagem ácida, correspondendo a 13 % em relação a extensão total dos rios. E a bacia do rio Tubarão é, proporcionalmente, a que apresenta o menor número de trechos (3 %) impactados com drenagem ácida em relação à extensão dos rios que formam a bacia.

1.2 DRENAGEM ÁCIDA DE MINA

Dentre as atividades potencialmente poluidoras dos recursos hídricos, estão aquelas relacionadas a mineração. Um dos impactos ambientais mais devastadores sobre os ecossistemas aquáticos é ocasionado pela drenagem ácida de minas (DAM). Neste caso específico, o impacto pode causar uma destruição irreversível do ecossistema aquático sendo que este tipo de poluição atinge a região carbonífera de Santa Catarina. A DAM é resultante da oxidação natural de minerais sulfetados (FeS₂) na presença de ar, de água e da ação de

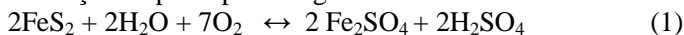
bactérias acidófilas, produzindo reações autocatalíticas, acidificação da água e dissolução de metais (JOHNSON, 1998; SHEORAN & SHEORAN, 2006). Esse fenômeno pode ocorrer tanto em minas subterrâneas como em minas a céu aberto, desativadas ou em operação bem como bota-fora de estéreis e rejeitos de carvão (JOHNSON & HALLBERG, 2005; SHEORAN & SHEORAN, 2006).

O carvão mineral é formado por carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e traços de outros elementos de diversos tipos de rochas que podem estar associados a sua matéria carbonosa. Para classificar fisicamente e reduzir as impurezas, o carvão mineral é submetido a uma sequência de operações chamada beneficiamento, de onde resultam o carvão de valor comercial e o estéril (incombusto), o qual apresenta-se intercalado a extratos de carvão. Os depósitos de rejeitos e pilhas de estéril podem ser fontes de contaminação, principalmente quando esses rejeitos contêm minerais sulfetados como a pirita (FeS_2) e arsenopirita (FeAsS) (SILVA *et al.*, 2004; SCHNEIDER, 2006).

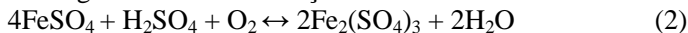
Os minerais sulfetados, quando em contato com a água, com o oxigênio atmosférico e com algumas bactérias como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sofrem oxidação reduzindo o pH da água, e consequentemente aumentando a solubilidade dos metais tóxicos. Esse processo é chamado de drenagem ácida e esta água é caracterizada por alto teor de ferro, alumínio e ácido sulfúrico, decorrentes da percolação da água da chuva através dos rejeitos gerados pelas atividades de mineração (NAJA & VOLESKY, 2009).

De acordo com Naja & Volesky (2009), o princípio da geração de drenagem ácida ocorre de acordo com as seguintes etapas:

Oxidação da pirita pelo oxigênio:

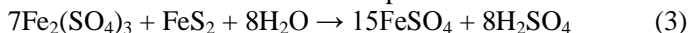


Em seguida ocorre a oxidação do íon ferroso a íon férrico:



Em pH 3,5, a oxidação do ferro é catalisada pela bactéria oxidante de ferro *Acidithiobacillus ferrooxidans*, e na faixa de pH 3,5-4,5, pode ser catalisada por uma variedade de *Metallogenium*, uma bactéria filamentosa oxidante de ferro.

O íon férrico dissolve ainda mais pirita:



que em conjunto com a reação 2 consiste em um ciclo para a dissolução da pirita. Com valores de pH muito acima de 3, o ferro (III) precipita como o óxido de ferro hidratado (III):



O ciclo permanece até que toda pirita acessível pelos agentes de reação tenha sido consumida através de reações que resultam no caráter ácido do meio, levando conseqüentemente ao aumento da solubilização de metais pesados como ferro, alumínio, cobre, chumbo, cromo, manganês, mercúrio, níquel e zinco (SCHNEIDER, 2006). Os locais contaminados por DAM são muitas vezes cobertos por um depósito amorfo de coloração alaranjada formada por $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (Figura 1).



Figura 1. Óxido de ferro precipitado (setas indicativas) em drenagem ácida de mina no município de Siderópolis/SC.

Altas concentrações de metais dissolvidos, incluindo zinco, são frequentemente encontrados em DAM (NIYOGI *et al.*, 2002) sendo que a elevada concentração de metais tóxicos é mais preocupante do que a acidez em termos de danos ambientais. O zinco é um elemento essencial para o funcionamento normal dos sistemas de enzimas em algas. No entanto, pode ser tóxicos quando as algas estão expostas a concentrações superiores às necessárias para um crescimento ótimo. O zinco pode perturbar a fotossíntese, a respiração, a produção de ATP e a síntese de pigmentos, assim como inibir a divisão celular (STAUBER & FLORENCE, 1990).

A dissolução de metais em DAM e a lixiviação para os aquíferos causam alterações tanto na qualidade da água quanto nas comunidades aquáticas (SCHNEIDER, 2006; SHEORAN & SHEORAN 2006). Além disso, as fontes de drenagem ácida podem permanecer ativas por décadas ou séculos até mesmo após o fechamento da mina. Em tal ambiente extremo, somente um pequeno número de espécies é capaz de

sobreviver e conseqüentemente uma baixa diversidade de organismos é encontrada (SCHNEIDER, 2006; NAJA & VOLESKY, 2009; NIYOGI *et al.*, 2002).

Sendo assim, a DAM forma um ecossistema estruturalmente simples, dominado por organismos acidofílicos e ácido tolerantes (VALENTE & GOMES 2007), ou seja, eles não somente toleram essas condições extremas como as exigem para sua sobrevivência (RAMPELOTTO, 2010).

1.3 ALGAS EM AMBIENTES ÁCIDOS

Habitats extremamente ácidos provenientes de fontes antropogênicas estão associadas com uma enorme carga de metais pesados, sendo que as drenagens ácidas de mina são responsáveis pela maior parte dos habitats extremamente ácidos em todo o mundo. Estes locais contêm concentrações relativamente baixas de carbono orgânico dissolvido, sendo também caracterizados como oligotróficos (JOHNSON, 1998).

Os organismos que habitam áreas impactadas por DAM, precisam enfrentar as elevadas concentrações de metais tóxicos solúveis nesses ambientes. Muitos metais são essenciais para a vida, como por exemplo, o cobre e o zinco, mas também podem se tornar tóxicos em altas concentrações (RAI *et al.*, 1981). Uma característica de toxicidade de metais é a intoxicação e inativação de sistemas enzimáticos. Muitos dos processos fisiológicos e bioquímicos, ou seja, a fotossíntese, respiração, síntese de proteínas e síntese de clorofila, entre outros, são severamente afetados em altas concentrações de metais (RAI *et al.*, 1981). Acredita-se que a resistência de muitas algas a DAM se deva à sua capacidade de manter metais complexos fora das células, prevenindo a sua entrada no citoplasma (NOVIS & HARDING, 2007).

Além disso, a escassez de invertebrados bentônicos de pastagem e, geralmente, a ausência total de peixes, lagostas e outros herbívoros bentônicos pode permitir o desenvolvimento de alta biomassa de algas, apesar de as taxas de crescimento serem lentas devido a baixa concentração de nutrientes e contaminantes tóxicos (HARDING & BOOTHROYD, 2004).

A identificação de algas existentes em recursos hídricos acidificados pela mineração e nas próprias drenagens, tem sido alvo de estudos em diversas regiões do mundo, destacam-se os trabalhos de

Sabater *et al.* (2003) e López-Archilla *et al.* (2000) no rio Tinto (Espanha); Stevens *et al.* (2001) (EUA); Lessmann *et al.*, (2000) e Kapfer (1998) em lagos de minas a céu aberto na Alemanha; Bray (2007) em ambientes com diversos graus de impacto na Nova Zelândia. No Brasil, Freitas (2010) estudou 12 ambientes aquáticos impactados por DAM na bacia Carbonífera de Santa Catarina, onde identificou apenas 5 gêneros, sendo que no Brasil ainda pouco se sabe sobre a ecologia e fisiologia da ficoflora existente nestes locais.

1.4 O GÊNERO *Chlamydomonas*

O gênero *Chlamydomonas* é composto por organismos unicelulares biflagelados que podem ser facilmente cultivados e manipulados em cultura. As células têm geralmente um cloroplasto basal e pirenóide central. Existem dois vacúolos contráteis na base dos flagelos, e que podem, ou não, ter um ocelo anterior no cloroplasto (LEE, 2008). A ocorrência do gênero em locais afetados por DAM é conhecida e apresenta uma taxa de crescimento muito superior quando comparado a outras espécies de microalgas acidofílicas. Uma vantagem metabólica é a capacidade de produzir enzimas fosfatases que é uma adaptação a situações em que os nutrientes são limitados (NIXDORF *et al.*, 1998).

A ocorrência da *Chlamydomonas* em ambientes ácidos é bastante conhecida. Um exemplo é a *Chlamydomonas acidophila*, uma espécie dominante em lagos ácidos de mineração, bem como lagoas vulcânicas. Além da acidez, estes locais são caracterizados por altas concentrações de metais, principalmente ferro e zinco (NISHIKAWA & TOMINAGA, 2001).

Devido a estas características, algumas espécies do gênero *Chlamydomonas* têm sido estudadas com objetivo de esclarecer a resistência, o crescimento e o acúmulo de metais por estes organismos (AGUILERA & AMILS, 2005; BOAVIDA & HEATH 1986; GARBAYO *et al.*, 2007; GARBAYO *et al.*, 2008; TITTEL *et al.*, 2005; SPIJKERMAN *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer a composição da ficoflora e aspectos da ecofisiologia de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. isolada em drenagem ácida de mina localizadas no município de Siderópolis/SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer a composição da ficoflora nos pontos de drenagem ácida de mina estudados.
- Verificar as taxas de crescimento da cepa de *Chlamydomonas* sp. em diferentes concentrações de zinco.
- Determinar as taxas de crescimento da cepa estudada em diferentes temperaturas.
- Determinar as taxas de crescimento da cepa de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo está inserida na Bacia Carbonífera de Santa Catarina que se localiza a sudeste do estado, entre a Serra Geral a Oeste e o maciço granítico a Leste. É constituída pelas bacias hidrográficas do rio Tubarão, rio Araranguá e rio Urussanga. A Bacia possui um comprimento conhecido de 95 km e uma largura média de 20 km, compreendida na área delimitada pelas coordenadas 28° 11' a 29° 03' de latitude sul e 49° 10' a 49° 37' de longitude oeste (CETEM, 2000). O clima é subtropical úmido com verão quente (Cfa), pela classificação de Köppen. A precipitação total média é 1600mm, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com totais mensais variando de 80 mm a 200 mm. A temperatura média anual é 19°C, sendo que médias mensais variam de 15°C no inverno e 24°C no verão (EPAGRI, 2013).

3.2 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

Para a identificação de microalgas e isolamento da cepa estudada, foram definidos 2 pontos de coleta (Tabela 1) em duas áreas de DAM diferentes, ambas localizadas no município de Siderópolis/SC (Figura 2). O ponto DA-01 (Figura 3) está localizado onde o rejeito de mina foi aterrado, em área de recuperação ambiental e o ponto DA-02 está localizado em uma drenagem de mina subterrânea abandonada (Figura 4).

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta em duas DAM localizadas no município de Siderópolis/SC.

Ponto	Latitude	Longitude	Altitude (m)
DA-01	28° 37.373' S	49° 23.871' O	43
DA-02	28° 37.108' S	49° 23.670' O	123

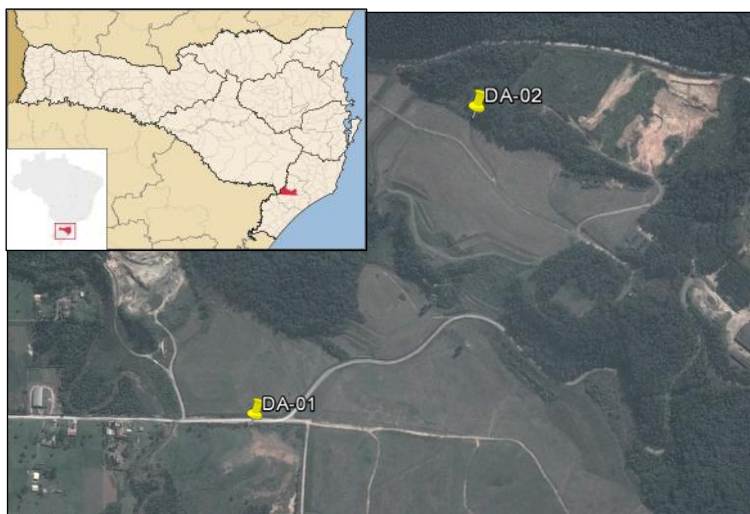


Figura 2. Localização dos pontos de coleta localizados em duas drenagens ácida de mina no município de Siderópolis, SC (Fonte: Google Earth).



Figura 3. Ponto de coleta DA-01, localizado em área de rejeito de mina aterrado em área recuperada no município de Siderópolis, SC.



Figura 4. Ponto de coleta DA-02, localizado em área de drenagem de uma mina subterrânea abandonada no município de Siderópolis, SC.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Para a caracterização da comunidade microalgal e isolamento da cepa estudada, a coleta foi realizada em uma única ocasião no mês de novembro de 2011. Amostras foram coletadas em 5 locais no sedimento de cada ponto amostral com o auxílio de espátulas e pipetas Pasteur (Figura 5) e divididas em duas sub-amostras. Uma das sub-amostras foi adicionada juntamente com água do local em frascos de cultura de 15ml mantido em isopor com gelo até o processamento em laboratório e a outra foi fixada com formol a 4 % e armazenada em frasco de polietileno de 400 ml.

A temperatura da água, oxigênio dissolvido e pH foram medidos *in loco* com o auxílio de um pHmetro Orion Star A111.



Figura 5. Amostragem das microalgas localizadas no sedimento com o auxílio de pipetas Pasteur

3.4 DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA DA FICOFLORA

A identificação taxonômica da ficoflora foi realizada em microscópio óptico Olympus CX31, em aumento máximo de 1000X. Para a identificação das diatomáceas, as amostras foram lavadas e oxidadas com permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido clorídrico (HCl) segundo a técnica de Simonsen (1974). Posteriormente foram confeccionadas lâminas permanentes utilizando Naprax como meio de inclusão.

A determinação taxonômica foi realizada ao menor nível taxonômico possível, com o auxílio das obras de Round *et al.* (1990), Krammer & Lange-Bertalot (1986; 1988; 1991a; 1991b), Bicudo & Menezes (2006), Bourrelly (1972), entre outros.

3.5 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *Chlamydomonas* sp.

Em laboratório, as amostras vivas foram imediatamente inoculadas em Meio Ácido para Euglenas (MAE; Apêndice 1) (OLAVENSON & NALEWAJKO, 2000), que é seletivo para espécies acidofílicas. O pH do meio foi ajustado ao pH do local da coleta. Inoculou-se 1ml das amostras em 100ml de meio contidos em frascos erlenmeyer de 250ml esterilizados, em seguida, os meios com inóculo foram incubados e mantidos no cepário do Laboratório de Ficologia - Microalgas da UFSC (LAFIC) (Figura 6), com irradiância de

aproximadamente $50\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 6. Cepário do Laboratório de Ficologia - Microalgas (UFSC) onde as amostras coletadas nos pontos estudados foram mantidas.

Os repiques dos cultivos mistos assim gerados foram realizados semanalmente transferindo alíquotas de 1ml do concentrado algal para novos frascos erlenmeyer de 250ml com 100ml de meio MAE esterilizado. A partir desse concentrado algal, foi realizado o isolamento da espécie mais abundante, sendo esta, *Chlamydomonas* sp. (Figura 7), sob microscópio óptico invertido marca Olympus, modelo BX-41 com uma pipeta Pasteur capilar acoplada a mangueira de silicone, pelo método de sucção (Figura 8).

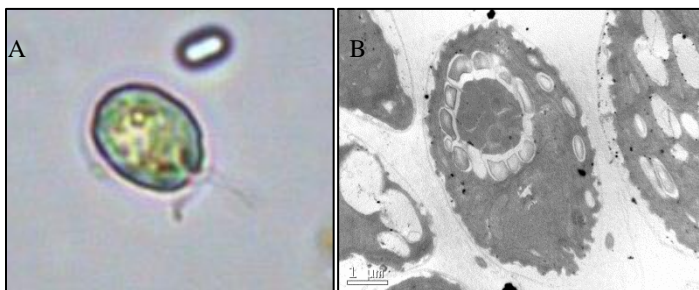


Figura 7. *Chlamydomonas* sp. isolada de um ponto de drenagem ácida de mina no município de Siderópolis/SC. A: fotomicrografia óptica (1000X); B: fotomicrografia eletrônica.

As células isoladas foram repassadas para algumas gotas de meio MAE estéril, procedendo-se assim por diversas vezes até garantir o isolamento de uma única célula. Por fim, essa célula única isolada foi transferida para uma placa de 24 poços contendo meio MAE estéril. Ao sinal de crescimento, gotas da amostra eram então transferidas para erlenmeyers contendo 100ml de meio MAE estéril. Estabelecido o cultivo, executou-se o repique semanal, sempre transferindo 1ml para novos frascos com meio MAE esterilizado.



Figura 8. Isolamento de *Chlamydomonas* sp. através do método de sucção com o auxílio de capilar acoplada a mangueira de silicone.

3.6 TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES VALORES DE pH

Visando conhecer a faixa de pH ótimo de crescimento da espécie isolada, foram realizados experimentos de crescimento. Para tanto, o meio de cultura MAE foi preparado nos seguintes valores de pH: 0; 1; 2; 3; 3,6; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13 e 14. Foram então preparados frascos em triplicata em cada pH, inoculando-se 1mL de cultivo saudável em cada frasco teste. O cultivo em pH 3,6 foi adotado como controle, uma vez que o meio MAE nos cultivos de manutenção apresenta esse pH. Os frascos foram vedados com filme plástico e mantidos em um agitador orbital para 30 frascos (Marconi MA140) sob iluminação uniforme de aproximadamente $80 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 9) e temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, por até 168h, com determinação da biomassa

inicial (t_0) e biomassa em 72, 96 e 168 horas. A determinação da biomassa foi realizada através de dois métodos: leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm) e contagem de células por mililitro em câmaras de Sedgewick-Rafter (UNESCO, 2010) (Figura 10). A partir dos dados obtidos foram calculadas as taxas de crescimento através da equação de crescimento com logaritmo natural (Equação 1).



Figura 9. Agitador orbital para o cultivo de *Chlamydomonas* sp.

Equação 1:

$$\mu = \frac{(\ln N_f - \ln N_0)}{T_f}$$

onde:

μ é a taxa de crescimento celular;

N_0 é a fluorescência de clorofila *a* inicial;

N_f é a fluorescência de clorofila *a* final;

T_f é o tempo da medida final após o começo do teste (72h, 96 ou 168h).

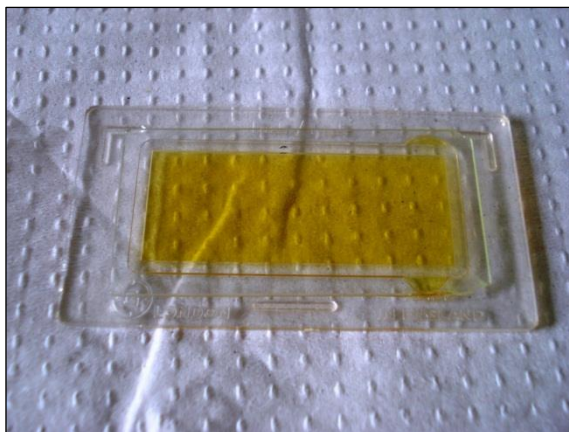


Figura 10. Câmara de Sedgewick-Rafter utilizada no método de contagem de células

3.7 TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para conhecer a temperatura de preferência da cepa isolada foram realizados testes de crescimento em diferentes temperaturas, a saber: 15°C, 22°C, 30°C e 40°C. Os testes foram conduzidos da mesma forma descrita para o teste com diferentes valores de pH (item 3.6), com exceção da plataforma de crescimento que, nesse caso não foi em agitador, mas sim de forma estática em câmaras de germinação com controle de fotoperíodo e temperatura. A irradiância de exposição, nesse caso, foi de aproximadamente $42 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A determinação de biomassa inicial e final dos testes foi realizada por leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm). Com os dados de biomassa inicial e final de cada amostra, foram calculadas as taxas de crescimento algal através da equação de crescimento exponencial apresentada no item 3.6.

3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ZINCO EM DIFERENTES VALORES DE pH

Para definir a tolerância da cepa acidofílica ao zinco em diferentes valores de pH foram realizados testes de toxicidade de

inibição do crescimento algal, seguindo a metodologia proposta por Knie & Lopes (2004).

Foram utilizadas diferentes concentrações de cloreto de zinco dissolvidas diretamente em meio de cultura MAE, com os respectivos ajustes de pH em cada caso, com base nos valores de pH de maior crescimento da cepa definidos em experimento prévio (item 3.6). As concentrações de zinco foram definidas com base em experimentos preliminares e em dados de toxicidade para microalgas, oriundos da base de dados de ecotoxicologia da Agência de Proteção Ambiental Americana (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>). Essas concentrações estão apresentadas na Tabela 2. Os testes foram realizados em triplicata. As condições de teste foram de luz constante, com aproximadamente $80\mu\text{Mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância e à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os frascos de ensaio foram mantidos em agitação constante (agitador orbital de mesa, marca Marconi, modelo MA140) em bancada uniformemente iluminada. A duração dos testes foi de 168 horas, com leituras em 72h, 96h e 168h.

Tabela 2. Concentração de zinco nos diferentes tratamentos utilizados no estudo.

Tratamento	Concentração de ZnCl_2 (g/L)	Concentração molar (μmol)	Quantidade real de Zn (g Zn)
T1	1,0000	7.336,7600	0,4796
T2	0,5000	3.668,3800	0,2398
T3	0,2000	1.834,1900	0,1199
T4	0,1250	927,1000	0,0599

A determinação de biomassa inicial e final dos testes foi realizada por leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm) e contagem de células. Com os dados de biomassa inicial e final de cada amostra, foram calculadas as taxas de crescimento algal através da equação de crescimento exponencial apresentada no item 3.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS

Com relação às variáveis físicas e químicas medidas, verificou-se que ambos os pontos amostrais apresentaram resultados semelhantes, com baixos valores de pH e oxigênio dissolvido (Tabela 3). Valores semelhantes aos obtidos neste trabalho foram obtidos por Brake *et al.* (2001), Lessmann *et al.* (2000), Nixdorf *et al.* (1998), Valente & Gomes (2007).

Em ecossistemas aquáticos, o pH pode ser considerado uma das variáveis ambientais mais importantes, uma vez que interfere na estrutura da biota, nos processos bioquímicos, na solubilidade de sais e na especiação geoquímica dos metais, condicionando a biodisponibilidade dos mesmos em ambientes aquáticos (SCHNEDER, 2006).

A concentração de oxigênio dissolvido resulta do balanço entre a entrada de oxigênio da atmosfera e da fotossíntese aquática, com o consumo de oxigênio resultante das reações de oxidação química e biológica (SCHNEIDER, 2006). Em DAM, a concentração de oxigênio na água é geralmente muito baixa devido à alta concentração de ácidos que reflete na oxidação de íons férricos. Porém, a concentração de oxigênio nestes ambientes pode tornar-se mais elevada com a presença de organismos fotossintetizantes (BRAKE *et al.*, 2001).

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água nos pontos estudados.

Ponto	pH	O ₂ (mg.l ⁻¹)	Temp. água (°C)
DA-01	2,98	5,3	22,6
DA-02	2,58	5,6	20,5

4.2 COMPOSIÇÃO DA FICOFLORA

A análise das amostras permitiu a determinação de 22 táxons infragenéricos, distribuídos em 13 gêneros e 3 divisões (Bacillariophyta, Chlorophyta e Euglenophyta). Cinco táxons ocorreram exclusivamente no ponto DA-01, 11 foram exclusivos do ponto DA-02 e 4 ocorreram em ambos os pontos (Tabela 4). A divisão que apresentou o maior número de táxons foi Bacillariophyta, totalizando 14 táxons. A riqueza observada neste trabalho pode ser considerada alta quando comparada a

outros estudos da ficoflora realizados em DAM. Trabalhos realizados em áreas de DAM de modo geral, apresentaram baixa riqueza de espécies quando comparado ao observado neste trabalho. Valente (2004) em uma DAM em Valdacas (Portugal) encontrou apenas seis táxons infragenéricos, se tratando de um ecossistema simples, com baixa riqueza. López-Archilla *et al.* (2000) observaram apenas 6 táxons infragenéricos em um trecho do rio Tinto na Espanha altamente impactado por DAM enquanto que Sabater *et al.* (2003) identificaram 10 táxons infragenéricos na cabeceira do Rio Tinto. Lessman *et al.* (2000) observaram 13 táxons infragenéricos de microalgas planctônicas em 28 lagos de mina em Lusatia (Alemanha). O método de oxidação de amostras para identificação de diatomáceas pode ter sido o responsável pela grande diferença entre trabalhos encontrados na literatura e os resultados obtidos neste, uma vez que o método de oxidação permite uma alta concentração de células em uma lâmina, evidenciando as espécies raras.

Em termos de biomassa, representantes de Euglenophyta (*Euglena* sp. e *Euglena mutabilis*) foram dominantes no ponto DA-01, formando um biofilme sobre o substrato (Figura 11). Enquanto que representantes de Chlorophyta (*Klebsormidium* sp. e *Mougeotia* sp.) foram dominantes no ponto amostral DA-02, formando densos tufo de filamentos (Figura 12). Essa grande dominância pode ser explicada pela adaptabilidade dos grupos a condições de pH extremas uma vez que a abundância relativa de diferentes filos de algas muda acentuadamente entre ambientes com pH diferentes. Em pH muito baixo (<3,5), euglenófitas, algas verdes e diatomáceas são dominantes (BRAY *et al.*, 2008).

Vários fatores podem ser responsáveis pela alta biomassa algal encontrada nos pontos estudados. Espécies tolerantes podem ser estimuladas, onde são otimizadas pelas condições físico-químicas, como pH (NOVIS, 2006). Segundo Valente & Gomes (2007), a abundância e a distribuição de *Klebsormidium* e *Euglena mutabilis* em águas afetadas por DAM as fazem indicadores ecológicos, sendo *Euglena mutabilis* relacionada a efluentes com melhores condições e *Klebsormidium* está relacionada a efluentes altamente contaminados. Porém, segundo Olaveson & Nalewako (2000) e Freitas (2010), *Euglena mutabilis* está relacionada a ambientes mais degradados. Neste estudo, *Euglena mutabilis* ocorreu exclusivamente no ponto DM-01 e *Klebsormidium* sp. ocorreu exclusivamente no ponto DM-02. Diferenças significativas na

composição química da água que não foram verificadas neste trabalho e fatores físicos como intensidade luminosa podem estar relacionadas com a distribuição destas espécies.

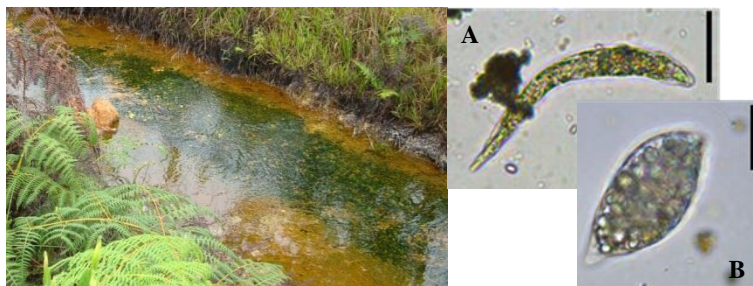


Figura 11. Biofilme formando principalmente por *Euglena mutabilis* (A) e *Euglena* sp.(B) no ponto amostral DA-01. Barras de escala = 10 μ m.

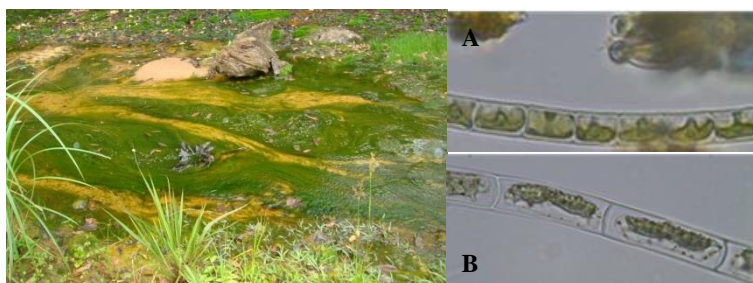


Figura 12. Densos tufos de filamentos formados principalmente por *Klebsormidium* sp. (A) e *Mougeotia* sp. (B) no ponto amostral DA-02. Barras de escala = 10 μ m.

Embora o baixo pH e alta concentração de metais sejam mais restritivos para a vida aquática, algas como *Klebsormidium*, *Microspora*, *Mougeotia*, *Ulothrix*, *Chlamydomonas* e diatomáceas como *Eunotia exigua*, *Achnanthyidium minutissimum*, e representantes dos gêneros *Nitzschia*, *Frustulia* e *Pinnularia* são habitantes naturais em DAM (LUÍS *et al.*, 2009; NIYOGI *et al.*, 1999; DENICOLA, 2000; STEVENS *et al.*, 2001; FREITAS, 2010).

De acordo com Bray (2007), em ambientes impactados pela DAM, algas tendem a ter uma diversidade muito baixa e muitas vezes dominadas por poucas espécies, frequentemente com elevada biomassa, corroborando com o observado neste trabalho.

Tabela 4. Composição e ocorrência da ficoflora nos pontos estudados.

Táxons/Ponto Amostral	DA-01	DA-02
Bacillariophyta		
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	X	
<i>Achnantheidium</i> sp.		X
<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grunow) Simonsen		X
<i>Dicotella stellingera</i> (Cleve & Gronow) Houk & Klee	X	X
<i>Eunotia exigua</i> (Brébisson ex Kützing) Rabenhorst	X	X
<i>Frustulia saxonica</i> Rabenhorst		X
<i>Nitzschia</i> sp.	X	
<i>Nitzschia linearis</i> (C.Agardh) Wm. Smith		X
<i>Pinnularia borealis</i> Ehrenberg		X
<i>Pinnularia obsura</i> Krasske	X	X
<i>Pinnularia microstauron</i> (Ehrenberg) Cleve		X
<i>Pinnularia</i> cf. <i>diversarea</i> Krammer & Metzeltin	X	X
<i>Surirella</i> cf. <i>tenuissima</i> Hustedt		X
<i>Surirella</i> sp.		X
Divisão Chlorophyta		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	X	
<i>Klebsormidium</i> sp.		X
<i>Mougeotia</i> sp.		X
<i>Netrium</i> sp.		X
Divisão Euglenophyta		
<i>Euglena mutabilis</i> F.Schmitz	X	
<i>Euglena</i> sp.	X	

Como postulado por Novis & Harding (2007), a presença de algas nestes ambientes extremos levanta a questão de sua evolução e dependência destes ambientes. Seria o crescimento de algas em ambientes de DAM facultativo ou obrigatório? Levantamentos florísticos raramente nos fornecem informações suficientes para resolver este problema, mas algumas evidências estão disponíveis em

estudos mais detalhados sobre a ecofisiologia destas algas, a exemplo do que propôs o presente trabalho. *Euglena mutabilis*, por exemplo, está amplamente relatada para águas contaminadas com DAM. O crescimento desta espécie é ótimo entre pH 3,0 e 3,5 (BRAKE *et al.*, 2001), mas ela também é reportada em ambientes de maior pH, como por exemplo em lagoas de tratamento de esgotos.

Comparações entre *E. mutabilis* e *E. gracilis* demonstraram que ambas as espécies são ácido tolerantes mas *E. mutabilis* foi muito mais tolerante a metais pesados, incluindo alumínio, níquel, ferro e cádmio (OLAVESON & NALEWAJKO, 2000). Assim, o sucesso de *E. mutabilis* em sistemas DAM pode ser devido à aquisição de tolerância a metais pesados, ao invés de estar unicamente relacionada a baixos valores de pH.

Ainda segundo Novis & Harding (2007), o melhor exemplo documentado de crescimento preferencial em DAM é o de *Klebsormidium rivulare*. Esta espécie, que pode ser a mesma encontrada no presente estudo, foi coletada em diversos ambientes de água doce, não necessariamente com baixo pH. Ela já foi identificada com vários outros nomes (ex.: *Hormidium rivulare* Kütz., *Ulothrix implexa* (Kütz.) Kütz., *Klebsormidium dissectum* (F.Gay) H.Ettl & Gärtner, *Klebsormidium acidophilum* P.M.Novis), entretanto, estudos realizados com isolamento e crescimento em diferentes valores de pH mostraram que essas aparentemente diferentes espécies, se tratavam de apenas duas espécies com polimorfismo decorrente de variações de pH. Ou seja, estudos taxonômicos em microalgas de DAM devem ser ou acompanhados de estudos ecofisiológicos ou de análises moleculares.

Apesar do ambiente extremamente agressivo de DAM, foi encontrada uma alta riqueza de espécies na área de estudo, porém, especial atenção deve ser dada a variações morfológicas intraespecíficas resultantes do efeito do pH, sendo necessário isolar e crescer as espécies em diferentes condições ou efetuar análise molecular.

4.3 TAXA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES VALORES DE pH

O pH pode ser considerado uma das variáveis ambientais mais importantes em ecossistemas aquáticos, uma vez que interfere no tipo de comunidade biótica, em processos bioquímicos, no balanço de CO₂, na solubilidade dos sais e na especiação geoquímica dos metais,

condicionando a biodisponibilidade dos mesmos no ambiente aquático. A biota aquática também tem capacidade de absorção de metais dissolvidos, no caso de pH baixo, uma vez que nesta condição os íons metálicos encontram-se disponíveis nos sedimentos e solos em proporções diretamente relacionadas ao decréscimo do pH (SCNEIDER, 2006).

Através do método de contagem (Figura 13) foi observado que a cepa de *Chlamydomonas* sp. cresceu desde o pH 0 ao pH 8 com crescimento ótimo em pH 3,6 demonstrando que, apesar da grande tolerância a diferentes valores de pH, a espécie teve uma boa taxa de crescimento entre pH 2 e 6, conferindo a característica de uma espécie acidofílica. Um estudo realizado por Gerloff-Elias *et al.*, (2006) com *Chlamydomonas acidophila*, que também ocorre em ambientes extremamente ácidos, verificou que a espécie cresceu em uma ampla variação de pH (entre 1,5 e 7). Foi previamente demonstrado que algas acidofílicas são capazes de manter um pH neutro intracelular ao longo de uma ampla faixa de valores extremos de pH (GIMMLER, 2001; GERLOFF-ELIAS *et al.*, 2006) o que pode explicar a tolerância deste gênero.

Com relação a taxa de crescimento, obtida através do método de leitura de turbidez em espectrofotômetro (750nm) (Figura 14), a partir do pH 9 os valores de taxa de crescimento foram elevados, isto ocorre porque em pH elevado os metais contidos no meio de cultivo precipitam (NAJA & VOLESKY, 2009), deixando o meio turvo e causando erros na leitura em espectrofotômetro. A partir destes resultados, os experimentos com temperatura e concentração de zinco foram realizados em valores de pH que vão do 2 ao 8.

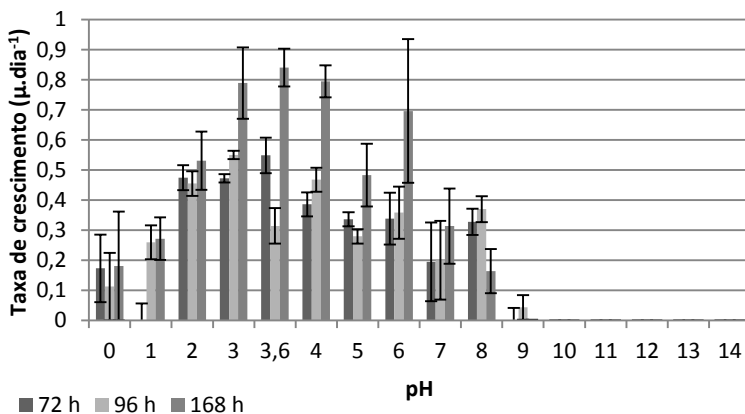


Figura 13. Taxa de crescimento por dia ($\mu\text{.dia}^{-1}$) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de contagem de células em câmara de Sedgewick-Rafter. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

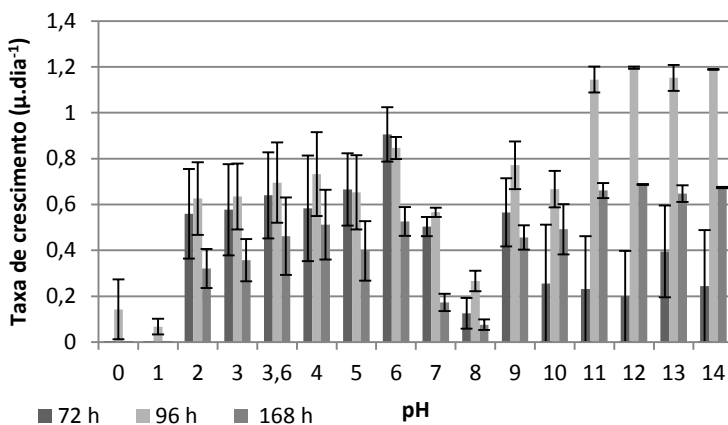


Figura 14. Taxa de crescimento por dia ($\mu\text{.dia}^{-1}$) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH através do método de leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

4.4 TAXA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para esta análise foram feitos cultivos em diferentes temperaturas e nos valores de pH onde houve melhor crescimento da cepa (2 ao 8). Com isso foi possível observar que a cepa de *Chlamydomonas* sp. cresceu em diferentes temperaturas sendo que teve maior crescimento em 22°C. Esta preferência está relacionada com as temperaturas no ambiente onde a espécie se encontra naturalmente, estando adaptada a esta condição (Figura 15). No estudo realizado por Moser e Weisse (2011) foi verificado o efeito do estresse combinado de pH e temperatura na largura de nicho de *Chlamydomonas acidophila* e *Ochromonas* spp. em lagos ácidos de mineração, observando que perto do limite inferior e superior da tolerância de pH, o efeito da temperatura em *Chlamydomonas acidophila* é mais importante, estreitando a largura da tolerância ao pH quando a temperatura tornou-se desfavorável. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho onde em pH 5 e temperatura de 40°C a taxa de crescimento foi extremamente baixa.

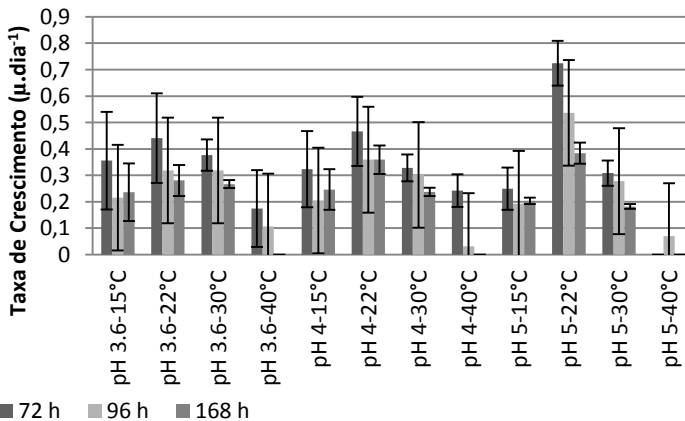


Figura 15. Taxa de crescimento por dia ($\mu.\text{dia}^{-1}$) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes temperaturas e em pH 3,6, 4 e 5 através do método de leitura da turbidez em espectrofotômetro (750nm). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

4.5 TOLERÂNCIA AO ZINCO EM DIFERENTES VALORES DE pH

Os resultados das taxas de crescimento de *Chlamydomonas* sp. em diferentes concentrações de zinco estão representados na Figura 16. As taxas de crescimento obtidas através do método de contagem de células nos diferentes valores de pH mostraram algumas diferenças, onde as menores taxas foram verificadas nos pHs 2 e 3,6 e as maiores nos pHs 7 e 8. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas a especiação do Zinco em função do pH, onde esse metal fica mais dissolvido e biodisponível em baixos pHs e tende a ficar insolúvel, na forma de hidróxidos em pHs acima de 5 (ERTEN-UNAL et al., 1998). A figura 17 mostra esse comportamento do zinco em diferentes metais.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Silva (2011), onde ao avaliar as taxas de crescimento de uma cepa de *Chlamydomonas* sp. oriunda de DAM, observou que ela apresentou alta tolerância ao zinco e ao cádmio, porém sem diferenças significativas entre os pHs 3,6 e 7.

Ambientes ácidos tendem a conter elevadas concentrações de metais pesados, porque a sua solubilidade aumenta acentuadamente (CAMPBELL & STOKES, 1985). Ao mesmo tempo, a superfície de ligação e taxa de absorção de metais pesados por células é significativamente reduzida pois o baixo pH provoca lixiviação de metais das superfícies (PETERSON *et al.*, 1984; GADD, 1986). Portanto, é necessário saber o destino do metal em cada caso, ou seja, se ele é efetivamente absorvido e acumulado pelas células algais, ou se fica adsorvido na parede celular, ou ainda se é exsudado após absorção prévia. Esse tipo de resposta só é possível avaliando-se biomarcadores de metais a nível intracelular (ex.: fitoquelatinas) ou com análises em microscopia eletrônica (HARGREAVES & WHITTON, 1976a, b; VOLESKI & HOLAN, 1995; NISHIKAWA & TOMINAGA, 2001). Por outro lado, o zinco não acelera diretamente a formação de espécies reativas de oxigênio, portanto, exerce menos estresse sobre o organismo, o que pode justificar a maior tolerância de organismos a suas elevadas concentrações, diferentemente de metais mais tóxicos como o cádmio (TRIPATHI & GAUR, 2006). Sendo um micronutriente, o zinco em baixas concentrações pode estimular o crescimento, porém, em altas concentrações pode exercer um efeito contrário. Devido às condições do ambiente de origem de

Chlamydomonas sp., a espécie possivelmente está adaptada a altas concentrações de metais, portanto, as concentrações utilizadas neste estudo devem estar próximas as encontradas no ambiente de origem da cepa.

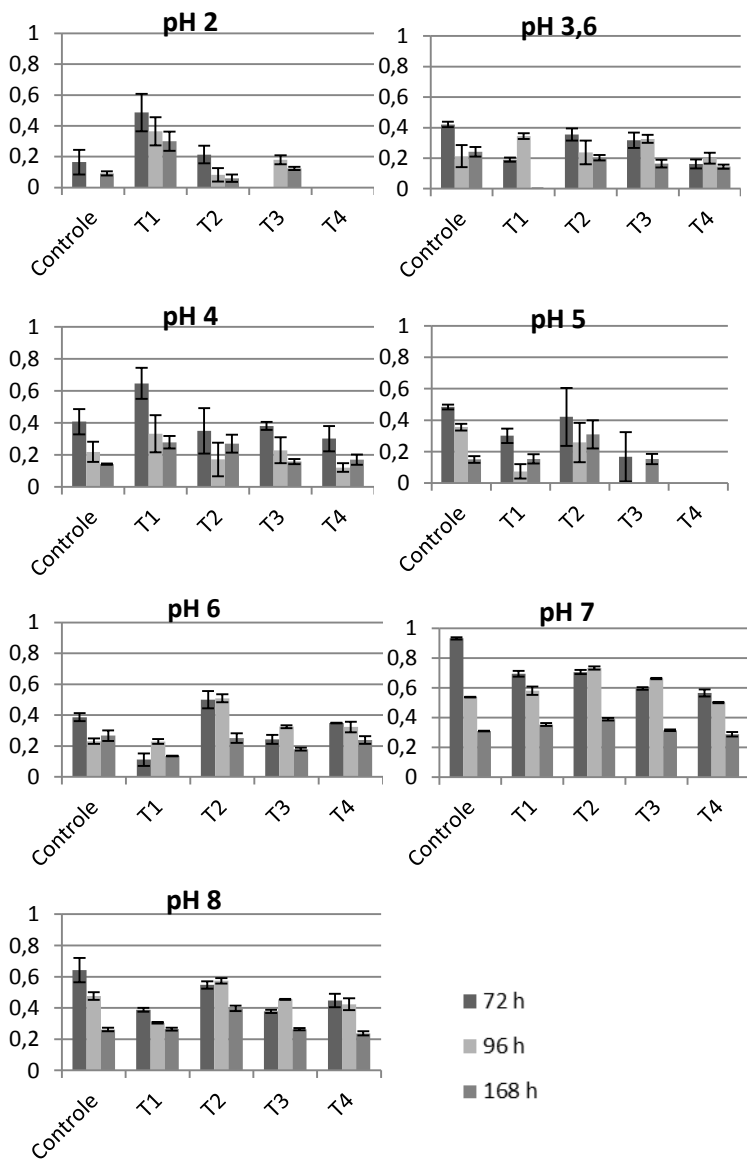


Figura 16. Taxas de crescimento ($\mu.\text{dia}^{-1}$) de *Chlamydomonas* sp. em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de zinco obtidas

através do método de contagem de células. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias ($n=3$).

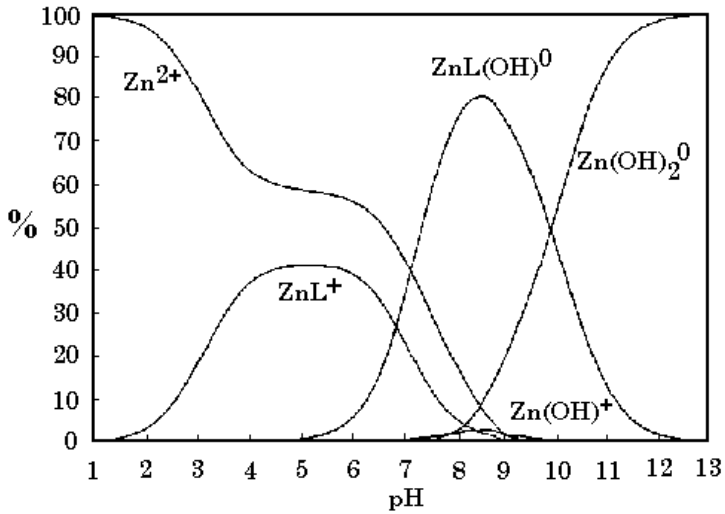


Figura 17. Ilustração da especiação do zinco em função do pH em solução aquosa. Baseado em ERTEN-UNAL *et al.* (1998).

CONCLUSÕES

- A ficoflora de drenagens ácidas de mina de carvão da região de Siderópolis – SC mostrou-se relativamente diversa quando comparada a outros locais estudados. Os táxons dominantes foram *Euglena mutabilis* e *Euglena* sp. formando biofilmes *Klebsormidium* sp. e *Mougeotia* sp. formando densos tufo de filamentos.
- A cepa de *Chlamydomonas* sp. isolada e testada mostrou crescimento no intervalo de pHs entre 0 e 8, com ausência de crescimento em valores maiores que 8, caracterizando-a como uma microalga acidofílica.
- A cepa de *Chlamydomonas* sp. isolada e testada mostrou elevada tolerância ao Zinco em diferentes pHs, com taxas de crescimento mais baixas em pHs 2 e 3,6 e levemente mais elevadas em pHs 7 e 8. Essa diferença de sensibilidade entre diferentes pHs deve estar relacionada a especiação do zinco que é mais biodisponível em baixos pHs.
- A cepa de *Chlamydomonas* sp. cresceu em diferentes temperaturas (15°C, 22°C, 35°C e 40°C) entre os pHs 3,6; 4 e 5, sendo que teve maior crescimento em 22°C. As menores taxas foram verificadas na combinação de pH 5 e 40°C. Estes resultados devem estar relacionados com as temperaturas e pHs do ambiente onde a espécie se encontra naturalmente, estando adaptada a estas condições.
- O melhor método de quantificação da biomassa microalgal para a avaliação das taxas de crescimento foi através da contagem de células, pois métodos como a leitura em espectrofômetro a 750 nm (turbidez) e fluorescência de clorofila-a mostrou interferência de turbidez e cor relacionadas a precipitação de metais nas soluções testes.

REFERÊNCIAS

- Aguilera, A. & Amils R. 2005. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 316–329.
- Belloti, M.; Quadros, J.; Guidi, A. 2002. **A história do carvão de Santa Catarina**. Criciúma: Imprensa Oficial do Estado de Santa Catarina.
- Bicudo, C. E. M. & Menezes, M. 2006. **Gênero de Algas de águas Continentais do Brasil**. Chave para identificação e descrição. São Carlos:Rima. 2 ed.
- Boavida, M. J. & Heath, R. 1986. Phosphatase activity of *Chlamydomonas acidophila* Negro (Volvocales, Chlorophyceae). **Phycologia**, v. 25, n. 3, p. 400-404.
- Bourelly, P. C. 1972. **Les algues d'eau douce; initiation à la systématique, 1: les Algues Vertes**. Paris: N. Boubée. 573p
- Brake, S.S.; Dannelly, H.K.; Connors, K.A. 2001. Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality. **Environ. Geol**, n. 40, p. 458–469.
- Bray, J. 2007. The ecology of algal assemblages across a gradient of acid mine drainage stress on the West Coast, South Island, New Zealand. Dissertação de Mestrado. University of Canterbury.
- Bray, J.; Broady, P. A. Niyogi, D. K.; Harding J. S. 2008. Periphyton communities in New Zealand streams impacted by acid mine drainage. **Marine and Freshwater Research**, v. 59, p. 1084–1091.
- Cairns, J. Jr., Buikema, A. L. Jr.; Heath, A. G.; Parker, B. C. 1978. Effects of temperature on Aquatic organisms Sensitivity to Selected Chemicals. Virginia Water Resources Research Center, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Campbell, P. G. C. & Stokes, P. M. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Can. J. Fish. aquat. Sci**, v. 42, p. 2034-2049.

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral. 2000. **Projeto Conceitual para Recuperação Ambiental da Bacia Carbonífera Sul Catarinense**. RT/33/2000 – Relatório Técnico Elaborado pela SOCIESC, v. 1.

DeNicola, D. M. 2000. A review of diatoms found in highly acidic environments. **Hydrobiologia**, v. 433, p. 111–122.

EPAGRI – Estações Meteorológicas do Município de Criciúma. 2013. Monitoramento de dados meteorológicos para prevenção de enchentes e deslizamentos. Disponível em: <<http://www.ciram.com.br/siscrici/index.jsp?url=pagina/jsp/projeto.jsp>>. Acesso em: 12.nov.2013.

Erten-Unal, M.; Wixson, B.G.; Gale, N. & Pitt, J.L. 1998. Evaluation of toxicity, bioavailability and speciation of lead, zinc and cadmium in mine/mill wastewaters. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10(2): 37-46.

Forstner, U. & Wittmann, G. T. W. 1979. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg & New York.

Freitas, A. P. P. 2010. Algas perifíticas em como indicadoras de qualidade em ambientes impactados pela drenagem ácida de minas na região carbonífera de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Gadd, G. M., 1986. Fungal responses towards heavy metals. In Herbert, R. A. & Codd, G. A. **Microbes in Extreme Environments**. Londres: Academic Press, p. 83–110.

Garbayo, I.; Domínguez, M.J.; Vígara J. & Veja, J. M. 2007. **Effect of abiotic stress on *Chlamydomonas acidophila* viability**. In: Méndez-Vilas A. (Ed.) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. p. 163-167.

Garbayo, I.; Cuaresma, M.; Vílchez, C.; Vega, J. M. 2008. Effect of abiotic stress on the production of lutein and b-carotene by *Chlamydomonas acidophila*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1158–1161.

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*. **Microbiol Ecol**, v. 56 p. 345–354.

Gimmler H. 2001. **Acidophilic and acidotolerant algae**. In: Rai, L. C.; Gaur, J. P. Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. Heidelberg: Springer Press. p. 259–290.

GTA – Grupo Técnico de Assessoramento. 2010. Quarto relatório de monitoramento dos indicadores ambientais. Criciúma, SC.

Harding, J. S., & Boothroyd, I. 2004. Impacts of mining. In: J. Harding, P. Mosley, C. Pearson, & B. Sorrell (eds), **Freshwaters of New Zealand**, New Zealand Limnological Society and New Zealand Hydrological Society, The Caxton Press, Christchurch, p. 36.1–36.10.

Hargreaves, J. W. & Whitton, B. A. 1976a. Effect of pH on growth of acid stream algae. **Br. phycol. J**, v. 11, p. 215–223.

Hargreaves, J. W. & Whitton, B. A. 1976b. Effect of pH on tolerance of *Hormidium rivulare* to zinc and copper. **Oecologia**, v. 26, p. 235–243.

Lessmann, D; Fyson, A; Nixdorf, B. 2000. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH \leq 3. **Hydrobiologia**, n. 433 p. 123–128.

Luís, A. T.; Teixeira, P.; Almeida, S. F. P; Ector, L.; Matos, J. X.; Ferreira da Silva, E. A. 2009. Impact of Acid Mine Drainage (AMD) on Water Quality, Stream Sediments and Periphytic Diatom Communities in the Surrounding Streams of Aljustrel Mining Area (Portugal). **Water Air Soil Pollut**, v. 200, p. 147–167.

Johnson, D. B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. **Microbiol. Ecol**, n. 27, p. 307–317.

Johnson, D. B. & Hallberg, K. B. 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of the Total Environment**, n. 338, p. 3-17.

Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. **Bacillariophyceae**: Naviculaceae. In: Etil, H.; Gerloff, J.; Heyning, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart & New York: G. Fischer, v. 2, parte 1, 1986.

Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. **Bacillariophyceae**: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Etil, H.; Gerloff, J.; Heyning, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart & New York: G. Fischer, v. 2, parte 2, 1988.

Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. **Bacillariophyceae**: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Etil, H.; Gerloff, J.; Heyning, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserfloravon Mitteleuropa. Stuttgart & Jena: G. Fischer, v. 2, parte 3, 1991a.

Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. **Bacillariophyceae**: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Etil, H.; Gerloff, J.; Heyning, H.; Mollenhauer, D. Sübwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart & Jena: G. Fischer, v. 2, parte 4, 1991b.

Kapfer, M. 1998. Assessment of the colonization and primary production of microphytobenthos in the littoral of acidic mining lakes in Lusatia (Germany). **Water Air Soil Pollut**, v. 108: p. 331–340.

Knie, J. W. & Lopes, E. W. B. 2004. **Testes Ecotoxicológicos**: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ.

Lee, R. E. 2008. **Phycology**. Cambridge University Press, 4ed.

Lessmann, D.; Fyson, A.; and Nixdorf, B. 2000. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany). **Hydrobiologia**, v. 433, p. 123–128.

Moser, M. & Weisse, T. 2011. Combined stress effect of pH and temperature narrows the niche width of flagellates in acid mining lakes. **Journal of Plankton Research**, v. 33, n. 7, p. 1023-1032.

Naja, G. M. & Volesky, B. 2009. Metals in the Environment: Toxicity and Sources. In: Wang, L. K., Chen, J. P., Hung, Y. T., Shammas, N. K., (eds). **Handbook on Heavy Metals in the Environment**. Taylor & Francis and CRC Press, p. 13-61.

Nascimento, F. M. F.; Mendonça, R. M. G.; Macêdo, M. I. F.; Soares, P. S. 2002. **Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração se carvão em Santa Catarina**. Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). Rio de Janeiro.

Niyogi, D. K.; McKnight, D. M.; William M. Lewis. 1999. Influences of water and substrate quality for periphyton in a montane stream affected by acid mine drainage. **Limnol. Oceanogr.**, v. 44, n. 3, parte 2, p. 804–809.

Niyogi, D. K.; Lewis, W. M. Jr.; McKnight, D. M. 2002. Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams. **Ecosystems**, v. 5, p. 554–567.

Nishikawa, K. & Tominaga N. 2001. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 65, n. 12, p. 2650 - 2656.

Nixdorf, B., Mischke, U., Lessmann, D. 1998. Chrysophytes and Chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH<3) inLusatia (Germany). **Hydrobiologia**, n. 369/370, p. 315–327.

Novis, P. M. 2006. Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. **Phycologia**, v. 45, p. 293–301.

Novis, P. M. & Harding, J. S. 2007. Extreme Acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. In: Seckbach, J. (Ed.), **Algae And Cyanobacteria In Extreme Environment**. Springer, The Netherlands, p. 443–463.

Olavenson, M. M. & Nalewajko, C. 2000. Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. **Hydrobiologia**, v. 433, p. 39-56.

Peterson, H. G.; Healey, F. P.; Wagemann, R.1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. **Can. J. Fish. aquat. Sci**, v. 41, p. 974–979.

Rai, L. C., Gaur, J. P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and heavy-metal pollution. **Biological Reviews**, n. 56, p. 99–151.

Rampelotto, P. H. 2010. Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. **Sustainability**, v. 2, p. 1602-1623.

Sabater, S.; Buchaca, T.; Cambra, J.; Catalan, J.; Guasch, H.; Ivorra, N., Muñoz, I.; Navarro, E.; Real, M.; Romaní, A. 2003. Structure and function of benthic algal communities in an extremely acidic river. *J. Phycol.* 39: 481–489.

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 - UFRGS.

Stauber, J. L. & Florence, T. M. 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. **Marine Biology**, v. 105, p. 519-524.

Sheoran, A. S. & Sheoran, V. 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. **Minerals Engineering**, v. 19, p. 105–116.

Silva, M.V. 2011. Avaliação do Potencial de uma Microalga Acidofílica quanto a Biorremediação de Metais Traço em Diferentes Compartimentos Ambientais. Dissertação (Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí.

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**, v. 28, p.189-196.

Simonsen, R. 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean expedition of R/V “**Meteor**”, 1964-1965. Meteor-Forschung- Ergebniss. Reihe D Biol., Berlin, n. 19, p. 1-66.

Sociesc. 2013. Histórico do carvão em Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.satc.edu.br/siecesc/teste/historico.asp>>. Acesso em: 12 out 2013.

Sociesc. 2012. Dados estatísticos. Disponível em: <http://www.satc.edu.br/siecesc/conteudo/estatisticas/estatisticas_2012.pdf>. Acesso em: 12 out de 2013.

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**, v. 11, p. 551-562.

Stevens, A. E., McCarthy, B. C., and Vis, M. L. 2001. Metal content of *Klebsormidium*-dominated (Chlorophyta) algal mats from acid mine drainage waters in southeastern Ohio. **J. Torrey Bot. Soc.** 128: 226–233.

Tittel, J.; Bissinger, V.; Gaedke, U.; Kamjunke, N. 2005. Inorganic Carbon Limitation and Mixotrophic Growth in *Chlamydomonas* from an Acidic Mining Lake. **Protist**, v. 156, p. 63-75.

Tripathi, B. N. I. & Gaur, J. P. 2006. Physical behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of the stress. **Protoplasma**, v. 229, p. 1-9.

UNESCO - Intergovernmental Oceanographic Commission. 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Karlson, B., Cusack, C. & Bresnan, E. (editors). Paris, UNESCO. IOC Manuals and Guides, no. 55 (IOC/2010/MG/55).

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**, v. 33, n. 2, p. 283-294.

Volesky, B. & Holan, Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. **Biotechnol. Prog.** 11:235– 50.

5 APÊNDICE

Composição das soluções estoque do meio ácido modificado M.A.E (pH 3.6) (Olavenson & Nalewajko, 2000).

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

Composição dos metais traços

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

Composição da Vitamina F/2

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