

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE OCEANOGRAFIA
GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Amanda da Silva Góes

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS DE CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA DA
MICROALGA *Chlamydomonas acidophila* EM DIFERENTES PHs,
TEMPERATURAS, INTERVALOS DE TEMPO E CONCENTRAÇÕES DE ZINCO**

Florianópolis

2021

Amanda da Silva Góes

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS DE CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA DA
MICROALGA *Chlamydomonas acidophila* EM DIFERENTES PHs,
TEMPERATURAS, INTERVALOS DE TEMPO E CONCENTRAÇÕES DE ZINCO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
em Oceanografia do Centro de Ciências Físicas
e Matemáticas da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para a obtenção
do Título de Bacharel em Oceanografia.
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig.

Florianópolis

2021

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

Góes, Amanda da Silva
ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS DE CRESCIMENTO E
TOLERÂNCIA DA MICROALGA *Chlamydomonas acidophila* EM
DIFERENTES PHs, TEMPERATURAS, INTERVALOS DE TEMPO E
CONCENTRAÇÕES DE ZINCO / Amanda da Silva Góes ; orientador,
Leonardo Rubi Rörig, 2021.
75 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Físicas e Matemáticas, Graduação em Oceanografia,
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Oceanografia. 2. *Chlamydomonas acidophila*. 3.
Análise estatística. 4. Toxicidade do zinco. 5. Crescimento
algal. I. Rörig, Leonardo Rubi . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Oceanografia. III. Título.

Amanda da Silva Góes

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS DE CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA DA
MICROALGA *Chlamydomonas acidophila* EM DIFERENTES PHs,
TEMPERATURAS, INTERVALOS DE TEMPO E CONCENTRAÇÕES DE ZINCO**

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do
Título de Bacharel em Oceanografia e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 25 de agosto de 2021

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Fonseca
Coordenadora do Curso de Oceanografia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Carla Van Der Haagen Custodio Bonetti
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. José Bonomi Barufi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Evania e Veroni, que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos, sejam eles quais fossem, me dando todo suporte, amor, paciência e confiança necessários para que eu chegasse aonde quer que eu quisesse. Ao meu padrasto Gustavo, que há 11 anos tem estado ao nosso lado, me tratando como filha e sendo suporte para todos os momentos. Essa conquista também é de vocês!

Aos meus irmãos Gabriel e Theo, por me fazerem desde cedo entender um pouco mais sobre responsabilidade e que tudo na vida é reflexo do que somos e fazemos. Por todas as trocas e aprendizados que me proporcionaram e por me usarem de exemplo. Vocês são tudo pra mim.

À todo restante da minha família, por independente de tudo, sempre me apoiarem e acreditar na minha capacidade. Por todo amor, carinho e aprendizado que me proporcionaram durante esses 25 anos.

Aos amigos que a Oceanografia UFSC me proporcionou, por todas as trocas - sejam elas de momentos prazerosos ou de dias e noites de estudos para uma avaliação; Ana, Barbara, Bia, Caetano, Carol, Juana, Lari, Lua, Marco, Pati, Paulo e Rodrigo. Sem vocês a turma VIII não seria a mesma – bem como meus anos de graduação.

Aos meus amigos com quem compartilho a vida há anos, que fizeram parte de quem sou hoje. Por estarem ao meu lado em todas as fases da minha vida, sempre compartilhando ensinamentos e momentos bons: Ana Carolini, Ana Karla, Ana Flavia, Bruna, Felipe, Janaina, Maria Clara e Tailana. Carregarei vocês pra sempre no coração.

Aos meus amigos que me acompanham no mundo do mergulho, com quem disfrutei grandes momentos: Ana Bia, Arieli, Baesso, Bico, Dedé, Louis, Lúcia, Tati, Tio Ric, Tia Pam, Zappe e muitos outros. Obrigada por todas as trocas!

Ao meu orientador Leonardo Rörig, que nunca mediu esforços para passar conhecimento, sempre muito dedicado e atencioso. Aos membros da banca, José Barufi e Carla Bonetti, por disporem tempo e atenção, e me ajudarem com todo suporte para que essa fase pudesse ser completa.

Àqueles responsáveis por todo processo de aprendizado, com quem tive o prazer de compartilhar esses 6 anos de caminhada; os professores da Oceanografia UFSC: Alberto Linder, Alessandra Fonseca, Andreia Freire, Antonio Fetter, Antonio Klein, Bárbara Segal, Carla Bonetti, Felipe Pimenta, Jarbas Bonetti, José Barufi, Juliana Leonel, Leonardo Rörig, Marinez Scherer, Norberto Horn, Pedro Pereira e Regina Rodrigues. Sem vocês nada disso seria possível.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma se fizeram presentes durante essa caminhada, compartilhando momentos bons e amenizando os de dificuldade.

Obrigada!

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.

Amyr Klink

RESUMO

A drenagem ácida de mina (DAM) é caracterizada por sua alta acidez, alta concentração de metais pesados e deposição de óxidos metálicos. Por conta de tais fatores, poucos são os organismos que conseguem proliferar nesse ambiente. A microalga *Chlamydomonas acidophila* é uma alga acidofílica e acidotolerante, que pode ser encontrada nessa região. Para o presente estudo, utilizou-se dados obtidos anteriormente numa região de DAM na cidade de Siderópolis - SC, e armazenados no LAFIC, onde foram feitas análises para determinar a taxa de crescimento da alga em diferentes pHs, temperaturas, concentrações de zinco e a toxicidade desse metal para a alga. Com estes dados, foram feitas análises de variância (ANOVA) para determinar quais variáveis influenciavam no crescimento da alga e na toxicidade do zinco, e teste *Post-Hoc* de *Tukey*, para encontrar onde estavam as diferenças significativas entre os fatores. A alga *Chlamydomonas acidophila* apresentou grande tolerância a diferentes pHs, teve seu crescimento máximo no intervalo entre os pHs 2 e 6, na temperatura de 22° C, já a temperatura de 40° C influenciou de forma negativa no crescimento da alga. O pH e a temperatura influenciaram no crescimento da espécie, e ainda, perto do limite inferior e superior da tolerância da alga ao pH, o efeito da temperatura foi mais importante. O zinco demonstrou toxicidade para a cepa estudada, entretanto, quando comparada com outras espécies de microalga, a alga demonstrou grande tolerância ao metal.

Palavras-chave: *Chlamydomonas acidophila*. Toxicidade do zinco. DAM. Tempo de exposição. Análise de variância. Metais pesados.

ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) is characterized by its high acidity, high concentration of heavy metals and deposition of metal oxides. Due to such factors, few organisms are able to proliferate in this environment. The microalgae *Chlamydomonas acidophila* is an acidophilic and acid-tolerant alga that can be found in this region. For the present study, we used data previously obtained in a DAM region in the city of Siderópolis - SC, and stored at LAFIC, where analyzes were performed to determine the algae growth rate at different pHs, temperatures, zinc concentrations and the toxicity of this metal to algae. With these data, analyzes of variance (ANOVA) were performed to determine which variables influenced the algae growth and zinc toxicity, and Tukey's *Post-Hoc* test, to find where the significant differences were between the factors. The *Chlamydomonas acidophila* alga showed great tolerance to different pHs, had its maximum growth in the interval between pH 2 and 6, at the temperature of 22° C, while the temperature of 40° C negatively influenced the growth of the alga. The pH and temperature influenced the growth of the species, and yet, near the lower and upper limits of the alga's tolerance to pH, the effect of temperature was more important. Zinc showed toxicity for the strain studied, however, when compared to other species of microalgae, the alga showed great tolerance to the metal.

Keywords: *Chlamydomonas acidophila*. Zinc toxicity. DAM. Exposure time. Analysis of variance. Heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxa de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs, determinados através da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda 750 nm. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). A temperatura foi mantida constante (22 ± 2 °C).....28
- Figura 2.** Taxa de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs, através de densidade de células (cél./L). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). A temperatura foi mantida constante (22 ± 2 °C).29
- Figura 3.** Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e tempo de exposição, avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). As diferenças estatísticas estão apresentadas na Tabela 4.31
- Figura 4.** Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e temperaturas, avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.36
- Figura 5.** Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes temperaturas e tempo de exposição, avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.....38
- Figura 6.** Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e concentrações de zinco, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas. C1 = 0,0000505, C2 = 0,0599, C3 = 0,1199, C4 = 0,2398 e C5 = 0,4796.....41
- Figura 7.** Especificação do zinco em função do pH em solução aquosa. Baseado em ERTEN-UNAL *et al.*, (1998).42
- Figura 8.** Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e tempo de exposição, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas

através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.....43

Figura 9. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes tempos de exposição e concentrações de zinco, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas. C1 = 0,0000505, C2 = 0,0599, C3 = 0,1199, C4 = 0,2398 e C5 = 0,479.....45

Figura 10. Variação dos valores de CE₅₀ de zinco para *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e diferentes tempos de exposição.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta, em duas áreas de DAM, no município de Siderópolis - SC.	21
Tabela 2. Concentração de zinco nos diferentes tratamentos utilizados nos testes de tolerância.....	26
Tabela 3. ANOVA fatorial dos dados da taxa de crescimento algal em relação às variáveis pH e tempo de exposição.....	30
Tabela 4. Resultado do teste <i>Tukey</i> , em relação a diferentes pHs e tempo de exposição. As combinações de pH e tempo que aparecem com asterisco (*) em letras iguais representam ausência de diferença significativa entre si ($p>0,05$).	31
Tabela 5. ANOVA fatorial dos dados de taxa de crescimento algal em diferentes combinações de pH, tempo de exposição e temperatura.....	35
Tabela 6. Dados da ANOVA fatorial realizada com as taxas de crescimento de <i>Chlamydomonas acidophila</i> em diferentes combinações de pH, tempo de exposição e concentração de zinco, geradas com medições da densidade óptica dos cultivos a 750 nm.....	40
Tabela 7. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre <i>Chlamydomonas acidophila</i> no tempo de exposição de 72 h.	47
Tabela 8. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre <i>Chlamydomonas acidophila</i> no tempo de exposição de 96 h.	47
Tabela 9. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre <i>Chlamydomonas acidophila</i> no tempo de exposição de 168 h.	48
Tabela 10. Comparação dos valores de CE_{50} encontrados para a cepa de <i>Chlamydomonas acidophila</i> com outros estudos, nos quais foram utilizadas a mesma ou outras espécies, a partir do tempo de exposição ao zinco de 72 e 96 horas e pH 3,6..	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CEO – Concentração de Efeito Observado

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CE₅₀ – Concentração percentual que inibe 50% da taxa de crescimento das algas

DAM – Drenagem Ácida de Minas

MAE – Meio Ácido para Euglenas

LAFIC – Laboratório de Ficologia - Microalgas da UFSC

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Microalgas	15
1.2. Algas e metais pesados	16
1.3. O gênero <i>Chlamydomonas</i>	18
1.4. Análise de dados.....	18
1.5. Pandemia COVID-19.....	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Material e métodos	21
3.1. Origem da cepa e da problemática ambiental.....	21
3.2. Procedimento de coleta e isolamento da cepa de <i>Chlamydomonas acidophila</i>	21
3.3. Teste de crescimento em diferentes valores de pH	22
3.4. Teste de crescimento em diferentes valores de temperatura.....	23
3.5. Teste de tolerância ao zinco em diferentes valores de pH.....	24
4. Análises estatísticas	26
5. Resultados e discussão	28
5.1. Experimento 1 – efeitos do pH no crescimento de <i>C. acidophila</i>	28
5.2. Experimento 2 - efeitos da temperatura no crescimento de <i>C. acidophila</i> ...	35
5.3. Experimento 3 – efeitos da toxicidade do zinco no crescimento de <i>C. acidophila</i>	39
5.4. Parâmetros ecotoxicológicos (CE ₅₀).....	46
6. CONCLUSÕES	51
7. Referências	52
Apêndice I	60
Apêndice II	61
Apêndice III	75

1. Introdução

1.1. Microalgas

O termo microalgas engloba tanto as cianobactérias como algas microscópicas eucariontes de diversos grupos (TOMASELLI, 2004). Apesar de existirem diferenças estruturais e morfológicas que permitem classificar as microalgas em diferentes divisões, estes organismos são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas (ABALDE *et al.*, 1995). São responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese (CHISTI, 2004).

Estes indivíduos, produtores primários, armazenam energia solar, convertendo-a em energia química e a biomassa das microalgas é a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos. Os constituintes deste nível trófico sintetizam nova matéria orgânica a partir de substratos inorgânicos como sais (nutrientes), CO₂ e água. Esta energia biológica é utilizada em sua maior parte como alimento pelos organismos que constituem o segundo nível trófico (consumidores primários), dando continuidade às cadeias alimentares aquáticas (VEGA, 1995; DERNER, 2006).

Fazendo uma abordagem sobre os aspectos que afetam o crescimento de uma população de microalgas, primeiramente é importante salientar que existe uma grande interdependência de parâmetros biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal (DERNER, 2006). Com relação aos fatores físico-químicos, estes dizem respeito principalmente à iluminação, temperatura e pH, regime hidrodinâmico e disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975; YONGMANITCHAI & WARD, 1991; LOURENÇO *et al.*, 2002). O efeito da intensidade da luz (irradiância ou iluminação) nos cultivos de microalgas tem sido estudado em detalhes.

É por meio da fotossíntese que as microalgas fixam o carbono necessário para a produção de biomassa, assim, a relação entre a síntese de material orgânico como reflexo da produção fotossintética pode ser expressa, principalmente, pelo incremento da população algal (BALECH, 1977). O fato de a luz variar tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente), influencia o tamanho da população (DARLEY, 1982). A luz utilizada pelas algas fotossintetizantes

encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 a 700nm, e é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Esses pigmentos são classificados em três grupos: as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, sendo que cada um difere em sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda (SUH & LEE, 2003).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes para causar influência na composição bioquímica das microalgas (RICHMOND, 2004). De acordo com Nishida e Murata (1996), um decréscimo na temperatura de cultivo abaixo do nível ótimo geralmente aumenta o grau de insaturação dos sistemas de membrana lipídica das células (que promovem as trocas com o meio). Ainda, segundo os mesmos autores, o aumento da estabilidade e fluidez das membranas celulares, particularmente as membranas tilacóides, protegem o “maquinário” fotossintético da fotoinibição (redução do crescimento celular em função do excesso de luz que cessa a fotossíntese) a baixas temperaturas, a qual influencia no aumento ou diminuição do conteúdo lipídico celular, seja por classe ou composição relativa dos lipídios (MURATA, 1989; RICHMOND, 2004).

Conforme Thompson *et al.*, (1992), uma diminuição na temperatura de cultivo abaixo do ótimo fisiológico pode resultar no aumento da produção de enzimas como um mecanismo adaptativo para manutenção das taxas fotossintéticas e respiração.

Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K). Como micronutrientes, geralmente requerem ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e cobalto (Co), enquanto que, algumas espécies também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975). Os principais elementos limitantes do crescimento são o carbono, nitrogênio, fósforo e ferro (RICHMOND, 2004; LOURENÇO, 2006).

1.2. Algas e metais pesados

Muitos corpos de água doce em todo o mundo são altamente ácidos devido a causas naturais ou atividades antrópicas como a mineração (SCHULTZE, 2013; SMUCKER *et al.*, 2014). Um dos impactos ambientais mais devastadores sobre os

ecossistemas aquáticos é ocasionado pela drenagem ácida de minas (DAM). 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).

A DAM é resultante da oxidação natural de minerais sulfetados (FeS_2) 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). Nestas condições, a diversidade biológica é restrita e dominada por organismos acidófilos e ácido tolerantes. Acredita-se que a resistência de muitas algas à DAM se deva à sua capacidade de manter metais complexos fora das células, prevenindo a sua entrada no citoplasma (NOVIS & HARDING, 2007).

A combinação de metais tóxicos e limitação de nutrientes limita a biodiversidade e pode causar danos significativos ao ecossistema (DENEKE, 2000; SMUCKER *et al.*, 2014). A avaliação dos impactos biológicos da DAM permite a quantificação dos danos da poluição, permite a compreensão dos processos fundamentais de adaptação e pode identificar espécies tolerantes à DAM que possuem aplicações biotecnológicas, como a biorremediação (ÑANCUCHEO & JOHNSON, 2011; YUN *et al.*, 2014).

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 (SCHNEIDER, 2006). Ambientes ácidos tendem a conter elevadas concentrações de metais pesados, porque a sua solubilidade aumenta acentuadamente (CAMPBELL & STOKES, 1985).

Espécies de microalgas isoladas de locais contaminados, possuem maior capacidade de remoção de metais traço em comparação com espécies isoladas de locais não contaminados (KAPLAN, 2004; DINIS *et al.*, 2004). A biota tolerante à DAM pode ter potencial para biorremediação, com processos de base biológica potencialmente mais econômicos e sustentáveis do que métodos de base química, como drenos de calcário anóxico e adição de produtos químicos (GELLER & SCHULTZE, 2013; HEDIN *et al.*, 2010; JOHNSON & HALLBERG, 2005).

1.3. 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).

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 (BOAVIDA & HEATH 1986; AGUILERA & AMILS, 2005; TITTEL *et al.*, 2005; SPIJKERMAN *et al.*, 2007; GARBAYO *et al.*, 2007; GARBAYO *et al.*, 2008). Um exemplo é *C. 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).

A ocorrência do gênero em locais afetados por DAM é conhecida e as algas do mesmo apresentam 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 pode ser considerado como uma adaptação a situações em que os nutrientes são limitados (NIXDORF *et al.*, 1998).

1.4. Análise de dados

A estatística é definida como um conjunto de métodos e técnicas que envolve todas as etapas de uma pesquisa, desde o planejamento, coordenação, levantamento de dados por meio de amostragem ou censo, aplicação questionários, entrevistas e medições com a máxima quantidade de informação possível para um dado custo, até a consistência, processamento, organização, análise e interpretação de dados para explicar fenômenos; inferência, cálculo do nível de confiança e do erro existente na resposta para uma determinada variável e disseminação das informações (IGNÁCIO, 2010).

A utilidade da estatística se expressa no seu uso, uma vez que grande parte das hipóteses científicas, independentemente da área, precisa passar por um estudo

estatístico para ser aceita ou rejeitada, como é o caso do teste de novos medicamentos, a opinião popular de novos produtos, entre outros. Na área médica, por exemplo, nenhum medicamento pode ser disponibilizado para o mercado se não tiver sua eficácia estatisticamente comprovada. O grande volume de informações produzidas pelo mundo moderno (pesquisas por amostragem, censos, internet, mercado financeiro) precisa ser analisado adequadamente. Essas análises utilizam as mais variadas técnicas estatísticas. A rigor, onde houver incerteza esta ciência pode ser empregada. Desse modo, todas as áreas do conhecimento humano a requerem como instrumento de análise de dados (PIMENTEL, 2009).

1.5. Pandemia COVID-19

Nos dois últimos anos vemos o Brasil e o mundo tendo grandes dificuldades em virtude da crise sanitária causada pela COVID-19. Muitas são as formas de contaminação pelo vírus, que possui alta taxa de transmissão e um percentual assustador de letalidade. As medidas principais para se evitar a disseminação do vírus são o uso de máscara, a higienização constante das mãos e dos materiais individuais e o distanciamento social. O distanciamento social e a quarentena têm impactado diretamente na vida de todos os brasileiros, especialmente na educação, causando o afastamento presencial de docentes e discentes. Estabelecimentos de Ensino estão com suas atividades presenciais suspensas, o que atinge milhões de estudantes em todo o país.

Dessa forma, essa monografia vem em forma de tratamentos estatísticos de dados coletados previamente, uma vez que trabalhos presenciais, de bancada e de campo, estão proibidos para alunos de graduação da UFSC desde início de 2020.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar estatisticamente os resultados de testes de crescimento de uma cepa de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs, temperaturas, tempo de exposição e concentrações de zinco.

2.2. Objetivos específicos

- Validar estatisticamente dados de crescimento e toxicidade de uma cepa de *Chlamydomonas acidophila* submetida a diferentes condições de pH, temperatura e concentração de zinco.

- Determinar os parâmetros ecotoxicológicos (CE_{50} , CEO e CENO) para uma cepa de *Chlamydomonas acidophila* em relação ao zinco.

- Verificar por análises estatísticas a influência do tempo de exposição em cultivos laboratoriais na toxicidade do zinco sobre uma cepa de *Chlamydomonas acidophila*.

3. Material e métodos

3.1. Origem da cepa e da problemática ambiental

A área de onde foi isolada a cepa e que gerou o questionamento sobre a tolerância da mesma a acidez e metais pesados está inserida na Bacia Carbonífera de Santa Catarina, localizada 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, pela classificação climática de Köeppen. A precipitação total média é 1600 mm, 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).

Foram definidos dois pontos de coleta (Tabela 1), em duas áreas de DAM, localizadas em Siderópolis - SC. O primeiro ponto (DA-01) está localizado no local onde o rejeito de mina foi aterrado e hoje é área de recuperação ambiental, enquanto o segundo ponto (DA-02) está localizado em uma drenagem de mina subterrânea abandonada.

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta, em duas áreas de DAM, 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

Fonte: Philippi (2014).

3.2. Procedimento de coleta e isolamento da cepa de *Chlamydomonas acidophila*

Amostras de DAM foram coletadas nos dois pontos em novembro de 2011 pela aluna de mestrado Vivian Philippi (PPGFAP-UFSC). Uma das sub-amostras foi adicionada juntamente com água do local em frascos de cultura de 15 mL e foi mantido

em isopor com gelo até o processamento em laboratório, enquanto a outra foi fixada com formol a 4 % e armazenada em frasco de polietileno de 400 mL, para posterior identificação. A temperatura da água e o pH no momento de coleta foram de 25 °C e 3,0, respectivamente.

Em laboratório, as amostras vivas foram imediatamente inoculadas em Meio Ácido para Euglenas (MAE; Apêndice I) (OLAVENSON & NALEWAJKO, 2000), que é seletivo para espécies acidofílicas. O pH do meio foi ajustado ao pH do local da coleta. Inoculou-se 1 mL das amostras em 100 mL de meio contidos em frascos erlenmeyer de 250 mL esterilizados, em seguida, os meios com inóculo foram incubados e mantidos no cepário do Laboratório de Ficologia - Microalgas da UFSC (LAFIC), com irradiância de aproximadamente $50 \mu \text{ moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de 22 ± 2 °C.

Os repiques dos cultivos mistos assim gerados foram realizados semanalmente transferindo alíquotas de 1 mL do concentrado algal para novos frascos erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio MAE esterilizado. A partir desse concentrado algal, foi realizado o isolamento da espécie mais abundante, sendo essa *Chlamydomonas acidophila*, sob microscópio óptico invertido marca Olympus, modelo BX-41 com uma pipeta Pasteur capilar acoplada a mangueira de silicone, pelo método de sucção. 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 100 mL de meio MAE estéril. Estabelecido o cultivo, executou-se o repique semanal, sempre transferindo 1 mL para novos frascos com meio MAE esterilizado. Todos os testes foram feitos de forma independente, de forma com que o resultado corresponda somente em relação ao teste em questão.

3.3. Teste de crescimento em diferentes valores de pH

Com o intuito de conhecer a faixa de pH ótimo de crescimento para a microalga, foram realizados experimentos de crescimento em diferentes pHs (0-14), utilizando além desses, 3,6 como pH de controle, uma vez que o meio MAE nos cultivos de manutenção apresenta esse pH. Para cada valor de pH, foram preparados frascos em

triplicatas em meio de cultura MAE e inoculou-se 1 mL de cultivo saudável em cada frasco teste.

Os frascos foram vedados com filme plástico e mantidos em um agitador orbital para 30 frascos (Marconi MA140) sob iluminação uniforme de aproximadamente $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por até 168 h, 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 absorbância em espectrofotômetro (750 nm) e contagem de células por mililitro em câmaras de Sedgewick-Rafter (UNESCO, 2010). A partir dos dados obtidos foram calculadas as taxas de crescimento por meio da equação de crescimento com logaritmo natural (Equação 1).

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (1)$$

onde,

μ = taxa de crescimento ($\mu\text{m.dia}^{-1}$);

N_0 = valor inicial da VIB;

N_n = valor final da VIB; e

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

3.4. Teste de crescimento em diferentes valores de temperatura

Para conhecer a faixa de temperatura preferencial da cepa isolada, foram realizados testes de crescimento em diferentes temperaturas (15°C , 22°C , 30°C e 40°C) e diferentes pHs (3,6; 4 e 5). Esses valores de pHs foram selecionados com base nos valores de pH de maior crescimento da cepa definidos em experimento prévio. A determinação de biomassa inicial e final dos testes foi realizada por leitura da absorbância em espectrofotômetro (750 nm) e com esses dados foram calculadas as taxas de crescimento algal através da equação de crescimento exponencial apresentada.

3.5. Teste de tolerância ao zinco em diferentes valores de pH

A toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto, além do tempo de exposição (RAND *et al.*, 1995). 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, sendo esses 3,6; 6; 7 e 8. Dessa forma, seria possível, ainda, verificar a solubilidade do metal em pHs ácidos, neutro e alcalino. Entretanto, ao decorrer das análises, verificou-se que alguns dados dos testes com concentração de zinco, feitos através da contagem de célula por câmara de Sedgewick-Rafter, apresentavam erros. Dessa forma, para o presente estudo utilizaram-se somente os dados obtidos por meio do espectrofotômetro de 750 nm.

As concentrações do teste 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 $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância e à temperatura de 22 ± 2 °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 72 h, 96 h e 168 h.

A inibição do crescimento microalgal foi medida por meio dos parâmetros bióticos de densidade óptica em comprimento de onda de 750 nm (Espectrofotômetro UV- visível Global Analyzer) e de densidade de células (contagem em câmara de Sedgewick-Rafter). Esses parâmetros bióticos foram medidos nos tempos de 0, 72, 96 e 168 horas, sendo 0 a medida no tempo inicial após a inoculação das algas nos diferentes tratamentos.

Utilizando-se os dados iniciais e finais de cada amostragem, calcularam-se as taxas de crescimento algal através da equação de crescimento exponencial (Equação 1). As taxas de crescimento das amostras foram comparadas com as taxas de crescimento do controle, gerando, para cada amostra, um valor de percentual de inibição em relação ao controle (Equação 2).

$$l_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$l_{\mu i}$: percentagem de inibição para o teste na concentração i ;

μ_i : taxa de crescimento médio para o teste na concentração i ;

μ_c : taxa de crescimento para o controle.

Os dados de inibição foram analisados estatisticamente e utilizados para definição da maior concentração do efluente que se apresentou significativamente igual ao controle (CENO - concentração de efeito não observado) e da menor concentração do efluente que se apresentou efetiva (CEO - concentração de efeito observado). Os dados de inibição foram também utilizados para o cálculo da Concentração Efetiva Mediana (CE₅₀), que é a concentração percentual que inibe 50% da taxa de crescimento das algas, considerando-se os controles como referência. Esse cálculo foi realizado através do método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977), utilizando o Quest Graph™ LD50 Calculator.

Tabela 2. Concentração de zinco nos diferentes tratamentos utilizados nos testes de tolerância.

Tratamento	Concentração de ZnCl ₂ (g/L)	Concentração molar (μmol)	Concentração de Zn (g/L Zn)
C1 (controle)*	-	0,772	0,0000505
C2	0,125	916,93	0,0599
C3	0,200	1.834,19	0,1199
C4	0,500	3.668,38	0,2398
C5	1,000	7.336,76	0,4796

*Sem adição de ZnCl₂. No meio de cultura há adição de ZnSO₄.7H₂O.

Fonte: Philippi (2014).

4. Análises estatísticas

Os dados de crescimento nas diferentes condições descritas foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA). A ANOVA trata-se de um teste que verifica a igualdade (ou não) dos valores esperados (médias) de uma determinada variável de interesse nas k subpopulações de interesse. Para que a ANOVA seja atendida, os dados devem se enquadrar em 3 principais critérios (DIEZ *et al.*, 2015):

1. Observações independentes;
2. Normalidade na distribuição dos dados;
3. Homogeneidade das variâncias.

Assim, os dados de crescimento dos diferentes testes foram analisados quanto a esses critérios, incluindo testes de normalidade e homogeneidade de variância. Uma vez confirmada a independência de observações, a normalidade e a homogeneidade, foram executadas análises de variância fatorial, pois mais do que uma variável foi avaliada ao mesmo tempo nos diferentes experimentos: pH X tempo de exposição, pH X temperatura X tempo de exposição, concentração de zinco X pH X tempo de exposição.

A suposição de normalidade é especialmente crítica ao construir intervalos de referência para variáveis. A normalidade e outras premissas devem ser levadas a

sério, pois, quando essas premissas não se sustentam, é impossível traçar com precisão erros estatísticos que são comuns na literatura científica e cerca de 50% dos artigos publicados apresentam pelo menos um erro. O pressuposto de normalidade deve ser verificado para muitos procedimentos estatísticos, nomeadamente testes paramétricos, porque a sua validade depende disso (GHASEMI & ZAHEDIASL, 2012).

Para análise de homogeneidade, fez-se o teste de Cochran por meio de análise das variâncias máximas e médias, uma vez que dessa forma foi possível encontrar os possíveis outliers entre as réplicas e os corrigi-los através da média entre os outros dois valores da réplica. Após a correção, encontrou-se o valor de c-crítico e comparou-o com o valor da tabela de Cochran (Apêndice III), o qual tem intervalo de significância de 5%, para conferir se os dados são homogêneos. Para análise de distribuição normal, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk (1965) no qual a distribuição é considerada normal quando o $p > 0,05$, caso contrário, a distribuição é considerada não-normal. Todos os dados foram considerados homogêneos e normais.

Após a análise de variância (ANOVA), é necessário a utilização de algum teste *Post-Hoc* para a determinar os parâmetros que diferem de forma significativa no crescimento da alga. Para tal, fez-se o teste Tukey, o qual:

- 1- Identificou as diferenças significativas de crescimento entre os pHs e tempos de exposição;
- 2- Identificou as diferenças significativas de crescimento entre pHs, tempos de exposição e temperatura para o crescimento da alga;
- 3- Identificou as diferenças significativas de crescimento entre pHs, tempos de exposição e concentrações de zinco para o crescimento da alga.

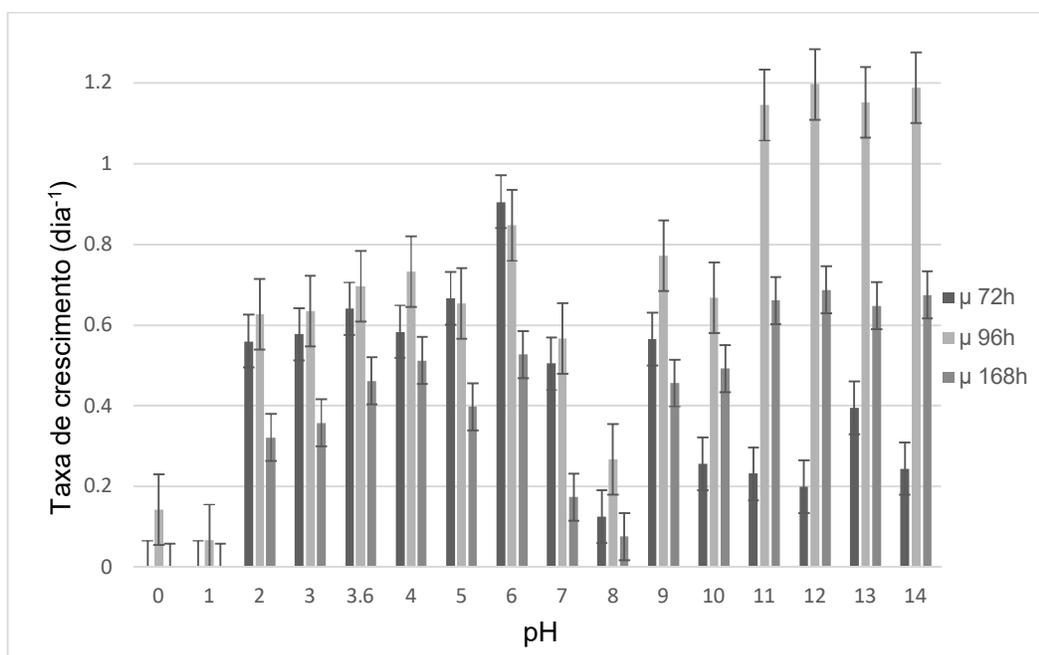
O teste *Post-Hoc* foi feito com o maior nível de similaridade entre os parâmetros, de forma com que somente as maiores interações entre os parâmetros fossem levadas em consideração. Todas as análises foram feitas nos *softwares* Statistica e Excel e os gráficos no SigmaPlot e Excel.

5. Resultados e discussão

5.1. Experimento 1 – efeitos do pH no crescimento de *C. acidophila*

Os resultados obtidos por meio dos diferentes métodos de quantificação da biomassa (densidade óptica a 750 nm e densidade de células) estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Taxa de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs, determinados através da densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda 750 nm. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). A temperatura foi mantida constante (22±2 °C).

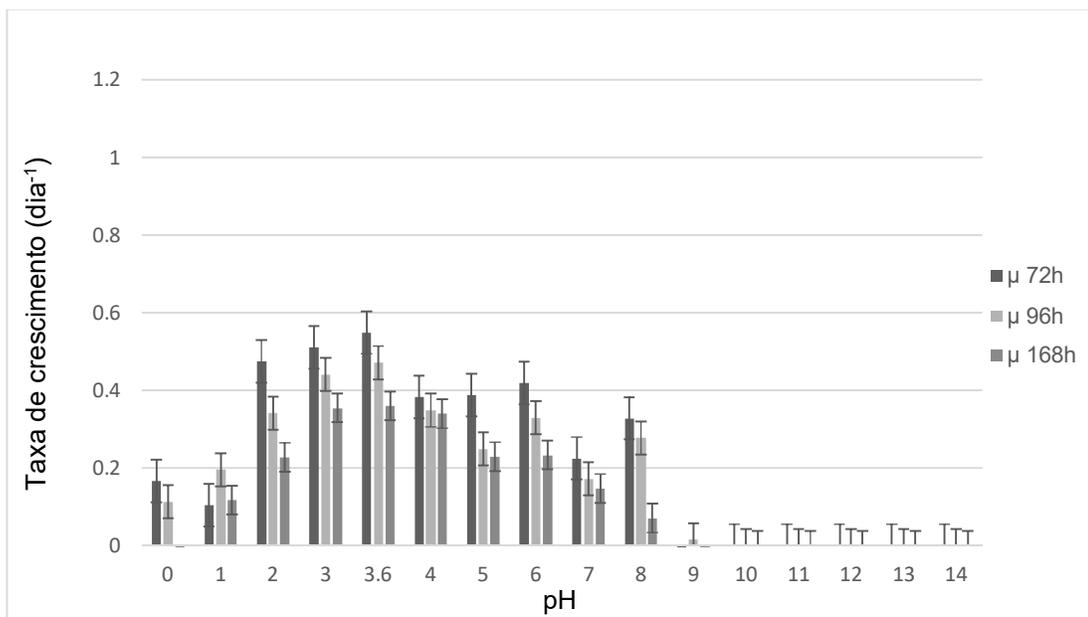


Fonte: Autora (2021).

Através do método de densidade óptica por espectrofotômetro de 750 nm (Figura 1), foi possível identificar dois picos de crescimento algal, sendo o primeiro entre os pHs 2 e 6, e o segundo, entre o pH 9 e o pH 14. Em sua maioria, o máximo de crescimento algal ocorreu no tempo de exposição de 96 h, com exceção dos pHs 5 e 6, em que esse máximo ocorreu no tempo de 72 h. Ainda, as menores taxas de crescimento ocorreram nos pHs 0, 1, 7 e 8, onde nos pHs 0 e 1 só houve crescimento no tempo de exposição de 96 h. As maiores taxas, entretanto, foram verificadas nos pHs 11, 12, 13 e 14, no tempo de exposição de 96 h.

Quando utilizada a densidade de células como parâmetro de crescimento, observou-se que a cepa de *C. acidophila* cresceu em todo o intervalo entre os pHs 0 e 9, entretanto tendo crescimento mínimo no pH 9 e tempo de exposição de 96 h e não tendo crescimento nos pHs subsequentes (Figura 2). Ainda, a taxa de crescimento algal foi ótima no pH 3,6 e apresentou um crescimento considerável entre os pH 2 e 6, demonstrando que apesar da grande tolerância a diferentes valores de pH, a espécie teve uma boa taxa de crescimento nos menores pHs, conferindo a característica de uma espécie acidofílica. O tempo de exposição de 72 h apresentou o melhor intervalo de tempo para o crescimento da alga, sendo esse superior aos demais tempos de exposição em todos os pHs, com exceção do pH 1, em que a alga teve seu crescimento máximo no tempo de 96 h.

Figura 2. Taxa de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs, através de densidade de células (cél./L). As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). A temperatura foi mantida constante (22±2 °C).



Fonte: Autora (2021).

Analisando esses resultados e o aspecto das amostras, verificou-se que os dados de crescimento avaliados por espectrofotometria não puderam ser validados, pois em pHs maiores que 8 as amostras turvaram em função da precipitação de metais, como verificado anteriormente por Naja & Volesky, (2009), interferindo na

leitura por espectrofotometria. Assim, a avaliação estatística foi realizada somente para os dados obtidos com contagem de células (densidade de células, cél./L).

Ainda, apesar da contagem de células necessitar de maior habilidade e treinamento do cientista, bem como demandar mais tempo para a análise, este trabalho enfatiza a importância de estudos futuros considerarem o método de análise em condições em que o pH é alcalino. Para pHs ácidos, entretanto, a avaliação por densidade óptica (espectrofotometria) é eficiente e recomendável, como pôde ser verificado através da similaridade de caráter acidofílico apresentado pela espécie em ambos os testes.

A Tabela 3 mostra o resultado obtido através da ANOVA fatorial, no qual identifica que além da variável pH ($p = 0,000000$) e da variável tempo ($p = 0,000000$), a interação entre as variáveis também influencia na taxa de crescimento da alga ($p = 0,030317$). O resultado do teste *Post-Hoc Tukey* está representado na Figura 3 e na Tabela 4, de forma complementar.

Tabela 3. ANOVA fatorial dos dados da taxa de crescimento algal em relação às variáveis pH e tempo de exposição.

	Degr. of Freedom	SS	MS	F	p
Intercept	1	6,400608	6,400608	1235,219	0,000000
pH	10	2,148763	0,214876	41,468	0,000000
Tempo	2	0,307150	0,153575	29,638	0,000000
pH*Tempo	20	0,193798	0,009690	1,870	0,030317
Error	66	0,341996	0,005182		
Total	98	2,991707			

Fonte: Autora (2021).

0	96h	*	*	*	*	*	*	*	*							
1	168h	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
7	168h	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
0	72h		*	*	*	*	*	*	*	*	*					
7	96h		*	*	*	*	*	*	*	*	*					
1	96h			*	*	*	*	*	*	*	*	*				
7	72h				*	*	*	*	*	*	*	*	*			
2	168h				*	*	*	*	*	*	*	*	*			
5	168h				*	*	*	*	*	*	*	*	*			
6	168h				*	*	*	*	*	*	*	*	*			
5	96h					*	*	*	*	*	*	*	*	*		
8	96h					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
8	72h						*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6	96h						*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	168h							*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	96h							*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	96h								*	*	*	*	*	*	*	*
3	168h									*	*	*	*	*	*	*
3,6	168h									*	*	*	*	*	*	*
4	72h										*	*	*	*	*	*
5	72h										*	*	*	*	*	*
6	72h											*	*	*	*	*
3	96h											*	*	*	*	*
3,6	96h												*	*	*	*
2	72h												*	*	*	*
3	72h													*	*	*
3,6	72h														*	*

Fonte: Autora (2021).

A cepa apresentou crescimento em todos os pHs de 1 a 8, corroborando com os resultados obtidos anteriormente Spijkerman, (2005), onde o mesmo verificou, ainda, que a espécie apresentou dois máximos de crescimento distintos, um em pH 3

e outro em pH 5-6. A cepa de *C. acidophila* estudada demonstrou, entretanto, crescimento no pH 0 e tempo de exposição de 72 e 96 h e no pH 9 e tempo de exposição de 96 h, onde esses dois não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram crescimento menos eficiente quando comparados aos demais. Esses resultados são comparativamente semelhantes aos descritos para a alga isolada de um floco vulcânico no Japão, onde a apresentou crescimento entre os pHs 1 e 9 (SATAKE & SAIJO, 1974; NISHIKAWA & TOMINAGA, 2001). Chen *et al.*, 2017 verificaram anteriormente que cada microrganismo possui um pH ideal para seu crescimento, e as taxas de crescimento do mesmo diminuem à medida que o pH se desvia dele.

As taxas de crescimento entre os pHs 2 e 6 foram consideravelmente altas, onde apresentaram semelhança significativa entre todas as combinações pH-tempo de exposição, com exceção das combinações pHs 2, 5 e 6 e tempo de exposição de 168 h e pH 5 no tempo de exposição de 96 h. Por meio dos testes estatísticos foi possível avaliar de forma integrada os fatores de influência no crescimento (pH e tempo de exposição), mostrando que, embora aparentemente haja diferenças nas taxas de crescimento, várias delas não mostraram diferenças estatísticas entre si.

Apesar de aparentemente haver um máximo de crescimento algal, a estatística mostrou que não é significativamente diferente. Dessa forma, o melhor intervalo de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* ocorreu no intervalo entre os pHs 2 e 6. Esse máximo crescimento nos pHs ácidos pode estar relacionado a aclimatação da cepa a esse pH e a quantidade de nutriente disponível. De acordo com Hargreaves & Whitton (1976), Lane & Burris (1981) e Gensemer *et al.*, (1993), condições extremas de pH influenciam a fotossíntese, crescimento e assimilação de nutrientes em algas, e para muitas espécies de algas, uma gama de valores externos de pH em que o crescimento ideal é realizado, se correlaciona com as condições de pH do lago do qual a espécie foi isolada. Assim, grande parte dos organismos isolados de áreas impactadas sofreram algum tipo de seleção através de adaptações genéticas para que prosperassem nesses ambientes.

O menor valor de taxa de crescimento encontrado ocorreu no pH 9 e tempo de exposição 168 h, sendo este significativamente equivalente ao pH 9 em 72 h e 96 h, pH 0 em 168 h e 96 h, todas as combinações entre o pH 1 e os tempos de exposição e com os pHs 7 e 8 no tempo de 168 h. Comparando estes resultados com os

resultados obtidos para o intervalo entre os pHs 2 e 6, pode-se confirmar que a cepa de *C. acidophila* cresce numa gama elevada de pHs do neutro ou levemente alcalino ao bem ácido, mas não mostra muita tolerância a pHs alcalinos. 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 desta espécie. De acordo com Johnson (1998) e Grimmer (2001), microalgas que possuem pH ótimo de crescimento menor ou igual a 3 são consideradas acidofílicas, enquanto aquelas que podem crescer num pH abaixo de 4, mas vivem em pH neutro e fracamente alcalino são conhecidas como acidotolerantes. Dessa forma, a alga *C. acidophila* pode ser caracterizada como uma alga acidofílica e acidotolerante.

Em relação ao tempo de exposição, foi possível verificar que conforme aumenta-se o tempo de exposição da alga, independentemente do pH, a taxa de crescimento diminui, sendo máxima em 72 h em todos os pHs, com exceção dos pHs 1 e 9. Dessa forma, pode-se supor que além de haver um fator relacionado ao eventual estresse do pH não ideal para o crescimento da alga, o maior tempo de exposição gera o efeito esperado de menor crescimento por provável esgotamento de nutrientes e redução da irradiância por auto-sombreamento. Dean *et al.*, (2019) verificaram através de estudos em lagoas contendo água de DAM que a densidade celular de *C. acidophila* foi amplamente diferenciada quando comparadas lagoas que possuíam alta com aquelas que possuíam baixa disponibilidade de nutriente, principalmente fosfato inorgânico ($PO_4\text{-P}$), sugerindo limitação do crescimento devido à baixa disponibilidade de $PO_4\text{-P}$. Outros estudos mostraram altos níveis de $PO_4\text{-P}$ associados a lagos ácidos em áreas com abundantes minerais FeS contendo $PO_4\text{-P}$ (SPIJKERMAN, 2008). Assim, pode-se supor que um dos fatores que influencie na presença de *C. acidophila* em áreas de DAM, seja a disponibilidade desse nutriente. Ainda, se o resultado dos testes é satisfatório já em 72 h, é preferível que sejam feitos testes de toxicidade com esse tempo de exposição, para evitar possíveis interferência de esgotamento de nutrientes e irradiância.

5.2. Experimento 2 - efeitos da temperatura no crescimento de *C. acidophila*

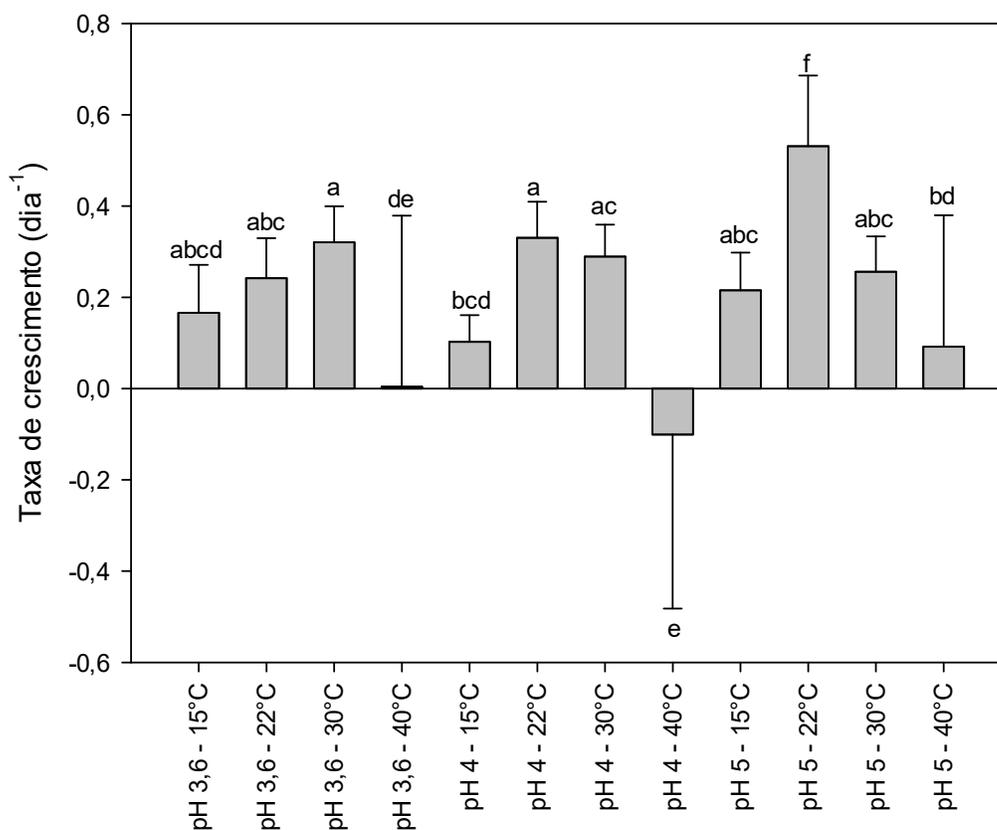
A Tabela 5 apresenta o resultado da ANOVA fatorial em relação às variáveis pH, tempo de exposição e temperatura, utilizados no teste da taxa de crescimento algal. Para tal, foi possível verificar que a interação entre as três variáveis não influenciou no crescimento algal ($p = 0,380709$) mas a interação entre duas variáveis, sim, sendo essas: pH*temperatura ($p = 0,007824$) e temperatura*tempo ($p = 0,000000$). Ainda, a interação entre pH*tempo ($p = 0,507288$) não foi significativa. Dessa forma, fez-se o teste *Post-Hoc* apenas para as interações entre as variáveis que tiveram $p < 0,05$. O resultado do teste *Tukey*, em relação às variáveis pH e temperatura, está representado na Figura 4.

Tabela 5. ANOVA fatorial dos dados de taxa de crescimento algal em diferentes combinações de pH, tempo de exposição e temperatura.

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	4,874764	1	4,874764	254,6426	0,000000
ph	0,417181	2	0,208591	10,8961	0,000073
temperatura	1,757951	3	0,585984	30,6100	0,000000
tempo	1,069438	2	0,534719	27,9321	0,000000
ph*temperatura	0,452795	6	0,075466	3,9421	0,001833
ph*tempo	0,056087	4	0,014022	0,7325	0,572785
temperatura*tempo	1,285380	6	0,214230	11,1907	0,000000
ph*temperatura*tempo	0,265005	12	0,022084	1,1536	0,332773
Error	1,378336	72	0,019144		

Fonte: Autora (2021).

Figura 4. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e temperaturas, avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.



Fonte: Autora (2021).

Diferentemente dos resultados obtidos por meio do teste que considerou somente as variáveis pH e tempo de exposição, onde o máximo crescimento algal ocorreu no intervalo entre os pHs 2 e 6, quando considerada também a temperatura, a maior taxa de crescimento ocorreu no pH 5 e na temperatura de 22° C, sendo essa a combinação com maior diferença significativa em relação às demais (Figura 4). Como citado anteriormente, Spijkerman, (2005) verificou que a alga *C. acidophila* cresce no intervalo de pHs entre 1 e 8, tendo dois máximos de crescimento distintos: um em pH 3 e outro em pH 5-6. Possivelmente, sob condições de estresse acarretados da junção pH e temperatura, o crescimento algal no pH 5 foi menos prejudicado. Ainda, sob essas condições de pH, o efeito relativo da temperatura, em

todas as temperaturas, foi menor. Como relatado por Moser & Weisse, (2011), perto do limite inferior e superior de tolerância ao pH, o efeito da temperatura é mais importante, estreitando a largura do nicho de pH para espécies flageladas, caso a temperatura se torne desfavorável. Assim, nos pHs mais baixos, o efeito da temperatura foi mais marcante.

De forma contrastante, a combinação de fatores menos satisfatória para a alga ocorreu na temperatura de 40° C e pH 4, onde a taxa de crescimento foi negativa. Gerloff-Elias *et al.*, (2006) verificaram anteriormente que para *C. acidophila*, a ótima temperatura de crescimento é em torno de 20° C, e temperaturas a partir de 39° C representam temperaturas letais, corroborando com o que foi verificado no presente estudo. Entretanto, comparativamente, há evidências contraditórias sobre a temperatura ótima para *C. acidophila*. As duas cepas usadas nos estudos de Moser & Weisse (2011), mostraram taxas de crescimento relativamente altas a 25° C, mas não puderam ser aclimatadas a 27,5° C e acima de 30° C, o número de células de ambas as cepas diminuiu rapidamente. Neste estudo, entretanto, o crescimento da alga foi satisfatório na temperatura de 30 °C, apresentando o segundo melhor valor de taxa de crescimento para a alga, em todos os pHs. Ainda, as combinações entre os pHs e essa temperatura não apresentaram diferença significativa entre si. Pollio *et al.*, (2005), verificou crescimento positivo de cepas de *C. acidophila* de diferentes localidades até a temperatura de 34° C, com uma temperatura ótima de 26° C.

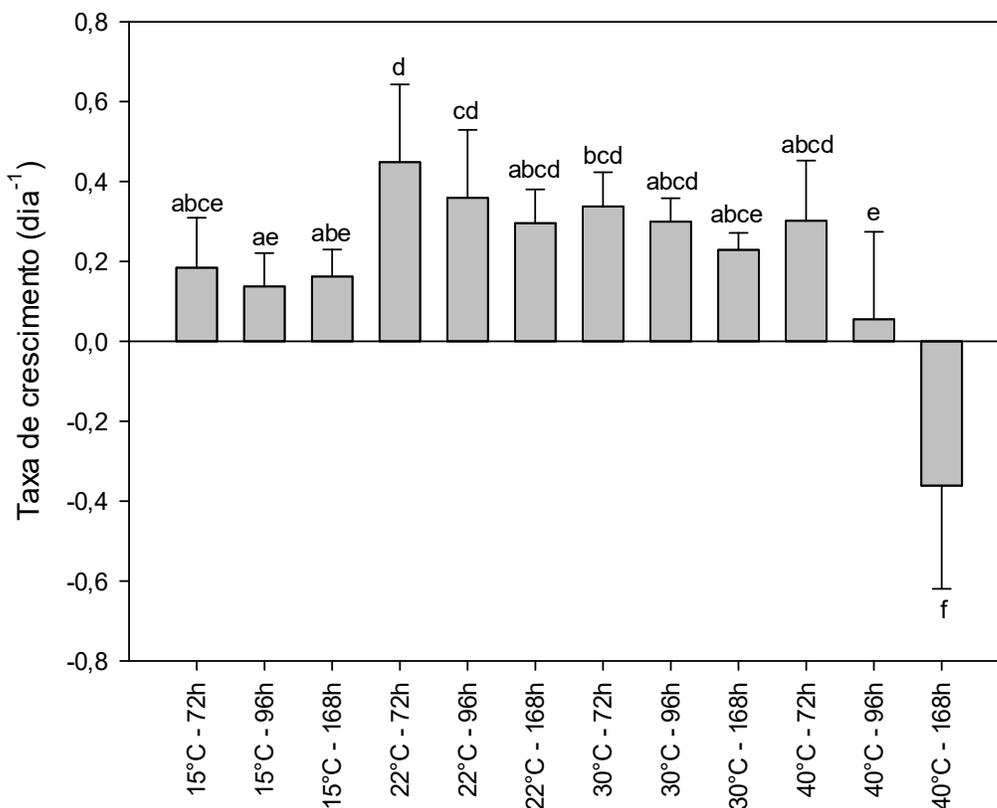
Na temperatura de 15 °C, ainda, todas as combinações entre pHs e essa temperatura apresentaram semelhança significativa entre si, demonstrando que nesse caso, independente do pH, a temperatura foi semelhantemente prejudicial para o crescimento da alga, sendo essa a segunda temperatura menos satisfatória para o crescimento da algal.

Em todas as combinações entre os pHs e a temperatura de 40 °C, o valor da taxa de crescimento para a alga foram mínimos, quando comparado com as outras temperaturas. A combinação pH 3,6 e temperatura de 40 °C, que praticamente não apresentou taxa de crescimento, não diferiu significativa das demais combinações entre pHs e temperatura de 40 °C, sendo pH 4 e 40° C e pH 5 e 40° C. Apesar de não apresentar diferença significativa, a combinação de pH 3,6 e 40 °C apresentou diferenças visível nas taxas de crescimento quando comparada às demais, onde a

mesma apresentou crescimento próximo a 0 e as outras, negativa e positiva, respectivamente.

O resultado do teste *Tukey*, em relação às variáveis temperatura e tempo de exposição, está representado na Figura 5.

Figura 5. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes temperaturas e tempo de exposição, avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.



Fonte: Autora (2021).

Em relação às variáveis tempo de exposição e temperatura (Figura 5), a taxa de crescimento da alga na temperatura de 15 °C e tempo de exposição de 72 h não foi significativamente diferente de todas as combinações, com exceção das combinações entre 22 °C e 72 h, 22 °C e 96 h, 40 °C 96 e 168 h.

Aparentemente, a combinação de fatores que apresentou melhores condições para o crescimento da alga ocorreu entre a temperatura de 22 °C e o tempo de exposição de 72 h. Entretanto, essa combinação não apresentou diferença significativa em relação as combinações entre a temperatura de 22 °C em 96 e 168 h, 30 °C em 72, 96 e 168 h e 40 °C em 72 h. Ainda, considerando somente o tempo de exposição de 72 h, as temperaturas 22° C, 30° C e 40° C não apresentaram diferença significativa entre si, podendo então demonstrar que além da temperatura, como já citado anteriormente por Gerloff-Elias *et al.*, (2006), o tempo de exposição também influencia na taxa de crescimento algal para *C. acidophila*. Essa influência pode estar relacionada com limitação por nutrientes em maiores tempos de exposição, além de eventual limitação por luz devido ao auto-sombreamento e química da água.

Em contraste, a combinação entre a temperatura de 40 °C e o tempo de exposição de 168 h foi a menos favorável para o crescimento da alga, sendo essa a combinação mais diferente significativamente das demais e a única combinação em que a taxa foi negativa. Nas temperaturas mais favoráveis para a alga (22°C e 30°C), ocorreu um padrão de leve diminuição na taxa de crescimento da alga conforme o tempo de exposição aumentou. Entretanto, na temperatura de 40° C essa queda foi abrupta, onde no tempo de exposição de 72 h a taxa foi positiva, em 96 h foi quase zero e em 168 h, negativa. Assim, podemos verificar que o efeito do tempo de exposição se torna mais abrupto em temperaturas que não são favoráveis para a alga.

Ainda, na temperatura de 40° C ocorreu a exceção entre as demais, onde todos os tempos de exposição apresentaram diferença significativa entre si.

5.3. Experimento 3 – efeitos da toxicidade do zinco no crescimento de *C. acidophila*

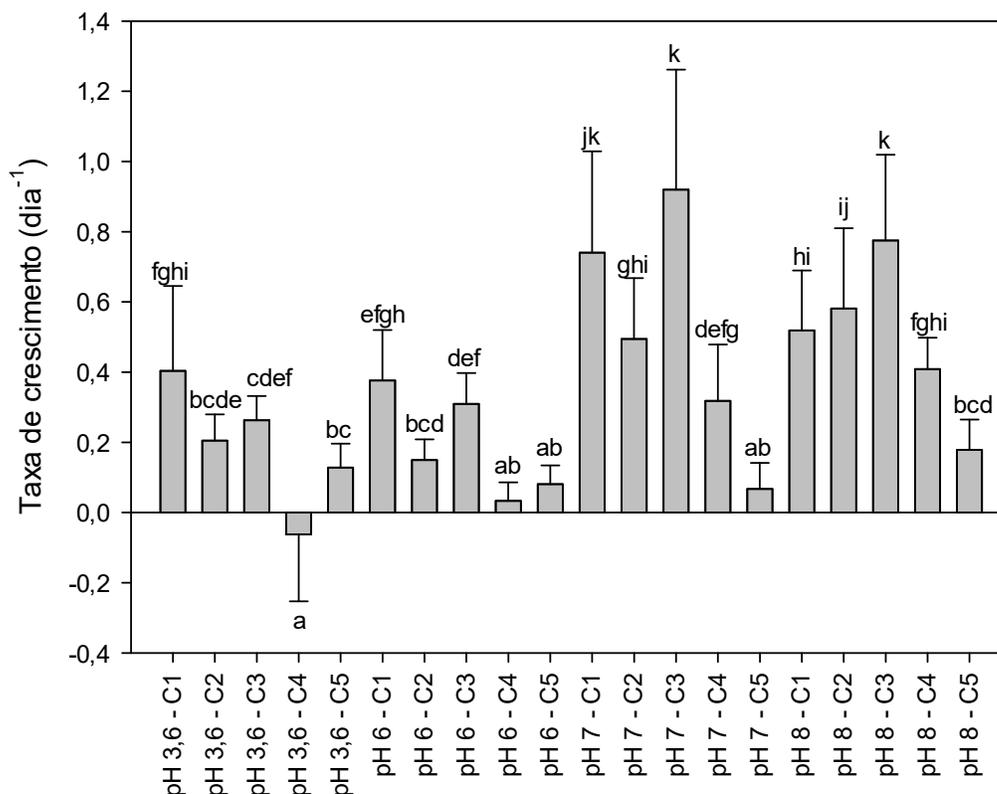
Os resultados da ANOVA fatorial (Tabela 6) mostraram que o pH, o tempo de exposição e a concentração de zinco interferem no crescimento da alga, mas a interação entre os três parâmetros, não ($p = 0,084127$). Dessa forma, fez-se o teste Tukey para o próximo nível mais alto de interação entre as variáveis, sendo esses: pH*concentração ($p = 0,000000$), pH*tempo ($p = 0,000000$) e concentração*tempo ($p = 0,000000$). Os resultados estão representados nas Figuras 6, 8 e 9 respectivamente.

Tabela 6. Dados da ANOVA fatorial realizada com as taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes combinações de pH, tempo de exposição e concentração de zinco, geradas com medições da densidade óptica dos cultivos a 750 nm.

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	21,33772	1	21,33772	1927,296	0,000000
pH	4,37570	3	1,45857	131,743	0,000000
concentração	5,72304	4	1,43076	129,231	0,000000
tempo	1,04517	2	0,52258	47,202	0,000000
pH*concentração	1,95676	12	0,16306	14,728	0,000000
pH*tempo	0,98788	6	0,16465	14,871	0,000000
concentração*tempo	0,77147	8	0,09643	8,710	0,000000
pH*concentração*tempo	0,39555	24	0,01648	1,489	0,084127
Error	1,32856	120	0,01107		

Fonte: Autora (2021).

Figura 6. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e concentrações de zinco, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas. C1 = 0,0000505, C2 = 0,0599, C3 = 0,1199, C4 = 0,2398 e C5 = 0,4796.



Fonte: Autora (2021).

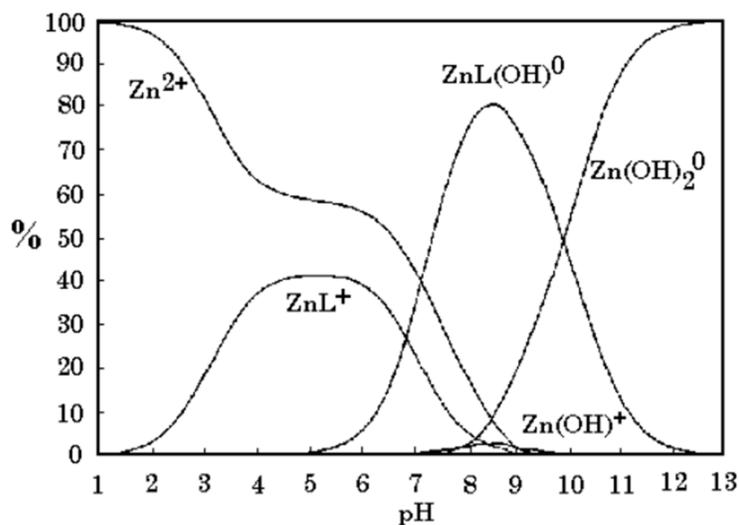
A partir da interação entre as variáveis pH e concentração de zinco (Figura 6), verificou-se que no pH 6 o crescimento da alga nas concentrações C4 e C5 foram estatisticamente equivalentes entre si, e ainda, com a combinação pH 7 e concentração C5. Na combinação pH 6 e C2 o crescimento foi estatisticamente equivalente a combinação pH 8 e C5. A menor taxa de crescimento ocorreu no pH 3,6 e C4, que mesmo apresentando um valor negativo, mostrou equivalência estatística com as combinações pH 6 e C4, pH 6 e C5 e pH 7 e C5.

A exposição de *C. acidophila* a todas as concentrações de zinco, em termos de crescimento ao longo de um período de 72, 96 e 168 h, demonstra claras diferenças

na taxa de crescimento algal entre controles e experimentos nos quais microalgas foram expostas a metais tóxicos. Além disso, a inibição do crescimento foi essencialmente proporcional à concentração do metal.

A taxa de crescimento algal variou bastante quando comparados os pHs ácidos e os pHs neutro e alcalino; enquanto nos menores pHs a concentração de zinco C4 representou os menores valores de crescimento para a alga, nos maiores pHs, isso ocorreu na concentração C5. A partir desses resultados podemos supor que em pHs mais ácidos, uma menor concentração de zinco já interfere no crescimento da alga. Campbell & Stokes (1985) demonstraram anteriormente que em ambientes ácidos, é provável que haja uma maior concentração de metais pesados, uma vez que a solubilidade dos mesmos, em geral, aumenta acentuadamente, representando maior biodisponibilidade. 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).

Figura 7. Especificação do zinco em função do pH em solução aquosa. Baseado em ERTEN-UNAL *et al.*, (1998).

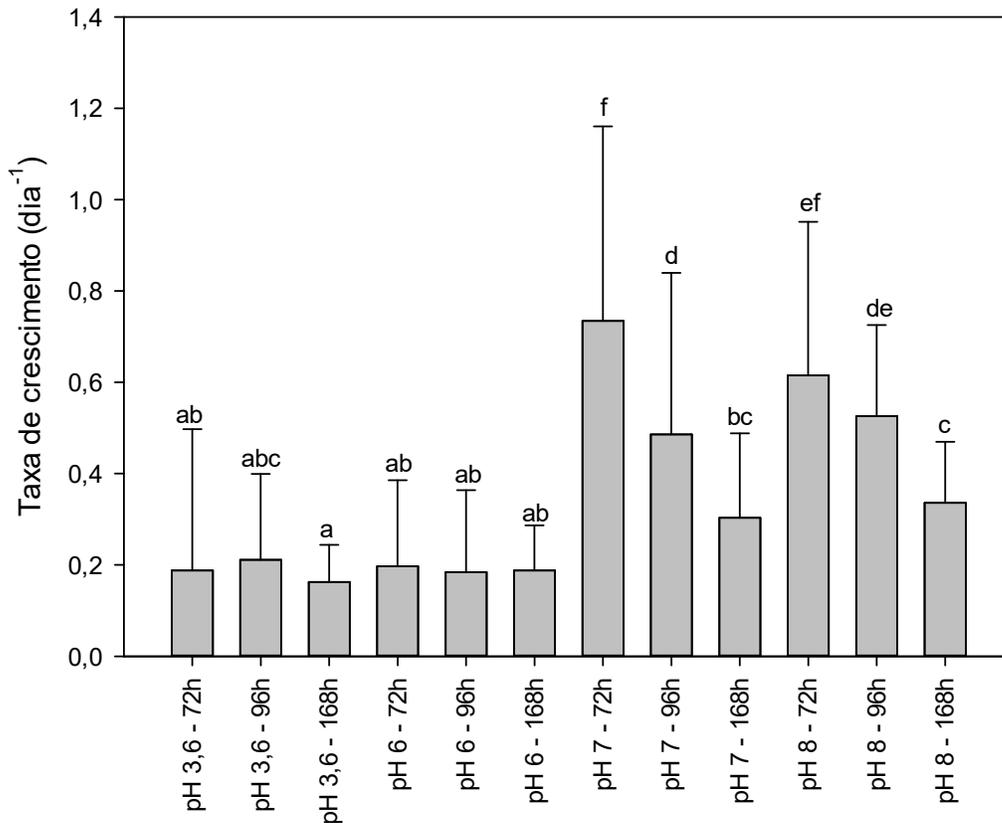


Fonte: Philippi (2014).

As combinações entre a concentração C3 e os pHs 7 e 8 só foram significativamente semelhantes entre si e entre a concentração C1 no pH 7, as quais apresentaram os maiores valores de taxa de crescimento da alga *C. acidophila*. Esse

resultado corrobora com Erten-unal *et al.*, (1998), que demonstrou que graças a especiação do zinco em função do pH, esse metal fica mais dissolvido e biodisponível em baixos pHs e tende a ficar insolúvel, na forma de hidróxidos especialmente em pHs acima de 7, e dessa forma, sendo mais tóxico para os organismos nos menores pHs.

Figura 8. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e tempo de exposição, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas.



Fonte: Autora (2021).

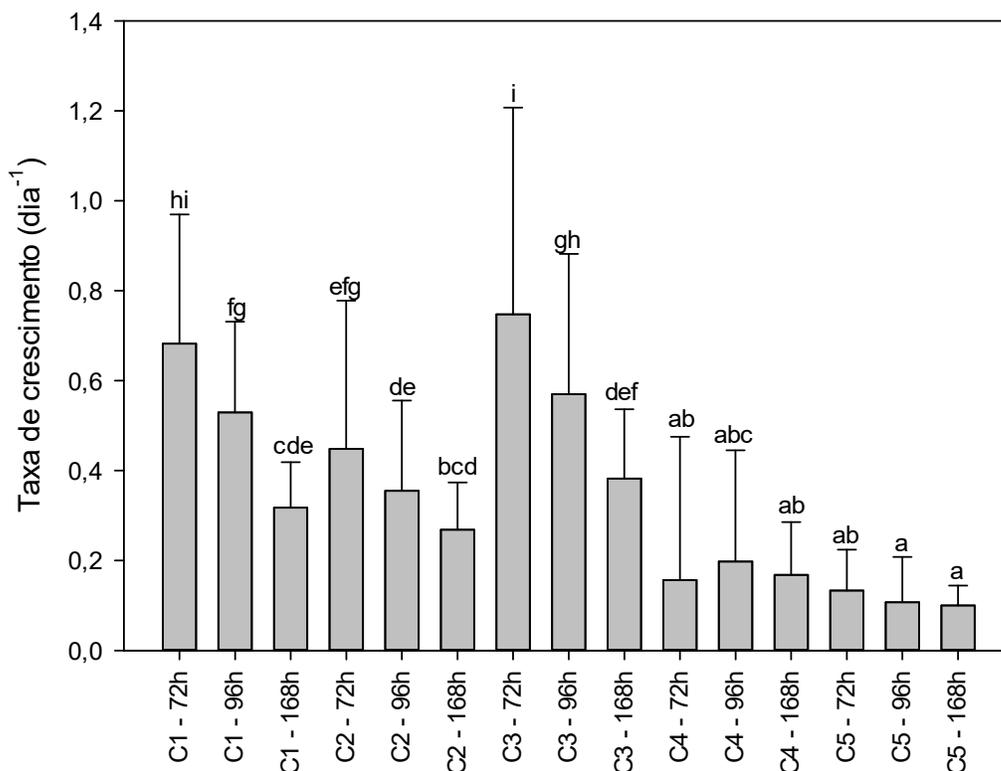
Essa especiação do zinco pode ser exemplificada pela Figura 7, onde verifica-se que nos menores pHs o zinco está mais presente na forma de cátion (Zn^{2+}), no qual ele é mais solúvel e está mais biodisponível, sendo assim mais facilmente

absorvido pela alga. Em pHs mais elevados, o zinco assume outras formas, que são menos solúveis e, portanto, menos biodisponíveis, diminuindo a possibilidade de absorção desse metal pelo organismo. Dessa forma, em pHs maiores, a toxicidade do zinco para a alga é mascarada em função da sua especiação relacionada ao pH.

Considerando a interação entre as variáveis pH e tempo de exposição (Figura 8), nos pHs 3,6 e 6 o crescimento não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos de exposição, ainda que o menor crescimento entre todos os tratamentos esteve representado na combinação pH 3,6 e 168 h. A maior taxa de crescimento algal, entretanto, ocorreu na combinação pH 7 e 72 h, sendo estatisticamente equivalente à combinação pH 8 e 72 h. Esses valores de pH também não diferiram significativamente entre si quando considerados no tempo de exposição de 96 h.

À medida que o tempo de exposição da alga ao metal aumentou, sua taxa de crescimento diminuiu, sendo máximo no tempo de 72 h e mínimo no tempo de 168 h em todos pHs, com exceção do pH 3,6, onde a maior taxa ocorreu no tempo de exposição de 96h. Schneider (2006) verificou que os metais podem oxidar-se rapidamente, convertendo-se às formas solúveis, situação em que são particularmente perigosos. Ainda, conforme citado anteriormente por Erten-unal *et al.*, (1998), graças a especiação do zinco em função do pH, o metal fica mais dissolvido e biodisponível em baixos pHs e tende a ficar insolúvel em pHs acima de 7, dessa forma, sendo mais tóxico para os organismos nos menores pHs. Assim, o presente estudo pôde verificar os efeitos conjuntos da toxicidade do zinco em função dos pHs e da influência do tempo de exposição ao zinco para o crescimento da alga *C. acidophila*. Além disso, verificou-se que em pH neutro e alcalino o tempo de exposição influenciou mais o crescimento de algas do que em pH ácido.

Figura 9. Taxas de crescimento de *Chlamydomonas acidophila* em diferentes tempos de exposição e concentrações de zinco, medidas pela variação da densidade óptica a 750 nm e avaliadas através do teste *Tukey*. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras iguais sobre as barras representam ausência de diferença significativa entre as taxas e letras diferentes representam diferenças significativas. C1 = 0,0000505, C2 = 0,0599, C3 = 0,1199, C4 = 0,2398 e C5 = 0,4796.



Fonte: Autora (2021).

Em relação à interação entre concentração de zinco e tempo de exposição (Figura 9), não houve diferença significativa no crescimento algal entre as concentrações C4 e C5 em nenhum dos tempos de exposição. O crescimento na concentração C1 em 168 h não mostrou diferença significativa do verificado para a C2 em 168 h e C4 em 96 h, e a concentração C1 em 96 h não diferiu significativamente do verificado para a concentração C2 em 72 h e C3 em 96 h.

A maior taxa de crescimento ocorreu na concentração C3 em 72 h, sendo estatisticamente equivalente à obtida na combinação C1 em 72 h. Em contrapartida, a menor taxa foi verificada na concentração C5 em 168 h, sendo essa estatisticamente equivalente as obtidas nas combinações de C4 e C5, em todos os tempos de

exposição. De acordo com Pedias *et al.*, (1992) e Malavolta, (1981), o zinco é um micronutriente essencial, que em baixas quantidades é essencial no desenvolvimento da vida animal e vegetal. Atua em funções enzimáticas, síntese de DNA, RNA e proteínas, metabolismo de carboidratos, na divisão e crescimento das células, entre outras funções. Em altas concentrações, entretanto, pode produzir efeitos contrários, tornando-se tóxico.

Ainda, foi possível verificar que para todas as concentrações de zinco, com exceção da concentração C4, conforme aumentou-se o tempo de exposição da alga ao mesmo, ele se tornou mais tóxico, fazendo com que a taxa de crescimento diminuísse. Barbosa *et al.*, (2000) reconheceram que para quantificar os níveis de tolerância dos organismos a ingestão de metais pesados, além da intensidade, a duração de exposição dos mesmos aos metais deve ser considerada, uma vez que são fatores que influenciam na toxicidade do metal para o organismo. Moreno-Garrido *et al.*, (2000) e Monteiro *et al.*, (2011) concluíram que em algas verdes e em diatomáceas, que são as microalgas mais comumente utilizadas para testes de toxicidade, o teste em sua forma mais padrão é feito através da medição da diminuição na taxa de crescimento ou na biomassa celular final, provocada pela exposição ao metal de 48 a 96 h. Assim, com os resultados do presente estudo, pode-se considerar que quanto mais tempo a alga esteve exposta ao zinco, maior foi a probabilidade de efeitos tóxicos afetarem a mesma, sugerindo o aparecimento de efeitos crônicos.

Por fim, acredita-se que a alga estava adaptada a concentrações de zinco semelhantes a C1 e C3, mas concentrações de C4 e C5 se tornaram tóxicas para ela. O efeito tóxico foi mais intenso em pHs mais baixos e em maiores tempos de exposição, mas a toxicidade pôde ser verificada já em 72 h, indicando que essa alga, nas condições experimentadas, já manifesta efeito tóxico do zinco em testes relativamente rápidos, não sendo necessário esperar por mais tempo para verificar toxicidade significativa.

5.4. Parâmetros ecotoxicológicos (CE₅₀)

Os resultados para CE₅₀, CENO e CEO para cada tempo de exposição (72 h, 96 h e 168 h) estão representados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre *Chlamydomonas acidophila* no tempo de exposição de 72 h.

pH	CE_{50} (g/L)	CENO (g/L)	CEO (g/L)
3,6	0,0786	0,0599	0,1199
6	0,0793	0,0599	0,1199
7	0,2334	0,1199	0,2398
8	0,2270	0,1199	0,2398

Fonte: Autora (2021).

No tempo de exposição de 72 h (Tabela 7), a menor CE_{50} foi encontrada no pH 3,6 (0,0786 g/L) e a maior no pH 7 (0,2334 g/L). Quanto menor o valor de CE_{50} , maior o efeito tóxico para a alga. Os valores de CENO foram iguais para os pHs 3,6 e 6 (0,0599 g/L) e iguais para os pHs 7 e 8 (0,1199 g/L). De forma semelhante, o CEO foi igual para os pHs 3,6 e 6 (0,1199 g/L) e para os pHs 7 e 8 (0,2398 g/L).

Tabela 8. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre *Chlamydomonas acidophila* no tempo de exposição de 96 h.

pH	CE_{50} (g/L)	CENO (g/L)	CEO (g/L)
3,6	0,0544	0,0364	0,0599
6	0,1169	0,1199	0,0599
7	0,2343	0,2398	0,1199
8	0,2578	0,4796	0,2398

Fonte: Autora (2021).

No tempo de exposição de 96 h (Tabela 8), a menor CE_{50} foi obtida para o pH 3,6 (0,0544 g/L) e a maior para o pH 8 (0,2578 g/L). Tanto no pH 3,6 quanto no pH 6, o valor de CEO foi 0,0599 g/L, enquanto os valores de CENO foram os menores dentre

os demais, sendo 0,0364 g/L e 0,1199 g/L, respectivamente. A CEO foi de 0,1199 g/L no pH 7 e 0,2398 g/L no pH 8. A CENO foi de 0,4796 g/L no pH 8, enquanto no pH 7 foi 0,2398 g/L.

Tabela 9. Valores de CE_{50} , CENO e CEO calculados para os testes de toxicidade de zinco sobre *Chlamydomonas acidophila* no tempo de exposição de 168 h.

pH	CE_{50} (g/L)	CENO (g/L)	CEO (g/L)
3,6	0,0977	0,1199	0,0599
6	0,1717	0,2398	0,1199
7	0,2296	0,2398	0,1199
8	0,2676	0,4796	0,2398

Fonte: Autora (2021).

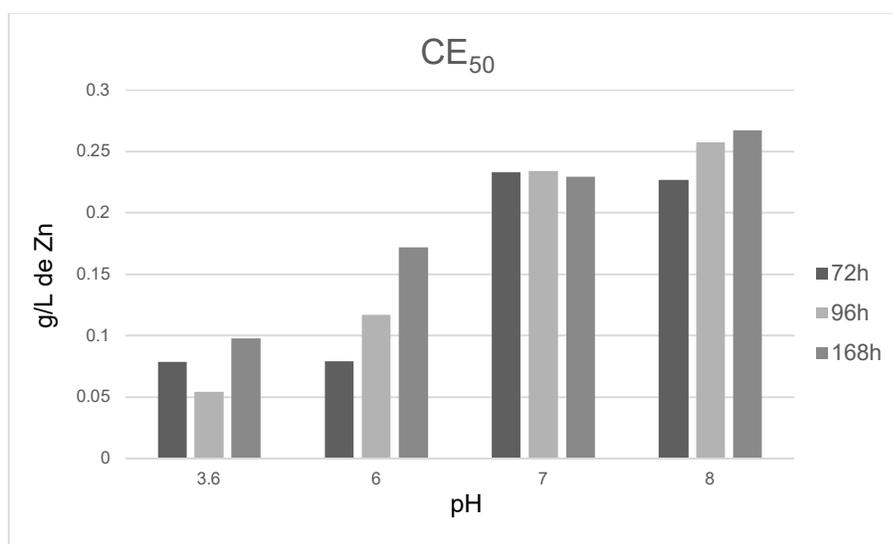
No tempo de exposição de 168 h (Tabela 9), a menor CE_{50} foi obtida para o pH 3,6 (0,0977 g/L) e a maior no pH 8 (0,2676 g/L). Os valores de CEO e CENO foram iguais para os pHs 6 e 7 (0,1199 g/L e 0,2398 g/L, respectivamente). Para o pH 3,6 a CENO foi 0,1199 g/L e a CEO 0,0599 g/L, enquanto para o pH 8 a CENO foi de 0,4796 g/L e a CEO 0,2398 g/L.

A capacidade de uma microalga de resistir à ação tóxica de um metal pesado pode ser avaliada por meio de seu valor CE_{50} (TORRES *et al.*, 2000). De acordo com Monteiro *et al.*, (2011), esses efeitos tóxicos aparentemente dependem das espécies de microalgas e da concentração do metal, além do tempo de contato, e ainda, a interação entre concentrações do metal e o pH. Como já citado anteriormente por Schneider (2006), em ambientes 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.

A Figura 10 representa um copilado dos valores de CE_{50} de forma com que possamos comparar a toxicidade do zinco para a alga em cada pH e tempo de exposição. Assim, é possível verificar que a CE_{50} se mantém relativamente baixa nos

menores pHs (3,6 e 6) para os três tempos de exposição. Entretanto, conforme verificamos para maiores pHs, a CE_{50} aumenta, indicando que há uma diminuição da toxicidade do zinco para a alga. Isto está certamente relacionado com a menor biodisponibilidade do zinco nesses pHs em função da especiação química dependente do pH. Ainda, no pH 8 foi possível verificar o aumento do CE_{50} com o aumento do tempo de exposição. Esse resultado é interessante, uma vez que estudos anteriores verificaram que o tempo de exposição do organismo ao metal influencia positivamente na toxicidade.

Figura 10. Variação dos valores de CE_{50} de zinco para *Chlamydomonas acidophila* em diferentes pHs e diferentes tempos de exposição.



Fonte: Autora (2021).

A Tabela 10 representa os valores de CE_{50} no pH 3,6, convertidos em μM para fim de comparação com outros estudos. A partir da mesma, é possível verificar que já no menor pH, o qual foi demonstrado anteriormente que apresentou o menor valor de CE_{50} , ou seja, onde o efeito do zinco foi mais tóxico para a alga, a alga *C. acidophila* apresentou elevada tolerância ao metal, quando comparado com outras espécies de microalga, tanto no tempo de exposição de 72 quanto de 96 horas.

Tabela 10. Comparação dos valores de CE₅₀ encontrados para a cepa de *Chlamydomonas acidophila* com outros estudos, nos quais foram utilizadas a mesma ou outras espécies, a partir do tempo de exposição ao zinco de 72 e 96 horas e pH 3,6.

Tempo de exposição ao zinco	Organismo	CE ₅₀ (µM)	Referências
72 h	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	1203,18	Presente estudo
	<i>Chlamydomonas sp.</i>	2958,80	SILVA <i>et al.</i> , 2010
	<i>Chlorella kessleri</i>	14,00	ROJCKOVÁ-PADTROVÁ & MARSÁLEC, 1999
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	4,90	ROJCKOVÁ-PADTROVÁ & MARSÁLEC, 1999
96 h	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	832,70	Presente estudo
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	260,00	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2011
	<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>	74,50	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Autora (2021).

Segundo Dean *et al.*, (2019), a cepa de *C. acidophila* pode tolerar altas concentrações de outros metais, como Cd e Cu. Comprando a mesma com outros gêneros de algas tolerantes a ambientes ácidos, é possível verificar que a tolerância ao Zn de *C. acidophila* foi maior do que a relatada para *Chlorella protothecoides var. acidicola* e *E. mutabilis*. Entretanto, ambas as cepas mostraram uma tolerância ao Cu mais alta do que *C. acidophila* (JOHNSON, 2012). Assim, a alga *Chlamydomonas acidophila* pode ser considerada uma espécie tolerante à metais pesados.

6. CONCLUSÕES

- A alga *Chlamydomonas acidophila* apresentou crescimento significativo no intervalo de pHs entre 1 e 8, tendo seu máximo entre os pHs 2 e 6, caracterizando-a como uma alga acidofílica e acidotolerante;
- Sob estresse do pH e da temperatura, apresentou seu máximo crescimento no pH 5 e temperatura de 22 °C;
- A temperatura de 22 °C foi considerada ótima para o crescimento da alga, mas no tempo de exposição de 72 h, não apresentou diferença significativa dos resultados obtidos para temperaturas de 30 °C e 40 °C;
- Nos tempos de exposição de 96 h e 168 h, a temperatura de 40 °C demonstrou ser maléfica para o crescimento da alga. Assim, mostrando que a interação entre temperatura e tempo de exposição influenciam no crescimento da alga;
- As concentrações de zinco C3 e C1 não se mostraram tóxicas para a *Chlamydomonas acidophila*, confirmando uma tolerância ao zinco por essa alga, já que para outras espécies, especialmente as padronizadas para testes ecotoxicológicos, essas concentrações já se mostram efetivas;
- Para todos os testes, a interação entre as variáveis e tempo de exposição influenciaram no crescimento da alga de forma significativa;
- O valor da CE_{50} de zinco aumenta diretamente com o aumento do pH, indicando que mesmo presente em concentrações originalmente elevadas, a especiação do zinco em pHs mais elevados torna esse metal menos biodisponível e, portanto, mascarando o efeito tóxico.

7. Referências

- ABALDE, Julio *et al.* Microalgas: cultivo e aplicaciones. 210 p. Monografía, n. 26, 1995.
- AGUILERA, Angeles; AMILS, Ricardo. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp.(Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic toxicology*, v. 75, n. 4, p. 316-329, 2005.
- BALECH, Enrique. Introducción al fitoplancton marino. 1977.
- BARBOSA, J.P. *et al.* Projeto Conceitual para Recuperação Ambiental da Bacia Ccarbonífera Sul Catarinense. Relatório Técnico elaborado pelo CETEM / MCT ao SIECESC, 3 V, Setembro de 2000.
- BOAVIDA, M. J.; HEATH, Robert T. Phosphatase activity of *Chlamydomonas acidophila* Negro (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia*, v. 25, n. 3, p. 400-404, 1986.
- CAMPBELL, P. G. C.; STOKES, P. M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 42, n. 12, p. 2034-2049, 1985.
- 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.
- CHEN, Bailing *et al.* Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. *Bioresource technology*, v. 244, p. 1198-1206, 2017.
- CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science. *Biotechnology Advances*. 2004. p. 565-567.
- COCHRAN, William G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics*, v. 6, n. 2, p. 105-116, 1950.
- DARLEY, W. Marshall. Algal biology: a physiological approach. *Basic microbiology*, v. 9, p. 30-52, 1982.

DEAN, Andrew P. *et al.* Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strain isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity. *Science of the total environment*, v. 647, p. 75-87, 2019.

DENEKE, Rainer. Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values ≤ 3 . *Hydrobiologia*, v. 433, n. 1, p. 167-172, 2000.

DERNER, Roberto Bianchini *et al.* Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006.

DESSOUKI, Tarik CE *et al.* The effects of phosphorus additions on the sedimentation of contaminants in a uranium mine pit-lake. *Water Research*, v. 39, n. 13, p. 3055-3061, 2005.

DIEZ, D. M. *et al.*, *OpenIntro Statistics*, 3ª edição. OpenIntro, Inc., (2 julho 2015).

DIEZ-ERCILLA, Marta *et al.* Formation of biogenic sulphides in the water column of an acidic pit lake: biogeochemical controls and effects on trace metal dynamics. *Biogeochemistry*, v. 121, n. 3, p. 519-536, 2014.

DINIS, Maria Alzira Pimenta; MONTEIRO, Álvaro; BOAVENTURA, Rui. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. 2004.

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, Mujde *et al.* Evaluation of toxicity, bioavailability and speciation of lead, zinc and cadmium in mine/mill wastewaters. *Chemical Speciation & Bioavailability*, v. 10, n. 2, p. 37-46, 1998.

GADD, G. M. Fungal responses towards heavy metals. *Special publications of the Society for General Microbiology*, 1986.

GARBAYO, I. *et al.* Effect of abiotic stress on *Chlamydomonas acidophila* viability. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, v. 1, p. 134-189, 2007.

GARBAYO, Inés *et al.* Effect of abiotic stress on the production of lutein and β -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 10, p. 1158-1161, 2008.

GELLER, Walter; SCHULTZE, Martin. Remediation and management of acidified pit lakes and outflowing waters. *Acidic pit lakes*, p. 225-264, 2013.

GENSEMER, Robert W. *et al.* pH tolerance and metal toxicity in populations of the planktonic diatom *Asterionella*: influences of synthetic and natural dissolved organic carbon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 50, n. 1, p. 121-132, 1993.

GERLOFF-ELIAS, Antje *et al.* Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS microbiology ecology*, v. 56, n. 3, p. 345-354, 2006.

GHASEMI, Asghar; ZAHEDIASL, Saleh. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *International journal of endocrinology and metabolism*, v. 10, n. 2, p. 486, 2012.

GIMMLER, H. Acidophilic and acidotolerant algae. In: *Algal adaptation to environmental stresses*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 259-290.

GUILLARD, Robert RL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, Boston, MA, 1975. p. 29-60.

HAMILTON, Martin A.; RUSSO, Rosemarie C.; THURSTON, Robert V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental science & technology*, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HARGREAVES, J. W.; WHITTON, B. A. Effect of pH on growth of acid stream algae. *British Phycological Journal*, v. 11, n. 3, p. 215-223, 1976.

HEDIN, Robert *et al.* Passive treatment of acidic coal mine drainage: The Anna S mine passive treatment complex. *Mine Water and the Environment*, v. 29, n. 3, p. 165-175, 2010.

IGNÁCIO, Sérgio Aparecido. Importância da estatística para o processo de conhecimento e tomada de decisão. *Revista Paranaense de Desenvolvimento*, n. 118, p. 175-192, 2010.

JOHNSON, D. Barrie. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS microbiology ecology, v. 27, n. 4, p. 307-317, 1998.

JOHNSON, D. Barrie; HALLBERG, Kevin B. Acid mine drainage remediation options: a review. Science of the total environment, v. 338, n. 1-2, p. 3-14, 2005.

JOHNSON, David Barrie. Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 325, 2012.

KAPLAN, Drora *et al.* Water pollution and bioremediation by microalgae: absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, p. 439-447, 2004.

KNIE, Joachim LW; LOPES, Ester WB. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. 2004.

LANE, Ann E.; BURRIS, John E. Effects of environmental pH on the internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*. Plant physiology, v. 68, n. 2, p. 439-442, 1981.

LEE, R. E. Phycology (4 izd.). Cambridge University Press, Cambridge, str, v. 3, n. 180, p. 429, 2008.

LOURENÇO, S. de O. *et al.* Produção primária marinha. Biologia marinha, v. 2, p. 111-154, 2002.

LOURENÇO, Sergio O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MALAVOLTA, E. Manual de química agrícola: adubos e adubação. São Paulo: Agron. Ceres P, v. 596, 1981.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Critical reviews in biotechnology, v. 25, n. 3, p. 113-152, 2005.

MINODA, Ayumi *et al.* Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid. Applied microbiology and biotechnology, v. 99, n. 3, p. 1513-1519, 2015.

MONTEIRO, Cristina M. *et al.* Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*, v. 23, n. 1, p. 97-103, 2011.

MORENO-GARRIDO, Ignacio; LUBIÁN, Luis M.; SOARES, Amadeu MVM. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 47, n. 2, p. 112-116, 2000.

MOSER, Michael; WEISSE, Thomas. 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, 2011.

MURATA, Norio. Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, v. 21, n. 1, p. 61-75, 1989.

NAJA, G. M.; VOLESKY, B. Metals in the environment: toxicity and sources. Chapter, v. 2, p. 13-61, 2009.

ÑANCUCHEO, Ivan; JOHNSON, D. Barrie. Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 23, p. 8201-8208, 2011.

NISHIDA, I.; MURATA, N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual review of plant biology*, v. 47, n. 1, p. 541-568, 1996.

NISHIKAWA, Kahoko; TOMINAGA, Noriko. Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 65, n. 12, p. 2650-2656, 2001.

NIXDORF, Brigitte; MISCHKE, Ute; LEBMANN, Dieter. Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH < 3) in Lusatia (Germany). *Hydrobiologia*, v. 369, p. 315-327, 1998.

NOVIS, Phil M.; HARDING, Jon S. Extreme acidophiles. In: *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, Dordrecht, 2007. p. 443-463.

OLAVESON, M. M.; NALEWAJKO, C. Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia*, v. 433, n. 1, p. 39-56, 2000.

PENDIAS, Henryk *et al.* Trace elements in soils and plants. 1992.

PETERSON, Hans G.; HEALEY, F. Patrick; WAGEMANN, Rudolf. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 41, n. 6, p. 974-979, 1984.

PHILIPPI, Vivian Prá *et al.* Microalgas de drenagem ácida de mina de carvão de Santa Catarina-Brasil: levantamento florístico e parâmetros ecofisiológicos de uma cepa isolada de *Chlamydomonas sp.* 2014.

PIMENTEL, A. Estatística é base para previsões meteorológicas. *Diário do Nordeste*, 25 jan. 2009. Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=609209>>. Acesso em: 17 jun. 2010.

POLLIO, Antonino *et al.* *Chlamydomonas pitschmannii* Ettl, a little known species from thermoacidic environments. *Protist*, v. 156, n. 3, p. 287-302, 2005.

Quest Graph™ LC50 Calculator. AAT Bioquest, Inc, 2021. Disponível em: <<https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator>>. Acesso em 4 de Agosto de 2021.

RAIKOVA, Sofia *et al.* Assessing hydrothermal liquefaction for the production of bio-oil and enhanced metal recovery from microalgae cultivated on acid mine drainage. *Fuel Processing Technology*, v. 142, p. 219-227, 2016.

RAND, Gary M. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press, 1995.

RAVEN. J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA. M. A.; BOROWITZKA. L. J. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University. p. 331-356. 1988.

RICHMOND, Amos *et al.* Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, p. 125-177, 2004.

SATAKE, Ken'ichi; SAIJO, Yatsuka. Carbon dioxide content and metabolic activity of microorganisms in some acid lakes in Japan. *Limnology and Oceanography*, v. 19, n. 2, p. 331-338, 1974.

SCHNEIDER, Carlos Henrique. *Controle da drenagem ácida de minas na mineração de carvão de Santa Catarina: caso da mina UM II-Verdinho*. 2006.

SCHULTZE, Martin. Limnology of pit lakes. In: Acidic Pit Lakes. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 23-224.

SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SHEORAN, A. S.; SHEORAN, V. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. *Minerals engineering*, v. 19, n. 2, p. 105-116, 2006.

SMUCKER, Nathan J.; DRERUP, Samuel A.; VIS, Morgan L. Roles of benthic algae in the structure, function, and assessment of stream ecosystems affected by acid mine drainage. *Journal of phycology*, v. 50, n. 3, p. 425-436, 2014.

SPIJKERMAN, Elly *et al.* Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles*, v. 11, n. 4, p. 551-562, 2007.

SPIJKERMAN, Elly. Inorganic carbon acquisition by *Chlamydomonas acidophila* across a pH range. *Canadian Journal of Botany*, v. 83, n. 7, p. 872-878, 2005.

SPIJKERMAN, Elly. Phosphorus limitation of algae living in iron-rich, acidic lakes. *Aquatic microbial ecology*, v. 53, n. 2, p. 201-210, 2008.

SUH, In Soo; LEE, Choul-Gyun. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and bioprocess engineering*, v. 8, n. 6, p. 313, 2003.

THOMPSON, Peter A.; GUO, Ming-xin; HARRISON, Paul J. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton 1. *Journal of Phycology*, v. 28, n. 4, p. 481-488, 1992.

TITTEL, Jörg *et al.* Inorganic carbon limitation and mixotrophic growth in *Chlamydomonas* from an acidic mining lake. *Protist*, v. 156, n. 1, p. 63-75, 2005.

TOMASELLI, Luisa *et al.* The microalgal cell. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, v. 1, p. 3-19, 2004.

TORRES, Enrique *et al.* Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 117, n. 1, p. 1-14, 2000.

TOTSCHE, Oliver; FYSON, Andrew; STEINBERG, Christian EW. Microbial alkalinity production to prevent reacidification of neutralized mining lakes. *Mine Water and the Environment*, v. 25, n. 4, p. 204-213, 2006.

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).

VEGA, Bertha Arredondo. Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Pophyridium cruentum*. 1995. Tese de Doutorado. Universidade de Santiago de Compostela.

WONG, P. T. S.; COUTURE, P. Toxicity screening using phytoplankton, in " Toxicity Testing Using Microorganisms"(ed. by BJ Dutka and G. Bitton), Vol. 2. 1986.

YONGMANITCHAI, Wichien; WARD, Owen P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, v. 30, n. 9, p. 2963-2967, 1991.

YUN, Hyun-Shik *et al.* Isolation of novel microalgae from acid mine drainage and its potential application for biodiesel production. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 173, n. 8, p. 2054-2064, 2014.

Apêndice I

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

Solução Estoque	Preparo da Sol. Estoque	Volume (ml/L)
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 g/L	10 mL
2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g/L	10 mL
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 g/L	10 mL
4. KH_2PO_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. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98 g/L	1 mL
H_2SO_4	-	1mL
9. Vitaminas F/2	Tabela abaixo	1 mL

Composição dos metais traços

Componente	g/Litro
1. H_3BO_3	2.86
2. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
3. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222
4. $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390
5. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079
6. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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

Apêndice II

Variação na Taxa de crescimento (μ) de *Chlamydomonas acidophila*, de acordo com diferentes pHs e em 3 tempos de exposição. Somente os valores de 0 a 9 de pH foram utilizados para as análises.

Réplica	pH	Tempo (h)	μ Crescimento	μ Média	μ Desvio padrão
1	0	72	0,176876084	0,166303464	0,038187471
2	0	72	0,12394361		
3	0	72	0,198090698		
1	0	96	0,190201457	0,112174877	0,067606082
2	0	96	0,0710469		
3	0	96	0,075276273		
1	0	168	-0,004941635	-0,038272124	0,029283013
2	0	168	-0,050007486		
3	0	168	-0,059867251		
1	1	72	0,062377705	0,103538589	0,049893697
2	1	72	0,159029161		
3	1	72	0,089208902		
1	1	96	0,246385201	0,194637452	0,073431076
2	1	96	0,110593561		
3	1	96	0,226933594		
1	1	168	0,111757127	0,116394253	0,052757706
2	1	168	0,171317457		
3	1	168	0,066108174		
1	2	72	0,474838525	0,474634496	0,105705913
2	2	72	0,368826717		
3	2	72	0,580238247		
1	2	96	0,332436729	0,341298843	0,053410597
2	2	96	0,292873594		
3	2	96	0,398586206		
1	2	168	0,228876944	0,22749938	0,07198702
2	2	168	0,154833465		
3	2	168	0,298787732		
1	3	72	0,474369445	0,510354888	0,05330983

2	3	72	0,485095744		
3	3	72	0,571599476		
1	3	96	0,416926705	0,440836626	0,032779483
2	3	96	0,427380343		
3	3	96	0,478202829		
1	3	168	0,425802662	0,354467693	0,065089447
2	3	168	0,339297228		
3	3	168	0,29830319		
1	3,6	72	0,564700515	0,54867926	0,017283463
2	3,6	72	0,530362925		
3	3,6	72	0,550974341		
1	3,6	96	0,501317476	0,471129901	0,030952969
2	3,6	96	0,439464479		
3	3,6	96	0,472607749		
1	3,6	168	0,404638661	0,360283696	0,04678487
2	3,6	168	0,364813926		
3	3,6	168	0,311398502		
1	4	72	0,490504923	0,382489746	0,161428614
2	4	72	0,460044837		
3	4	72	0,196919478		
1	4	96	0,336000362	0,348181694	0,015443998
2	4	96	0,3429928		
3	4	96	0,365551919		
1	4	168	0,339902698	0,339172649	0,004488681
2	4	168	0,343251556		
3	4	168	0,334363694		
1	5	72	0,259696537	0,387761395	0,11220859
2	5	72	0,434755293		
3	5	72	0,468832356		
1	5	96	0,341485533	0,248430275	0,083014414
2	5	96	0,181979492		
3	5	96	0,221825799		
1	5	168	0,199732688	0,229208016	0,037497022

2	5	168	0,271412577		
3	5	168	0,216478782		
1	6	72	0,442878094	0,418423221	0,103819149
2	6	72	0,507831828		
3	6	72	0,304559742		
1	6	96	0,349035545	0,328743094	0,017706889
2	6	96	0,320763944		
3	6	96	0,316429792		
1	6	168	0,236549599	0,232666172	0,007865242
2	6	168	0,223614515		
3	6	168	0,2378344		
1	7	72	0,183772328	0,224694888	0,03544709
2	7	72	0,244444602		
3	7	72	0,245866314		
1	7	96	0,277120197	0,172217828	0,108400769
2	7	96	0,060628276		
3	7	96	0,178905009		
1	7	168	0,198807412	0,147131653	0,048240782
2	7	168	0,103283084		
3	7	168	0,139304462		
1	8	72	0,147493785	0,327579687	0,171810037
2	8	72	0,489702385		
3	8	72	0,345542892		
1	8	96	0,322539519	0,277452828	0,056237907
2	8	96	0,295382867		
3	8	96	0,214436098		
1	8	168	0,041038444	0,070155736	0,054735819
2	8	168	0,13329573		
3	8	168	0,036133035		
1	9	72	-0,110592464	-0,0851012	0,043119239
2	9	72	-0,109394944		
3	9	72	-0,035316193		
1	9	96	-0,053371117	0,014414026	0,074241291

2	9	96	0,002857174		
3	9	96	0,093756021		
1	9	168	-0,027736573	-0,056713718	0,076791297
2	9	168	-0,143777404		
3	9	168	0,001372823		

Variação na Taxa de crescimento (μ) de *Chlamydomonas acidophila*, de acordo com diferentes pHs, temperaturas e em 3 tempos de exposição.

Réplica	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	μ Crescimento	μ Média	μ Desvio padrão
1	3,6	15	72	0,285816744	0,204919013	0,143477036
2	3,6	15	72	0,039261012		
3	3,6	15	72	0,289679282		
1	3,6	22	72	0,311436412	0,296293921	0,129530517
2	3,6	22	72	0,159857693		
3	3,6	22	72	0,417587656		
1	3,6	30	72	0,366204096	0,376683061	0,10357155
2	3,6	30	72	0,485095744		
3	3,6	30	72	0,278749341		
1	3,6	40	72	0,46209812	0,24163908	0,203570736
2	3,6	40	72	0,202045268		
3	3,6	40	72	0,060773852		
1	3,6	15	96	0,190535013	0,116109128	0,090648776
2	3,6	15	96	0,015156155		
3	3,6	15	96	0,142636215		
1	3,6	22	96	0,215050316	0,210477387	0,076769864
2	3,6	22	96	0,131523274		
3	3,6	22	96	0,284858571		
1	3,6	30	96	0,379086872	0,318244382	0,06628939
2	3,6	30	96	0,328046597		
3	3,6	30	96	0,247599676		
1	3,6	40	96	0,467950544	0,151709074	0,29953116
2	3,6	40	96	0,114883082		
3	3,6	40	96	-0,127706406		
1	3,6	15	168	0,265821763	0,176708163	0,096181455
2	3,6	15	168	0,074749735		
3	3,6	15	168	0,189552992		
1	3,6	22	168	0,204392303	0,218580882	0,038154931
2	3,6	22	168	0,189552992		
3	3,6	22	168	0,261797352		

1	3,6	30	168	0,263689527	0,267013444	0,027160376
2	3,6	30	168	0,241668002		
3	3,6	30	168	0,295682804		
1	3,6	40	168	-0,427961753	-0,381255598	0,302693673
2	3,6	40	168	-0,057923587		
3	3,6	40	168	-0,657881455		
1	4	15	72	0,070436365	0,097906746	0,067130883
2	4	15	72	0,048867825		
3	4	15	72	0,174416048		
1	4	22	72	0,417587656	0,376027265	0,094889312
2	4	22	72	0,267448824		
3	4	22	72	0,443045316		
1	4	30	72	0,353623987	0,328665772	0,087838465
2	4	30	72	0,401324268		
3	4	30	72	0,23104906		
1	4	40	72	0,314820536	0,241845032	0,107099831
2	4	40	72	0,118891648		
3	4	40	72	0,291822912		
1	4	15	96	0,027806409	0,102984451	0,090014193
2	4	15	96	0,07841439		
3	4	15	96	0,202732554		
1	4	22	96	0,426187023	0,330304843	0,090019917
2	4	22	96	0,247599676		
3	4	22	96	0,317127831		
1	4	30	96	0,372913719	0,301436465	0,067461541
2	4	30	96	0,292517813		
3	4	30	96	0,238877861		
1	4	40	96	0,062828607	0,047263948	0,014794896
2	4	40	96	0,033382848		
3	4	40	96	0,045580389		
1	4	15	168	0,099021026	0,106372722	0,031824984
2	4	15	168	0,07886694		
3	4	15	168	0,141230199		

1	4	22	168	0,328940728	0,285307836	0,038529325
2	4	22	168	0,255965638		
3	4	22	168	0,271017141		
1	4	30	168	0,209476724	0,237435247	0,027146553
2	4	30	168	0,239139491		
3	4	30	168	0,263689527		
1	4	40	168	-0,606927892	-0,590905404	0,027751762
2	4	40	168	-0,606927892		
3	4	40	168	-0,558860429		
1	5	15	72	0,095894024	0,249610625	0,138926163
2	5	15	72	0,366204096		
3	5	15	72	0,286733755		
1	5	22	72	0,574255533	0,673339704	0,086336592
2	5	22	72	0,732408192		
3	5	22	72	0,713355388		
1	5	30	72	0,299313864	0,308523604	0,082466022
2	5	30	72	0,395207889		
3	5	30	72	0,23104906		
1	5	40	72	0,488779023	0,42112493	0,077088097
2	5	40	72	0,437395463		
3	5	40	72	0,337200304		
1	5	15	96	0,127706406	0,192441377	0,069107597
2	5	15	96	0,26521799		
3	5	15	96	0,184399736		
1	5	22	96	0,370401135	0,536256785	0,144156425
2	5	22	96	0,606937059		
3	5	22	96	0,631432161		
1	5	30	96	0,274653072	0,278115489	0,061053192
2	5	30	96	0,340826211		
3	5	30	96	0,218867184		
1	5	40	96	0,071920518	-0,033788759	0,275580376
2	5	40	96	0,173286795		
3	5	40	96	-0,34657359		

1	5	15	168	0,206702712	0,203645757	0,021471632
2	5	15	168	0,223425077		
3	5	15	168	0,180809482		
1	5	22	168	0,323109014	0,383850274	0,068696723
2	5	22	168	0,370038166		
3	5	22	168	0,458403641		
1	5	30	168	0,173288949	0,182179174	0,016530593
2	5	30	168	0,20125246		
3	5	30	168	0,171996115		
1	5	40	168	-0,156944613	-0,11197025	0,040099783
2	5	40	168	-0,079945113		
3	5	40	168	-0,099021026		

Varição na Taxa de crescimento (μ) de *Chlamydomonas acidophila*, de acordo com diferentes pHs, concentrações de zinco e em 3 tempos de exposição. A temperatura foi fixada em 22°C.

Réplica	pH	Concentração de zinco	Tempo (h)	μ Crescimento	μ Média	μ Desvio padrão
1	3,6	C1	72	0,85129984	0,5358	0,297622777
2	3,6	C1	72	0,496025685		
3	3,6	C1	72	0,260052853		
1	3,6	C2	72	0,23104906	0,2403	0,085517508
2	3,6	C2	72	0,330132901		
3	3,6	C2	72	0,159857693		
1	3,6	C3	72	0,291822912	0,3149	0,044485944
2	3,6	C3	72	0,366204096		
3	3,6	C3	72	0,286733755		
1	3,6	C4	72	-0,044510464	-0,2602	0,193251371
2	3,6	C4	72	-0,318503815		
3	3,6	C4	72	-0,417587656		
1	3,6	C5	72	-0,026680903	0,1086	0,118822922
2	3,6	C5	72	0,195928888		
3	3,6	C5	72	0,156667876		
1	3,6	C1	96	0,706193619	0,4224	0,268145308
2	3,6	C1	96	0,387649353		
3	3,6	C1	96	0,173286795		
1	3,6	C2	96	0,237270139	0,2147	0,097663675
2	3,6	C2	96	0,29906269		
3	3,6	C2	96	0,107695729		
1	3,6	C3	96	0,257404854	0,2663	0,076161037
2	3,6	C3	96	0,34657359		
3	3,6	C3	96	0,195039639		
1	3,6	C4	96	0,055785888	-0,0009	0,121040013
2	3,6	C4	96	0,0813556		
3	3,6	C4	96	-0,139903947		
1	3,6	C5	96	0,11989327	0,1536	0,047743533
2	3,6	C5	96	0,208227281		
3	3,6	C5	96	0,132657063		

1	3,6	C1	168	0,366421337	0,2517	0,111680893
2	3,6	C1	168	0,245378785		
3	3,6	C1	168	0,143328873		
1	3,6	C2	168	0,164668501	0,1587	0,019120969
2	3,6	C2	168	0,174177182		
3	3,6	C2	168	0,137344452		
1	3,6	C3	168	0,240914136	0,2063	0,05076114
2	3,6	C3	168	0,229919702		
3	3,6	C3	168	0,148013133		
1	3,6	C4	168	0,103416977	0,0736	0,034443416
2	3,6	C4	168	0,081506408		
3	3,6	C4	168	0,035902061		
1	3,6	C5	168	0,119464003	0,1219	0,024122978
2	3,6	C5	168	0,147088488		
3	3,6	C5	168	0,099021026		
1	6	C1	72	0,291822912	0,4527	0,169123529
2	6	C1	72	0,437395463		
3	6	C1	72	0,629023216		
1	6	C2	72	0,055684695	0,0833	0,03668392
2	6	C2	72	0,069213122		
3	6	C2	72	0,124897816		
1	6	C3	72	0,384226503	0,3317	0,098579668
2	6	C3	72	0,217975489		
3	6	C3	72	0,392884999		
1	6	C4	72	-0,026680903	0,0388	0,057713478
2	6	C4	72	0,060773852		
3	6	C4	72	0,082286693		
1	6	C5	72	0,069906844	0,0788	0,0445953
2	6	C5	72	0,039261012		
3	6	C5	72	0,127122519		
1	6	C1	96	0,266177684	0,4003	0,145384275
2	6	C1	96	0,379956438		
3	6	C1	96	0,554800871		

1	6	C2	96	0,161656791	0,1726	0,047429631
2	6	C2	96	0,131523274		
3	6	C2	96	0,224485398		
1	6	C3	96	0,300993201	0,31	0,122992642
2	6	C3	96	0,191813788		
3	6	C3	96	0,437299964		
1	6	C4	96	-0,053393525	-0,0179	0,03229992
2	6	C4	96	0,009805178		
3	6	C4	96	-0,010205499		
1	6	C5	96	0,059097195	0,0574	0,078265371
2	6	C5	96	-0,021752844		
3	6	C5	96	0,134749125		
1	6	C1	168	0,201569568	0,2752	0,089606642
2	6	C1	168	0,248995615		
3	6	C1	168	0,374952656		
1	6	C2	168	0,173288949	0,1918	0,020691141
2	6	C2	168	0,214133714		
3	6	C2	168	0,187953828		
1	6	C3	168	0,287843289	0,2874	0,066323347
2	6	C3	168	0,220846358		
3	6	C3	168	0,353490764		
1	6	C4	168	0,075156157	0,0778	0,002815309
2	6	C4	168	0,077474899		
3	6	C4	168	0,080759116		
1	6	C5	168	0,103705286	0,1071	0,035887801
2	6	C5	168	0,072975089		
3	6	C5	168	0,144514416		
1	7	C1	72	1,098612289	1,0451	0,150366804
2	7	C1	72	1,161437429		
3	7	C1	72	0,875328416		
1	7	C2	72	0,702809693	0,7106	0,031550615
2	7	C2	72	0,745379998		
3	7	C2	72	0,683756888		

1	7	C3	72	1,245889873	1,2856	0,17295349
2	7	C3	72	1,135947308		
3	7	C3	72	1,474948877		
1	7	C4	72	0,538694152	0,4816	0,066925598
2	7	C4	72	0,498042355		
3	7	C4	72	0,407925144		
1	7	C5	72	0,185671669	0,1493	0,039311252
2	7	C5	72	0,154612371		
3	7	C5	72	0,107591131		
1	7	C1	96	0,802710913	0,7496	0,124218181
2	7	C1	96	0,838351679		
3	7	C1	96	0,607604616		
1	7	C2	96	0,405283488	0,4483	0,043123202
2	7	C2	96	0,491528214		
3	7	C2	96	0,447939867		
1	7	C3	96	0,904971646	0,9346	0,120829435
2	7	C3	96	0,831259005		
3	7	C3	96	1,067424362		
1	7	C4	96	0,404020614	0,2966	0,164639493
2	7	C4	96	0,10707615		
3	7	C4	96	0,378781808		
1	7	C5	96	0,041763521	0,0009	0,042576973
2	7	C5	96	0,00406513		
3	7	C5	96	-0,043210703		
1	7	C1	168	0,457535206	0,426	0,085742896
2	7	C1	168	0,491488299		
3	7	C1	168	0,328940728		
1	7	C2	168	0,300180084	0,3245	0,021138637
2	7	C2	168	0,338796852		
3	7	C2	168	0,33439098		
1	7	C3	168	0,538417452	0,538	0,067020052
2	7	C3	168	0,470833838		
3	7	C3	168	0,604872358		

1	7	C4	168	0,171996115	0,1761	0,023938561
2	7	C4	168	0,201879715		
3	7	C4	168	0,154543596		
1	7	C5	168	0,093729416	0,0518	0,037625146
2	7	C5	168	0,040510756		
3	7	C5	168	0,021046388		
1	8	C1	72	0,736498223	0,6948	0,076617521
2	8	C1	72	0,606386148		
3	8	C1	72	0,741541184		
1	8	C2	72	0,776918657	0,7593	0,272587736
2	8	C2	72	0,478361508		
3	8	C2	72	1,022684312		
1	8	C3	72	1,037838436	1,0571	0,038945442
2	8	C3	72	1,101962401		
3	8	C3	72	1,031607725		
1	8	C4	72	0,305430244	0,3668	0,07789471
2	8	C4	72	0,340550416		
3	8	C4	72	0,454434948		
1	8	C5	72	0,343206472	0,197	0,126713567
2	8	C5	72	0,120000911		
3	8	C5	72	0,127664084		
1	8	C1	96	0,575646273	0,5442	0,030569193
2	8	C1	96	0,514597033		
3	8	C1	96	0,542263425		
1	8	C2	96	0,564695618	0,5853	0,189124812
2	8	C2	96	0,407310135		
3	8	C2	96	0,783873554		
1	8	C3	96	0,775585502	0,7693	0,007082241
2	8	C3	96	0,770685913		
3	8	C3	96	0,76162615		
1	8	C4	96	0,503725755	0,5137	0,012864515
2	8	C4	96	0,509220482		
3	8	C4	96	0,528241058		

1	8	C5	96	0,288169877	0,217	0,061594975
2	8	C5	96	0,181484251		
3	8	C5	96	0,181484251		
1	8	C1	168	0,32077524	0,3168	0,040370379
2	8	C1	168	0,274544657		
3	8	C1	168	0,354986664		
1	8	C2	168	0,382723238	0,3998	0,042315355
2	8	C2	168	0,368602404		
3	8	C2	168	0,447927745		
1	8	C3	168	0,539784516	0,4975	0,056158093
2	8	C3	168	0,518969998		
3	8	C3	168	0,433793467		
1	8	C4	168	0,328940728	0,3458	0,023989781
2	8	C4	168	0,335152886		
3	8	C4	168	0,373248574		
1	8	C5	168	0,171996115	0,1206	0,049615371
2	8	C5	168	0,072975089		
3	8	C5	168	0,116901475		
