

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CANDICE SOARES DIAS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA *SYNECHOCOCCUS*
NIDULANS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS ÁCIDAS DE DRENAGEM DA
REGIÃO DE MINERAÇÃO EM CANDIOTA - RS**

**Bagé – RS
2014**

CANDICE SOARES DIAS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA *SYNECHOCOCCUS*
NIDULANS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS ÁCIDAS DE DRENAGEM DA
REGIÃO DE MINERAÇÃO EM CANDIOTA - RS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Pós-graduação Lato Sensu em Especialização em Processos Agroindustriais da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção de do Título de Especialista em Processos Agroindustriais

Orientador: Professor Doutor Paulo Duarte Filho

**Bagé - RS
2014**

CANDICE SOARES DIAS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA MICROALGA *SYNECHOCOCCUS NIDULANS* PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS ÁCIDAS DE DRENAGEM DA REGIÃO DE MINERAÇÃO EM CANDIOTA - RS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Pós-graduação Lato sensu em Especialização em Processos Agroindustriais da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção de do Título de Especialista em Processos Agroindustriais

Área de concentração: Biotecnologia

Dissertação defendida e aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Doutor Paulo Duarte Filho
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Doutora Ana Paula Manera
UNIPAMPA

Prof. Doutora Caroline Costa Moraes
UNIPAMPA

Dedico este trabalho as minhas filhas e meu marido Luciano, pela paciência, estímulo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Luciano que me deu força, apoio e incentivo, estando sempre ao meu lado nos momentos que precisei.

As minhas filhas Laura e Antônia, que trazem muita alegria e alento em todos os aspectos da minha vida.

A minha mãe que sempre me apoiou em todos os momentos.

Ao meu sogro e sogra preferidos, sempre prestimosos.

Ao meu orientador professor Paulo que acreditou no meu trabalho.

A amiga Clarice que me acompanha desde a iniciação científica, a colega Cíntia a quem devo parte do meu conhecimento, a amiga Andressa pela disposição e aos colegas de trabalho que cederam parte do seu tempo para me ajudar.

"Quando achamos que sabemos as respostas, a vida muda
às perguntas e recomeçamos o aprendizado..."

RESUMO

O Brasil dispõe de uma das maiores reservas de carvão da América, a mais importante é a jazida de Candiota, situada na Borda Sul da Bacia do Paraná, localizada no município de Candiota RS, por possuir cerca de 12 bilhões de toneladas, contribui com 37,9% do total das reservas nacionais. Contudo, a atividade mineradora pode causar impacto ambiental, no que tange as águas de drenagens, as quais podem conter metais pesados, resultando em danos inevitáveis ao meio ambiente prejudicando a qualidade da água e o desenvolvimento da fauna e flora local, bem como as culturas agropastoris. Os processos biológicos apresentam características apropriadas para auxiliar no tratamento de águas residuais. A biorremediação, captação e retenção de uma substância por um organismo a partir de qualquer fonte é uma alternativa. Nesse âmbito, esse trabalho teve por objetivo o cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* em águas de drenagem da região de mineração do município de Candiota a fim de demonstrar seu potencial biotecnológico para o tratamento deste tipo de efluente. Foram realizados experimentos preliminares com a microalga *Synechococcus nidulans* para avaliar seu metabolismo favorável a biorremediação de águas ácidas de drenagem, avaliando seu crescimento em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de cádmio. Foi realizada coleta da água de drenagem em uma área da Companhia Riograndense de Mineração, denominada “malha I” que possui problemas com Drenagem Ácida de Mineração. Submeteu-se a água de drenagem a microalga *Synechococcus nidulans* em condições de laboratório para verificar seu crescimento e por consequência sua potencialidade no tratamento de efluente proveniente da atividade de mineração. Os experimentos foram realizados utilizando três meios diferentes, empregando somente efluente autoclavado como meio, efluente autoclavado com adição de Nitrato de Sódio e Bicarbonato de Sódio como meio e somente meio Zarrouk (controle) em estufas do tipo BOD não estéril a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ com foto-período de 12h por 20 dias. Constatou-se o crescimento e a alcalinização do meio de cultivo para os experimentos com diferentes valores de pH quando começaram em 6,0, para 4,0 não houve crescimento expressivo, já no pH 1,5 a microalga não sobreviveu. No experimento com concentrações diferentes de cádmio observou-se que os valores de biomassa obtidos ao final do cultivo tanto para os cultivos realizados somente com meio Zarrouk, quanto para os realizados com cádmio foram semelhantes. Pode-se inferir que de alguma forma a microalga assimilou o metal pesado presente no meio de cultivo. Quando cultivadas no efluente da Malha I a concentração celular final obtida para os cultivos utilizando o efluente suplementado com NaHCO_3 e NaNO_3 obtiveram maior valor quando comparado com os cultivos utilizando somente o efluente. Isso foi devido ao baixo valor de pH que este tipo de efluente possui, o que está fora da faixa do metabolismo da microalga. Através dos experimentos realizados com o efluente gerado pela drenagem ácida de mineração pode-se concluir que a microalga apresenta crescimento limitado em águas de drenagens ácidas mesmo suplementadas com NaHCO_3 e NaNO_3 . A utilização desse efluente para o crescimento da microalga requer uma nova abordagem para torna-se talvez uma alternativa biotecnológica para o tratamento do mesmo. É necessária a obtenção de informações que permitam avaliar e comprovar através de análise de absorção atômica a capacidade de retenção de metais pesados pela microalga, também caracterização do efluente quanto a presença de metais pesados.

Palavras-chave: efluente, microalga, metais pesados.

ABSTRACT

Brazil has one of the largest coal reserves of America, the most important is the field of Candiota, located on the southern edge of the Paraná Basin, located in Candiota RS, because it has about 12 billion tons, contributes 37.9% of total national reserves. However, mining activities may cause environmental impact, regarding the drainage of water, which may contain heavy metals, resulting in inevitable damage to the environment harming water quality and the development of local fauna and flora, as well as the cultures agropastoral. Biological processes have appropriate characteristics to aid in waste water treatment. Bioremediation, attraction and retention of a substance by a body from any source is an alternative. In this context, this work aimed at the cultivation of microalgae *Synechococcus nidulans* in drainage waters of Candiota county mining region in order to demonstrate their biotechnological potential for the treatment of this type of effluent. Preliminary experiments were carried out with the microalgae *Synechococcus nidulans* to assess its favorable metabolic bioremediation of acid drainage waters, evaluating their growth at different pH values and different concentrations of cadmium. Drain water sample was taken in an area of Riograndense Mining Company, called "mesh I" that has problems with Acid Drainage Mining. He underwent drainage water microalgae *Synechococcus nidulans* under laboratory conditions to verify their growth and consequently its potential in the treatment of effluent from the mining activity. The experiments were performed using three different means, using only autoclaved as effluent medium, autoclaved effluent with addition of Sodium Nitrate and Sodium Bicarbonate as a means and only half Zarrouk (control) in greenhouses BOD not sterile at 28 ± 1 ° C with photo-period of 12 hours for 20 days. It was found growth and alkalization of the medium for the experiments with different pH values when started at 6.0 to 4.0 there was no significant growth, as the pH 1.5 to microalgae did not survive. In the experiment with different concentrations of cadmium was observed that the biomass values obtained at the end of cultivation for both cultures performed only by means Zarrouk, as for the cadmium were conducted with similar. It can be inferred that somehow the microalgae assimilated the heavy metal present in the culture medium. When grown in the effluent from the final lattice I cell concentration obtained for the effluent using cultures supplemented with NaHCO_3 , NaNO_3 obtained a higher value compared with the crops using only the effluent. This was due to the low pH that this type of effluent has, which is out of the microalgae metabolism range. Through experiments carried out with the acid mine drainage effluents generated by mining can be concluded that the limited growth of microalgae present in acid drainage waters even NaHCO_3 and supplemented with NaNO_3 . The use of this effluent to the growth of micro-algae requires a new approach to possibly becomes a biotechnological alternative for the treatment thereof. Obtaining information to assess and demonstrate through analysis of atomic absorption retention capacity of heavy metals by microalgae, also characterize the effluent for the presence of heavy metals is required.

Keywords: wastewater, microalgae, heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência do processo de mineração de carvão a céu aberto da mina de Candiota – RS, com posterior recuperação da área.....	12
Figura 2 - Dragline.....	13
Figura 3 - Etapas de Mineração e Recuperação Ambiental.....	14
Figura 4 - Representação do perfil geológico da formação Rio Bonito na Jazida de Candiota, RS.....	15
Figura 5 - Oxidação da pirita.....	18
Figura 6 - Espécies de microalgas: Cyanophyta: a). <i>Synechococcus nidulans</i> (Pringsheim) Komárek 1970; b). <i>Geitlerinema amphibium</i> (Gomont) Anagnostidis 1989; Chlorophyceae: c). <i>Monactinus simplex</i> (Meyen) Corda 1839; d). <i>Scenedesmus bernardii</i> G.M.Smith 1916; e). Bacillariophyta; f). Chrysophyceae.....	22
Figura 7 - Teste em erlenmeyer.....	25
Figura 8 - Tanques “Turf Scrubber”.....	25
Figura 9 - pH utilizados no experimento.....	26
Figura 10 - Experimento com a microalga <i>Synechococcus nidulans</i> e diferentes concentrações de Cádmio. (a) erlenmeyers contendo o meio Zarouk + Inóluco + Cádmio; (b) Amostras preparadas para leitura de condutividade; (c) Amostras diluídas para leitura da densidade ótica.	28
Figura 11 - Local de coleta do efluente de DAM.....	29
Figura 12 - Efluente de DAM autoclavado.....	30
Figura 13 - Diluições utilizadas para curva padrão.....	31
Figura 14 - Biomassa filtrada.....	31
Figura 15 - Apresenta a média entre as duplicatas no cultivo da microalga em diferentes valores de pH. (a) pH 4,0; (b) pH 6,0; e (c) pH 9,0.....	32
Figura 16 - Cultivo de <i>Synechococcus nidulans</i> em diferentes concentrações de Cádmio: (a) Somente Meio Zarrouk. (b) Com adição de 0,2 mg/L de Cádmio. (c) Com adição de 0,4 mg/L de Cádmio. (d) Com adição de 0,8 mg/L de Cádmio. (e) Com adição de 1,6mg/L de Cádmio.....	34
Figura 17 - Cultivo da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> em efluente de mineração: (a) microalga no efluente, (b) microalga no efluente suplementado e (c) microalga em meio Zarrouk.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de Cádmio para o experimento.....	27
Tabela 2 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com diferentes pH.....	33
Tabela 3 - Análise estatística da concentração celular final do experimento para diferentes valores de pH.....	33
Tabela 4 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com diferentes concentrações de cádmio.....	35
Tabela 5 - Análise de variância para biomassa final obtida no cultivo da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> em diferentes concentrações de cádmio.....	35
Tabela 6 - Caracterização do efluente do processo de mineração e valores exigidos segundo a legislação.....	37
Tabela 7 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com efluente do processo de mineração.....	39
Tabela 8 - Análise de variância para a resposta concentração celular final da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> cultivada em diferentes meios de cultivo.....	39

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1. Objetivos.....	11
1.1.1 Objetivo geral.....	11
1.1.2 Objetivo específico.....	11
2. Revisão bibliográfica.....	12
2.1 Mineração na Região de Candiota – RS.....	12
2.2 Degradação da área de Mineração.....	16
2.3 Metais pesados.....	17
2.4 Drenagem ácida de mina – DAM.....	18
2.5 Biorremediação.....	19
2.6 Microalgas.....	21
2.7 Biorremediação e Microalgas.....	23
3. Metodologia.....	26
3.1 Micro-organismo.....	26
3.2 Cultivo da microalga em diferentes valores de pH.....	26
3.3 Cultivo de microalga em diferentes concentrações de metal pesado – Cádmió.....	27
3.4 Caracterização do efluente.....	28
3.5 Cultivo da Microalga <i>Synechococcus nidulans</i> em efluente do processo de mineração.....	29
3.6 Curva padrão para biomassa.....	30
3.7 Tratamentos dos dados obtidos.....	31
4. Resultados e discussão.....	32
4.1 pH.....	32
4.2 Concentrações de cádmio.....	34
4.3 Caracterização do efluente.....	37
4.4 Cultivo da microalga em efluente de mineração.....	38
5. Considerações finais.....	41
6. Sugestões de trabalhos futuros.....	42
Referências bibliográficas.....	43
Anexos.....	48
Anexo A.....	49
Anexo B.....	50

1. INTRODUÇÃO

A geração de energia utiliza o carvão mineral como alternativa em regiões como o sul do país, visto que nestas regiões concentram as reservas de carvão do Brasil. Devido a qualidade do carvão gaúcho é ideal sua utilização em termoelétricas.

Dentre as reservas de carvão do Brasil, a mais importante é a jazida de Candiota, situada na Borda Sul da Bacia do Paraná, localizada no município de Candiota - RS, cujas coordenadas geográficas são 31° 33'51,8" de latitude sul e 53° 43' 28,1" de longitude oeste, está situado a 400 km da cidade de Porto Alegre. Por possuir cerca de 12 bilhões de toneladas, contribui com 37,9% do total das reservas nacionais, e sendo também o maior jazimento do gênero da América Latina (BRASIL, 1996).

A contaminação do solo e da água decorrente da manipulação de resíduos da mineração nos ecossistemas naturais, resultando em danos inevitáveis ao meio ambiente prejudicando a qualidade da água e o desenvolvimento da fauna e flora local, bem como as culturas agropastoris (MUNIZ, 2006).

A poluição hídrica é muito frequente na região carbonífera, causada pela drenagem ácida, é provavelmente o impacto ambiental mais significativo das operações de mineração e beneficiamento do carvão mineral. A extração do carvão em minas a céu aberto, além da destruição pela retirada do solo da cobertura superficial, leva a uma acidificação do sistema hídrico regional. Processos químicos e biológicos controlam a solubilidade, disponibilidade e mobilidade dos metais presentes no solo. A mineração junto com o intemperismo, a lixiviação do solo, e a acidificação hídrica fazem com que a poluição do solo e de sistemas aquáticos por metais pesados, sejam fatores que afetam a qualidade do meio ambiente e constitui um risco eminente de intoxicação ao homem(LEFFA, 2008).

A busca de alternativas que contemplem processos e técnicas eficientes no combate da poluição torna-se de extrema relevância para que a atividade de mineração seja menos impactante possível ao meio ambiente. Uma das alternativas é a biorremediação, na qual tem por objetivo a captação e retenção de uma substância (contaminante) por um organismo a partir de qualquer fonte (água, sedimento, entre outros).

São necessários estudos que avaliem a contaminação dos recursos hídricos da região do entorno da área de mineração da CRM, e buscar alternativas para minimizar a contaminação das águas ácidas da mineração, através de tratamentos como a biorremediação,

que neutralizem a acidez e minimizem a mobilização de metais pesados nas águas ácidas da mineração.

A utilização de microalgas para remoção de metais pesados em corpos hídricos apresenta-se com uma alternativa biotecnológica para o tratamento de efluentes oriundos do processo de mineração.

Diante do acréscimo da exploração da atividade mineradora da região, justifica-se o estudo com intuito de avaliar a contaminação das águas locais e buscar alternativas de remediação. Tendo em vista que a região é caracterizada pela vasta atividade agropastoril, e que estas atividades dependem diretamente dos recursos hídricos regionais, teme-se a incorporação de metais pesados na cadeia alimentar (FLORES, 1990).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial da microalga *Synechococcus nidulans* para remoção de metais pesados e alcalinização das águas superficiais encontradas na região de Candiota, município do Rio Grande do Sul, evitando assim a dissolução de metais pesados e posterior lixiviação para os aquíferos.

1.1.2 Objetivos específicos

Averiguar a influência de pH no crescimento da microalga *Synechococcus nidulans*.

Examinar a influência do metal pesado no crescimento da microalga *Synechococcus nidulans*.

Cultivar a microalga *Synechococcus nidulans* no efluente da drenagem ácida

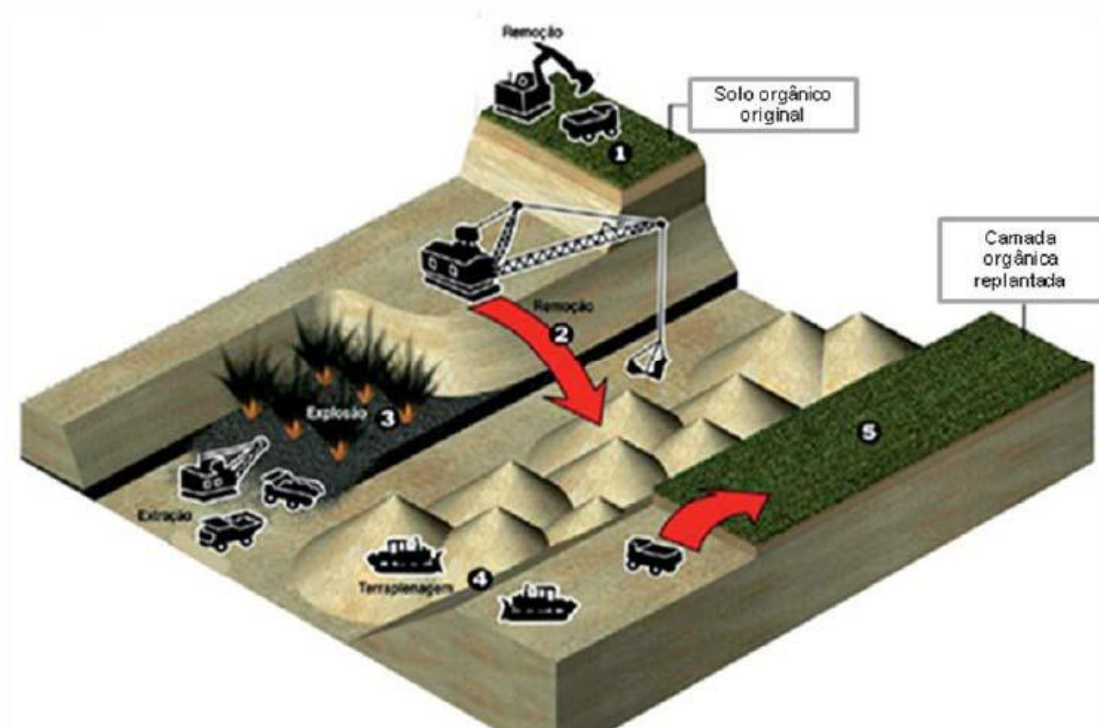
Caracterizar as águas superficiais da Malha I onde foram depositados os resíduos da mineração e os resíduos da queima de carvão da Usina de Candiota “Presidente Médice”, RS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mineração na Região de Candiota – RS

No Rio Grande do Sul e especificamente em Candiota, a mineração é feita utilizando o método a céu aberto (figura 1), também chamado de *strip mining*. A descobertura do carvão é realizado através de uma *dragline* (figura 2) uma espécie de draga construída no local da mineração com o objetivo de remover o material acima do carvão, o uso de bancadas com escavadeiras/caminhões ou a lavra em blocos com combinação de trator *scraper*.

Figura 1 - Sequência do processo de mineração de carvão a céu aberto da mina de Candiota – RS, com posterior recuperação da área.



Fonte: Adaptado de SANTUCCI (2009).

Figura 2 - Dragline



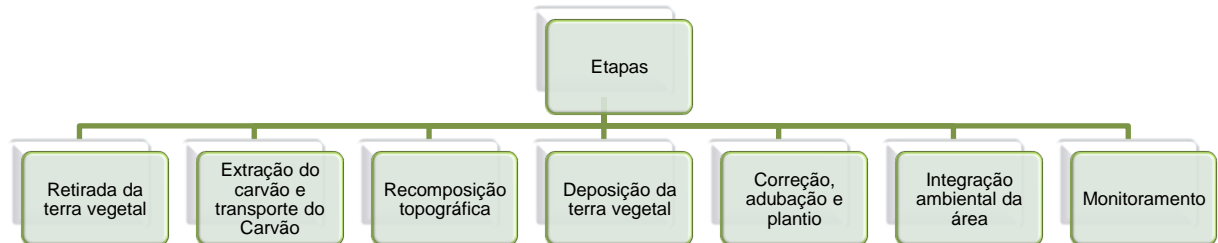
Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Dragline_excavator

A mineração na mina de Candiota é feita pelo método a céu aberto com cortes sucessivos em sistemas de vaivém obedecendo aos seguintes procedimentos técnicos:

- a) retirada do solo superficial e do solo horizonte A, ou seja, camada orgânica superficial e camada de rochas alteradas com matéria orgânica;
- b) retirada dos horizontes B e C constituído de argila, com baixa quantidade de matéria orgânica e acúmulo de minerais;
- c) perfuração e detonação do arenito;
- d) descobertura do carvão através de uma *Dragline*;
- e) perfuração, detonação e extração do carvão do banco superior (BS) e do banco inferior (BI), com separação do argilito intermediário;
- f) recomposição topográfica, constituída pelos materiais de cobertura, com ou sem o aproveitamento de vazios para deposição de cinzas;
- g) deposição da “terra vegetal” (solo superficial e horizonte A originais) sobre a área recomposta topograficamente;
- h) estabelecimento de práticas agrônômicas de preparo, conservação e correção do solo;
- i) plantio de espécies vegetais (SANTOS, 2006).

O Fluxograma a seguir (figura 3) descreve as etapas de mineração e recuperação ambiental divulgadas na página da CRM.

Figura 3 - Etapas de Mineração e Recuperação Ambiental



Fonte: a autora (baseado em dados da CRM)

O carvão mineral é um combustível fóssil sólido formado a partir da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares. Por ação de pressão e temperatura em ambiente sem contato com o ar, em decorrência de soterramento e atividade orogênica (movimentação de placas tectônicas), os restos vegetais ao longo do tempo geológico se solidificam, perdem oxigênio e hidrogênio e se enriquecem em carbono, em um processo denominado carbonificação. Quanto mais intensas a pressão e a temperatura a que a camada de matéria vegetal for submetida, e quanto mais tempo durar o processo, mais alto será o grau de carbonificação atingido, ou rank, e melhor a qualidade do carvão. Os diversos estágios de carbonificação, do menor para o maior rank, são dados pelo esquema: turfa, sapropelito, linhito, carvão sub-betuminoso, carvão betuminoso, antracito. O estágio mínimo para a utilização industrial do carvão é o do linhito. Outro índice qualitativo do carvão é o grade, que mede de forma inversamente proporcional o percentual em massa de matéria mineral incombustível (cinzas) presente na camada carbonífera. Um baixo grade significa que o carvão possui um alto percentual de cinzas misturado à matéria carbonosa, consequentemente, empobrecendo sua qualidade (BORBA, 2001).

O carvão da jazida de Candiota é classificado como betuminoso Alto Volátil C, segundo normas da ASTM (American Society for Testing and Materials). Seu carvão é considerado de baixo rank. Os carvões de baixo rank sofrem rápido desgaste, têm baixo poder calorífico e podem abrasar espontaneamente, por isto são destinados à geração de eletricidade (FLORES, 1990).

A mina de carvão em atividade no município de Candiota é explorada pela Companhia Riograndense de Mineração (CRM) e, devido ao potencial de jazimento a ser explorado, ao

baixo rank de seu carvão e ao tipo de extração (a céu aberto, com baixo custo por tonelada), o carvão mostra-se muito adequado para o uso em termelétricas.

Em 1961, o Departamento Autônomo de Carvão Mineral (DACM), que no ano de 1969 foi transformado em Companhia Riograndense de Mineração (CRM), iniciou os trabalhos de lavra a céu aberto na denominada Malha I, iniciando, também o abastecimento da Usina Termelétrica Candiota I, da Companhia Estadual de Energia Elétrica (CEEE), com potência de 20MW. Na mesma década, foi completada a pesquisa na Malha II, sendo posteriormente realizado o planejamento e a caracterização de duas novas áreas denominadas Malhas III e IV (CGTEE, 2010).

No ano de 1974 foi desativada a Usina Candiota I, entrando em operação a Fase A da nova usina. Em 1986 entrou em operação a segunda etapa dessa nova usina, denominada Fase B com uma previsão estimada de produção de 160MW de energia. Finalmente, em 1989 entrou em operação a última máquina da Usina Candiota II, completando os 446MW de energia previstos inicialmente. Atualmente a Usina Candiota II é denominada “Usina Termelétrica Presidente Médici” e desde a sua instalação vêm sendo cumprido um rigoroso monitoramento dos indicadores de qualidade sócio-ambiental (CGTEE, 2010).

Figura 4 - Representação do perfil geológico da formação Rio Bonito na Jazida de Candiota, RS.



Fonte: Adaptado de Santucci (2009).

São conhecidos 23 leitos de carvão, dos quais somente a camada superficial, a mais importante tanto em espessura quanto em distribuição, tem sido minerada. Esta camada tem espessura média que varia de 2,30 a 6,17m, sendo constituída por dois bancos de carvão, denominados de Candiota Inferior (CI) e Candiota Superior (CS), de características constantes em termos de espessura e qualidade, intercalados com siltitos e argilitos de coloração cinza-escura. A espessura das camadas de silito e de argilito varia em torno de 0,70m (figura 4) (Soares et al., 2006). As litologias se repetem na estratigrafia, e sempre aparecem argilitos confinando os bancos de carvão da formação Rio Bonito, o que garante o ambiente impermeável e redutor propício e necessário para gênese do carvão (SOARES et al., 2006).

2.2 Degradação da área de Mineração

O conjunto de operações realizadas visando à retirada de minério do depósito mineral é chamado lavra, e o depósito mineral em lavra é denominado mina. Esta designação é aplicada mesmo que a extração tenha sido suspensa. A lavra pode ser executada de modo bastante simples, por meio de atividades manuais ou por meios altamente mecanizados e em larga escala, como ocorre nas grandes minerações (TEIXEIRA et al., 2000). O processo de deposição dos rejeitos de carvão leva a perdas do solo, à contaminação das águas superficiais e do lençol freático e a alterações na atmosfera próximas as minas pela geração de poeira, possibilitando, desta forma, o surgimento de um grande número de problemas ambientais e de saúde (SANTOS, 2006). Normalmente, as pilhas de cinzas de carvão fazem limite com muitos compartimentos do ecossistema, tais como ar, água e solo, e dando assim origem a contaminação do ambiente.

A degradação da área a ser minerada é uma consequência inerente ao processo de mineração (GRIFFITH, 1980). Essa poluição decorre da infiltração da água de chuva sobre os rejeitos gerados nas atividades de lavra e beneficiamento, que alcançam os corpos hídricos superficiais e subterrâneos (ANDREOLA, 2011).

A poluição hídrica é muito frequente na região carbonífera, causada pela drenagem ácida, é provavelmente o impacto ambiental mais significativo das operações de mineração e beneficiamento do carvão mineral. A extração do carvão em minas a céu aberto, além da destruição pela retirada do solo da cobertura superficial, leva a uma acidificação do sistema hídrico regional. A poluição do solo e de sistemas aquáticos por metais pesados é um fator que afeta a qualidade do meio ambiente e constitui risco eminente de intoxicação ao homem (ALEXANDRE E KREBS, 1995).

2.3. Metais pesados

O termo metais pesados é amplamente utilizado e refere-se a metais e metalóides com uma densidade atômica superiores a 4 g/cm^3 .

Todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. Entre as mais variadas formas de contaminação do meio ambiente, os principais poluentes são os metais pesados que, apesar de serem essenciais para inúmeros processos metabólicos aos organismos, quando em excesso, podem se tornar potencialmente citotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (MÓDENES, 2013). O fator-chave para determinação da toxicidade do metal pesado é o grau de exposição que o organismo estará exposto. A exposição está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição (GOYER, 1996).

Às vezes o termo metais pesados tóxicos é usado para enfatizar o impacto destes elementos sobre o meio ambiente e, mais especificamente, sobre os seus efeitos sobre a fauna e flora. Alguns dos metais pesados, tais como Cobre, Níquel e Zinco, em concentrações muito baixas, são essências para a vida (também denominado microelementos ou oligoelementos), pois em concentrações baixas desempenham papéis importantes em processos metabólicos que ocorrem em células vivas (GADD, 1993).

Para os seres humanos, os efeitos adversos causados pela exposição aos metais pesados, são relacionados mais com a exposição funcional do que com os níveis gerais de metais no ambiente. Isto se aplica tanto aos trabalhadores do setor de mineração industrial ou agrícola, quanto às pessoas que utilizam compostos de metais pesados diretamente em suas ocupações (JEFFERY, 2001).

Os metais pesados muitas vezes estão associados a problemas de contaminação do ambiente e do próprio ser humano. Para determinar a ocorrência destes metais no meio ambiente, é necessário compreender os processos que controlam a sua mobilidade e que os tornam biodisponíveis. Uma vez que animais ou seres humanos podem entrar em contato com esses contaminantes, torna-se necessário conhecer entre outras coisas, a toxicidade desses compostos.

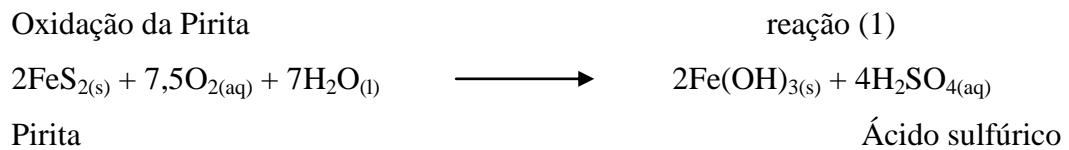
Nos últimos anos, foram realizadas pesquisas com a finalidade de avaliar os possíveis impactos ambientais relacionados ao aumento da concentração de metais pesados no meio ambiente. Esses metais são originários de processos litogênicos e/ou atividades antrópicas, como a utilização de fertilizantes em zonas agrícolas e a atividade mineradora.

2.4. Drenagem ácida de mina – DAM

Como já foi descrito nas etapas de lavra e beneficiamento de carvão mineral, ocorre disposição de resíduos sólidos estéreis e rejeitos constituídos por materiais carbonosos e minerais sem valor comercial. Estes rejeitos, também são ricos em sulfetos de ferro que se oxidam em presença do ar, da água e da ação da bactéria *Thiobacillus ferroxidans*, desencadeando a acidificação de drenagens e a dissolução de metais, originando a drenagem ácida de mina (DAM). A DAM contém íons metálicos dissolvidos (As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Al, Cr, Hg, Mg, Mn) em composições e concentrações que dependem de condições geológicas específicas (FUNGARO, 2005).

Na Figura 5 ocorre a representação do efeito da exposição da pirita e formação do processo de drenagem ácida.

Figura 5 - Oxidação da pirita



Fonte: Holanda Neto 2011

As múltiplas combinações de acidez e íons metálicos fazem com que cada efluente de mineração seja único e, portanto, o tratamento adequado varie de sítio para sítio. Existem métodos de tratamento de DAM utilizados para que o efluente alcance os níveis de descarga de poluentes permitidos pela legislação do Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução CONAMA 430/2011. A melhor entre as alternativas dependerá de fatores técnicos como volume de efluentes, tipo e concentração dos contaminantes presentes, além dos fatores econômicos.

Nos sistemas de tratamentos convencionais, são envolvidos processos de neutralização e precipitação pela adição de substâncias alcalinas, como pedra calcária, lima, hidróxido ou carbonato de sódio. As desvantagens desta tecnologia são a produção de grandes quantidades de lodo, que devem ser dispostas de maneira adequada envolvendo altos custos; a necessidade de uma grande dose de material alcalino para manter o pH acima de 6,5 e os íons metálicos presentes na DAM não são recuperados (FUNGARO, 2006).

Fungaro, 2006 relata que estudos realizados nos Estados Unidos da América - EUA mostraram que a DAM chega a afetar cerca de 23.000 km de cursos d'água; uma típica mina abandonada requer o tratamento de quase 3 milhões de m³ de DAM por ano; o efeito nocivo da DAM foi observado em minas abandonadas há mais de 100 anos. O problema da poluição causado por DAM no Brasil tem sido notificado em várias regiões carboníferas do sul. Três bacias hidrográficas do Estado de Santa Catarina são consideradas impactadas pela atividade mineradora de carvão: a Bacia do Rio Araranguá, do Rio Tubarão e do Rio Urussanga.

A redução dos impactos causados pela poluição do solo e da água é fundamental para a melhoria da qualidade ambiental, visando a garantia de qualidade de vida. Grande parte das técnicas para remediar e minimizar os impactos sobre o solo e água, contaminados por metais pesados, têm sido desenvolvidas para resolver problemas locais, devendo ser adaptadas em função das variações e das condições do meio, (FUNGARO, 2006; DINIS, 2004).

A contaminação de ambientes naturais por elementos-traço (ETs) é um grande problema para a saúde humana e a qualidade ambiental. Alguns elementos-traço são considerados essenciais do ponto de vista biológico, enquanto outros são extremamente tóxicos para os seres vivos. Entretanto, mesmo aqueles essenciais podem, sob condições específicas, causar impactos negativos a ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se, assim, em contaminantes ou poluentes de solo e água (PIERANGELI, 2009).

2.5. Biorremediação

Visto os problemas ambientais decorrentes da poluição oriunda da atividade mineradora, evidencia-se a necessidade de encontrar novas alternativas que venham a minimizar e controlar essa poluição de forma eficiente, evitando a degradação ambiental. Os processos biológicos apresentam características apropriadas para auxiliar no tratamento de águas residuais, recentemente têm realizados estudos sobre remoção de fenóis e clorofenóis, compostos tóxicos, tornando os micro-organismos objetos de diversos estudos e pesquisas (HIRROKA et al., 2003; LIMA et al., 2004).

A biorremediação, na qual tem por objetivo a captação e retenção de uma substância (contaminante) por um organismo a partir de qualquer fonte (água, sedimento, entre outros) é uma alternativa.

Muitos micro-organismos, incluindo bactérias, algas e fungos, possuem a habilidade para remover metais pesados do meio ambiente. A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acumulação, podem variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a linhagem. Tanto as células, como os produtos excretados, parede celular e polissacarídeos têm potencial para remover metais pesados de soluções que a contenham. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação, por parte dos micro-organismos.

Os micro-organismos são capazes de incidir na especiação dos metais, por causa de sua capacidade efetora ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização, que influenciam no equilíbrio dos íons metálicos entre as fases solúveis e insolúveis (GADD, 2004).

A remoção de íons metálicos de soluções aquosas, através do processo de biossorção, utilizando biomassa viva ou morta, tais como bactérias (CHEN et al., 2009), algas (CRUZ et al., 2004; SENTHILKUMAR et al., 2006), fungos (BAYRAMOGLU & ARICA, 2008), cascas de laranjas (FENG et al., 2009) e plantas (UCUN et al., 2008; CHAKRAVARTY et al., 2007; ESPINOZA-QUIÑONES et al., 2009a; ESPINOZA-QUIÑONES et al., 2009b), destaca-se como um tratamento eficaz por possuir alta taxa de renovação na natureza, baixos custos de obtenção, altas remoções de metais e, devido à possibilidade da recuperação do contaminante, seja incinerando a biomassa ou realizando a sua dessorção.

A bioremediação vem evoluindo como uma tecnologia efetiva para o tratamento e a remoção de contaminantes de natureza inorgânica (GAMHAM, 1993; GUPTA, 2001) ou orgânica (GROUDEVA, 2001; POLLUMAA, 2001).

O uso das algas na recuperação de efluentes contendo espécies metálicas apresenta vantagens, como o baixo custo da operação e a elevada eficiência na remoção dos contaminantes de efluentes muito diluídos, mas é necessário conhecer o comportamento do micro-organismo, as características do sistema aquático e da interação contaminante - alga para avaliar a eficácia do seu uso como ferramenta na recuperação do ecossistema. A avaliação do processo de bioremediação obedece a alguns critérios e, primeiramente, é preciso considerar a eficiência da remoção do(s) íon(s) metálico(s). A possibilidade de recuperar o metal de forma economicamente viável e ecologicamente aceitável, sem resíduos

indesejáveis, e finalmente, deve ser considerada a rapidez de todo o processo de remediação do sistema aquático (KAPPOR, 1998; YAN, 2001).

Nesse contexto está a necessidade de buscar novas metodologias de remoção de metais pesados, baseadas no desenvolvimento de procedimentos que promovam o aproveitamento dos micro-organismos.

2.6. Microalgas

As microalgas são organismos do reino monera, unicelulares, procariontes e autótrofos. Habitam vários ambientes, desde que haja umidade, e atuam como “espécies pioneiras” por sua pequena exigência nutricional, capacidade de realizar fotossíntese e de aproveitar o nitrogênio atmosférico (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogêneo de organismos. São predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, podendo formar colônias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. Sua coloração variada é característica oportunizada pela presença de pigmentos e mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (RAVEN et al., 2005). O termo “microalgas” não tem valor taxonômico, uma vez que engloba micro-organismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar a fotossíntese (PÉREZ, 2007).

Andrade et al. (2008) assim como Chisti (2007), caracterizam as microalgas como micro-organismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para converter em várias formas de energia, para produzirem biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos), que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis e suplementos alimentares, e também empregados na captura de dióxido de carbono atmosférico. As microalgas produzem mais oxigênio de que as plantas, sendo responsáveis por pelo menos 60% da produção de oxigênio atmosférico (CHISTI, 2004).

As microalgas existem em um variado número de classes e são distinguidas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As principais linhagens de microalgas em termos de abundância são descritas por Raven et al. (2005):

a) *Diatomáceas (Bacillariophyta)*, da qual existem aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada a espécie que domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontrada em ambientes de água doce. Apresenta sílica como constituinte da parede celular,

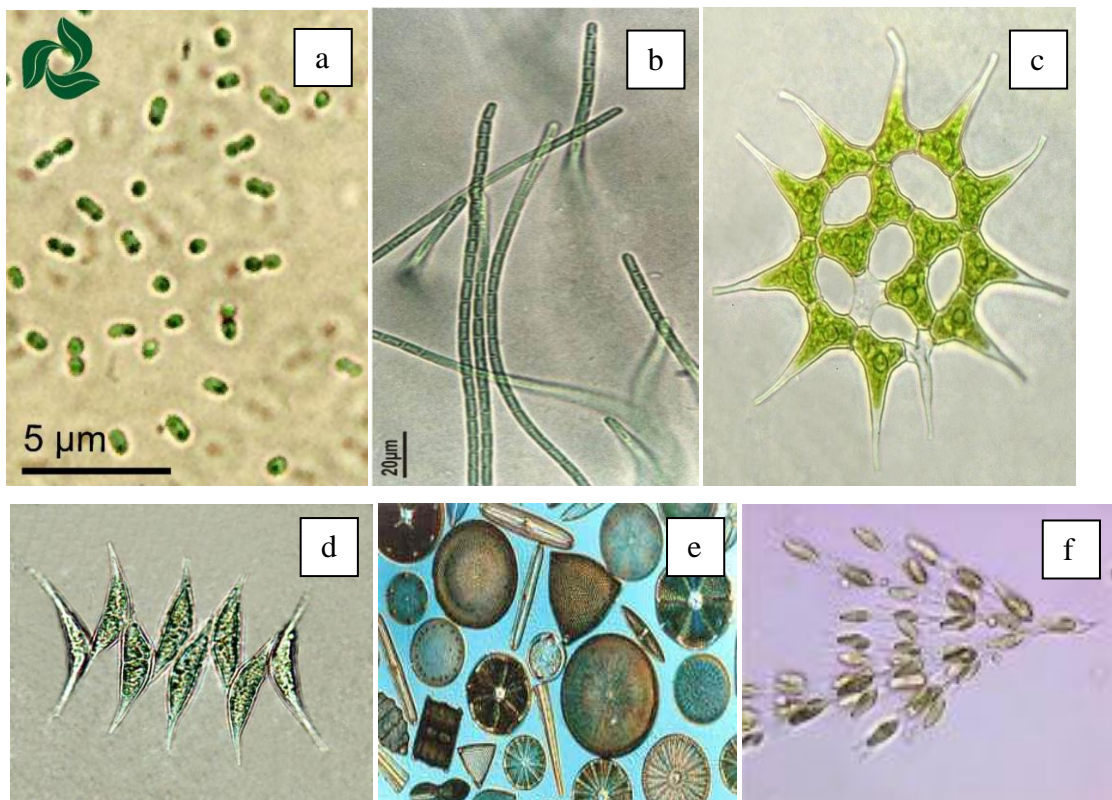
e a reserva de carboidratos se dá mediante óleo ou polímeros de carboidrato, conhecido como crisolaminarina;

b) *Algas Verdes (Chlorophyceae)* representadas por cerca de 17.000 espécies, são encontradas em meio marinho ou em água doce. Sua produção energética se dá principalmente, em forma de amido;

c) *Algas azuis (Cyanophyta)*, conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de oxigênio. Compreende cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diversos ambientes;

d) *Algas Douradas (Chrysophyceae)* que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente de água doce, são semelhantes às diatomáceas.

Figura 6 – Espécies de microalgas: Cyanophyta: a). *Synechococcus nidulans* (Pringsheim) Komárek 1970; b). *Geitlerinema amphibium* (Gomont) Anagnostidis 1989; Chlorophyceae: c). *Monactinus simplex* (Meyen) Corda 1839; d). *Scenedesmus bernardii* G.M.Smith 1916; e). Bacillariophyta; f). Chrysophyceae.



Fonte: a), b), c), e d) Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras, 2012. e). <http://www.mundoeducacao.com/biologia/algas-unicelulares.htm>. f) http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=chrysophyta&lang=3

As microalgas possuem inúmeras aplicações, como utilização pela indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, na produção de biocombustíveis, bem como no tratamento de efluentes (SCHMITZ, 2012).

Muitos micro-organismos possuem capacidade de remover metais pesados do meio ambiente. A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acúmulo, pode variar amplamente, de acordo com a espécie microbiana. Segundo Lemos et al. (2008), células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos tem potencial para remover metais de soluções que os contêm. Nesse sentido, devido às interações entre microalgas e o ambiente, o uso destes organismos com objetivo de restabelecer sistemas aquáticos, apresenta-se como alternativa para processos de biorremediação.

Benchrakac (2014) descreve a microalga *Synechococcus sp.* como uma pequena célula cilíndrica que é um importante produtor primário no plâncton de água doce e marinha, e também foi encontrada nas superfícies de algas e plantas. Esta espécie tem sido associada aos eventos "carbonato de cálcio", produção de carbonatos suspensos refinadas que, eventualmente, contribuir para sedimentar a deposição de carbonato (GRAHAM ; WILCOX, 2000).

2.7 Biorremediação e Microalgas

Os micro-organismos são capazes de afetar a especiação dos metais pesados, devido a sua capacidade ativa ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização, que influenciam o equilíbrio dos íons metálicos entre as fases líquidas e sólidas (GADD, 2004).

As microalgas possuem diferentes mecanismos de tolerância aos metais pesados, como: ligação extracelular e precipitação; impermeabilidade e exclusão; e desintoxicação interna. A ligação extracelular ocorre pela ligação do metal com polímeros e proteínas da membrana, protegendo-a de efeitos tóxicos pela redução na concentração de cátions de metal livre na água. O mecanismo de impermeabilidade envolve a diminuição do acúmulo interno de metais, mudança de potencial da membrana e permeabilidade, diminuindo a absorção do metal. No caso da exclusão, ocorre o efluxo de metais para fora da célula. A desintoxicação interna pode ocorrer através da ligação a determinados compostos intracelulares, como metalotioneínas e fitoquelatinas ou através do transporte de metais para compartimentos celulares específicos (KAPLAN, 2004; RAUSER, 1990; PAWLIK, 2001; INTORN, 2001).

As metalotioneínas são uma família de proteínas com ligação a um metal, mostrando concentração de íons metálicos livres em algas. A mesma função é observada por fitoquelatinas que são peptídeos sintetizados enzimaticamente.

Há uma variedade de algas em estudo de investigação sobre a remoção de metais pesados. A microalga *Chlorella sp.* e a *Scenedesmus sp.* por possuírem uma ampla área superficial são consideradas eficientes na remoção de metais em águas (TAM et al., 1998).

Williams(1978) e Wood e Wang (1985) desenvolveram modelos para a interação íon metálico – alga de qualquer processo biótico, onde a superfície dos organismos desempenha um papel predominante nas ligações aos metais.

Gardea-Torresdey (1990) estudaram cinco espécies de algas e monitoraram a adsorção de metais antes e depois da esterificação dos grupos carboxílicos. Os resultados sugerem que os grupos carboxílicos estão envolvidos na captação de íons Cu e Al, mas não são responsáveis pela retenção de Au.

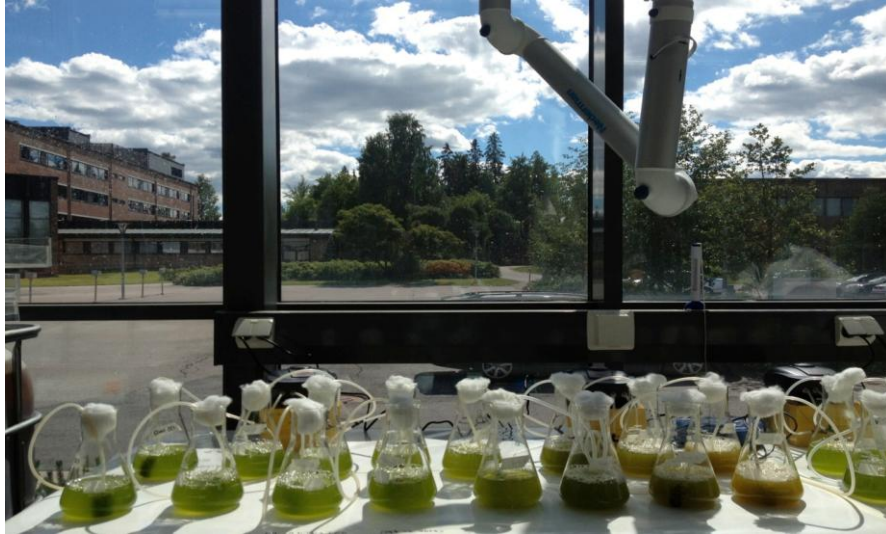
Vidotti (2004) relata que organismos vivos ou mortos podem captar íons metálicos em solução, mas não havendo atividade biológica para as células mortas, a captação ocorre independentemente do metabolismo.

O mecanismo de remoção de metais pesados pelas microalgas se dá por possuírem uma carga elétrica superficial negativa e, portanto uma afinidade para os metais pesados que se apresentam na forma de cátions. Dinis (2004), citando Becker (1994); Tam *et al.* (1998), relata que as microalgas concentram certos metais pesados cerca de 1000 vezes mais nas suas células do que no meio exterior, dependendo da concentração das células, do tipo e da concentração do metal e das condições ambientais.

De acordo com Avery et al. (1998), a acumulação de metais pesados por microalgas engloba duas fases. Uma fase rápida de adsorção que dura entre 5-10 minutos, sendo reversível e independente do metabolismo, e uma segunda fase mais lenta, na qual ocorre difusão dos metais para o interior das células, acumulação quase sempre irreversível e que depende do metabolismo do micro-organismo. Segundo Becker (1994), o tempo de saturação intracelular é de aproximadamente 24 horas.

Benchraka (2014), realizou experimentos com um complexo de algas com 10 algas diferentes, entre elas estava a *Synechococcus sp.*, foram testados efluente de áreas de mineração com pH inicial de 2,4 e pH corrigido para 4,5, pelo período de 20 dias, usando erlenmeyer (figura 7) e tanques “Turf Scrubber” (figura 8) simulando uma estação de tratamento.

Figura 7: Teste em erlenmeyer.



Fonte: Zarrin Jafri In: Benchraka 2014

No experimento de Benchraka (2014), o complexo de dez espécies de microalgas apresentaram melhor resultado quando o pH foi corrigido para 4,5, alguns cultivos com maior concentração de metais não sobreviveram.

Figura 8: Tanques “Turf Scrubber”.



Fonte: Grobler 2013 In: Benchraka 2014

3. METODOLOGIA

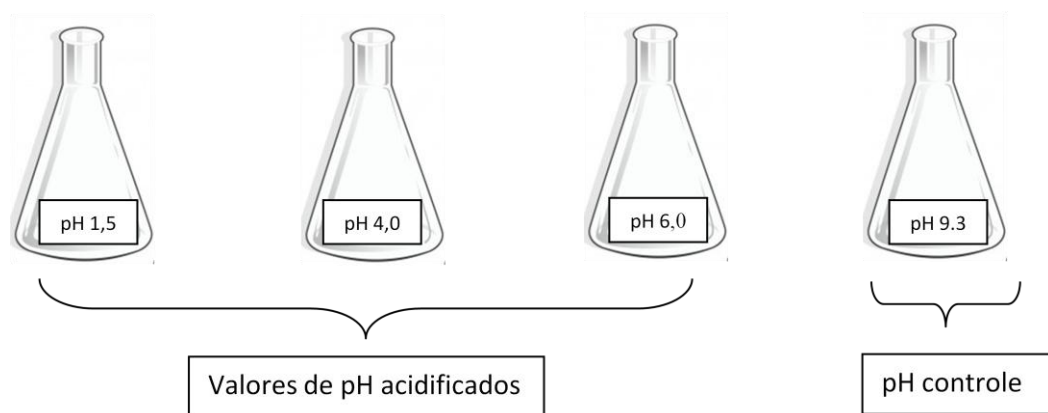
3.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nesse estudo foi a microalga *Synechococcus nidulans* LEB 52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. As microalgas foram mantidas em meio Meio Zarrouk (Zarrouk, 1966) cuja composição encontra-se no anexo A, em estufa tipo BOD, não estéril a temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h.

3.2 Cultivo da microalga em diferentes valores de pH

A DAM ocasiona uma queda drástica de pH nas águas encontradas em áreas onde ocorreu atividade de mineração. Para avaliar o comportamento da microalga *Synechococcus nidulans* realizou-se o cultivo da mesma em diferentes valores de pH. Os valores de pH iniciais utilizados foram, 1,5, 4,0, 6,0 e 9,3 (controle: pH do Meio Zarrouk) conforme mostra a Figura 9. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 1000 mL com volume útil aproximado de 500 mL em estufa do tipo BOD não estéril a temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$ com aeração, em duplicata. Foi utilizado fotoperíodo de 12 h. Para a correção do pH ao valor desejado, foi utilizado ácido sulfúrico (H_2SO_4 P. A.) . A figura 8 ilustra os valores determinados para o experimento de pH.

Figura 9 - pH utilizados no experimento:



Fonte: autora, 2014

Durante o período de cultivo (aproximadamente 10 dias), foram avaliados o crescimento celular através de densidade ótica e o acompanhamento de pH sempre no horário de troca do fotoperíodo de 12 h da fase clara para fase escura.

3.3 Cultivo de microalga em diferentes concentrações de metal pesado – Cádmi

Foram realizados cultivos com a microalga *Synechococcus nidulans* em meio Zarrouk contendo cádmio nas concentrações, na qual podem ser visualizadas na Tabela 1. O experimento 1 representava somente o meio Zarrouk, o experimento 2 foi acrescido de 0,2 mg/L de Cádmi, obedecendo o valor máximo do parâmetro permitido por lei para que este elemento seja encontrado em águas superficiais, o experimento 3 contém 0,4 mg/L de Cádmi, o experimento 4 adicionado de 0,8 mg/L e o experimento 5 foi implementado com 1,6 mg/L.

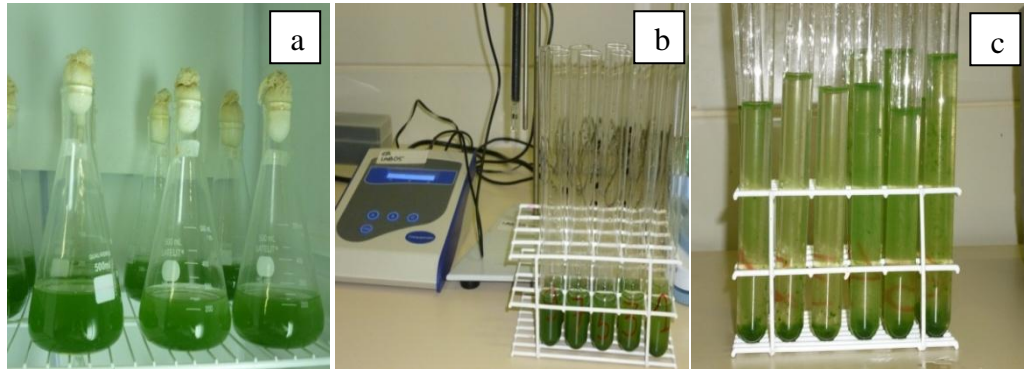
Tabela 1 – Concentrações de Cádmi para o experimento

Experimentos	Cádmi	Volume
1	-	-
2	0,2mg/L	50µL
3	0,4mg/L	100µL
4	0,8mg/L	200µL
5	1,6mg/L	400µL

Fonte: autora, 2014

Para o experimento foram testadas quatro concentrações de cádmio em duplicata, cultivadas em estufa do tipo BOD não estéril a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ com foto-período de 12 h por 10 dias (figura 10). Foram utilizados erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de solução (Meio Zarrouk + Inóculo +Cádmi), sem aeração mecânica, apenas agitação manual duas vezes ao dia. Na Figura 10. mostra o experimento com microalga *Synechococcus nidulans*.

Figura 10 - Experimento com a microalga *Synechococcus nidulans* e diferentes concentrações de Cádmi. (a) erlenmeyers contendo o meio Zarouk + Inóculo + Cádmi; (b) Amostras preparadas para leitura de condutividade; (c) Amostras diluídas para leitura da densidade ótica.



Fonte: a autora, 2014

3.4 Caracterização do efluente

A primeira área a ser minerada da CRM também denominada “Malha I” (figura 11), nunca foi tratada, pois na época em que começaram as explorações de carvão na região não havia uma legislação ambiental significativa, tão pouco uma preocupação com o meio ambiente, esta área foi posteriormente reflorestada e faz parte do passivo da empresa sem ter sofrido recuperação ambiental.

As águas ali encontradas não apresentaram modificações nos últimos anos e por se manter constante foi escolhida para o experimento, sendo coletada água em 18 de agosto de 2014.

As análises disponíveis para este trabalho incluíram a leitura de pH através de phmetro, coletando a amostra do efluente em um becker de 50 mL e em seguida, mergulhado o eletrodo, que após um breve repouso para estabilizar será feita a leitura., turbidez através de turbidímetro, após a calibragem do equipamento será realizada a leitura de turbidez, O₂ dissolvido com medidor de oxigênio dissolvido que realiza a leitura da concentração de oxigênio na solução, demanda química de oxigênio (DQO), o método mede a concentração de matéria orgânica oxidada, O procedimento se baseia na oxidação da matéria utilizando dicromato de potássio, como oxidante em presença de ácido sulfúrico e íons de prata, misturados como catalisador. A solução aquosa é aquecida em refluxo durante 2 h a 148 °C, logo se avalia a quantidade do dicromato sem reagir titulando com uma solução de ferro(II) utilizando a metodologia descrita no Manual da Cetesb e demanda bioquímica de oxigênio

(DBO), a amostra é mantida em um recipiente fechado equipado com um sensor de pressão. Uma substância que absorva o dióxido de carbono (geralmente hidróxido de lítio) é adicionada no recipiente, acima do nível da amostra. A amostra é armazenada e mantida em estufa durante cinco dias, a 20°C, em frasco âmbar (para evitar que haja fotossíntese, o que resultaria na produção de oxigênio adicional) e com o pH ajustado entre 6,5 e 8,5.. O oxigênio é consumido e, como a oxidação de amônia é inibida, o dióxido de carbono é liberado. A quantidade total de gás e, portanto, a pressão, diminui porque o dióxido de carbono é absorvido. A partir da queda de pressão, o sensor eletrônico calcula e exibe a quantidade de oxigênio consumido.

Determinou-se as análises de alcalinidade por neutralização, dureza por complexação (NBR 12621/set 1992), cloretos por precipitação - Mohr, fósforo por métodos colorimétricos Murphy & Riley (1962) e nitrogênio por métodos colorimétricos Koroleff (1976).

Na Figura 11, pode-se visualizar área da Malha I da CRM onde foram feitas a coleta de efluente da DAM.

Figura 11 - Local de coleta do efluente de DAM.



Fonte: autora, 2014

3.5 Cultivo da Microalga *Synechococcus nidulans* em efluente do processo de mineração

A água coletada na área da CRM foi armazenada em galões de 5 L e após a caracterização em laboratório, foram esterilizadas para a adição de inóculo em concentração conhecida de aproximadamente 0,1 g/L.

Foi delineado três ensaios com a água coletada. O primeiro usou somente a amostra, o segundo utilizou-se a amostra suplementada com NaHCO_3 e NaNO_3 nas mesmas concentrações encontradas no meio Zarrouk, e o terceiro utilizou-se somente meio Zarrouk, ambos foram realizados em duplicata.

O experimento foi realizado em duplicata em estufa do tipo BOD não estéril a $28\pm 1^\circ\text{C}$ com foto-período de 12 h por 20 dias. Foram utilizados erlenmeyers de 2000 mL com volume útil de 1000 mL e aeração suprida por compressores de ar.

A Figura 12 representa a água retirada da Malha I e esterilizada em autoclave por 15 minutos, apresentando sedimentação amarelada.

Figura 12. Efluente de DAM autoclavado.



Fonte: autora, 2014

3.6 Curva padrão para biomassa

A concentração celular pode ser determinada através de vários e diferentes métodos. Um dos métodos mais utilizados para a medida da concentração de biomassa é obter a correlação da densidade ótica com o peso seco da microalga.

Para isso, foram realizadas dez diluições (figura 13), a partir de uma solução mãe de microalga que variaram entre as leituras ideais de 20% a 80% de transmitância. Para cada diluição foi feita a leitura de densidade ótica em 570 nm, bem como determinação do peso seco.

Após as leituras foi feita a filtração utilizando um kit de filtração estéril com filtro milipore $0,22\ \mu\text{m}$ seco e pesado previamente para cada diluição (figura 14).

Em seguida foram levados a estufa e seco a temperatura de 40°C por 24 h. Pesados e calculado a biomassa em cada diluição.

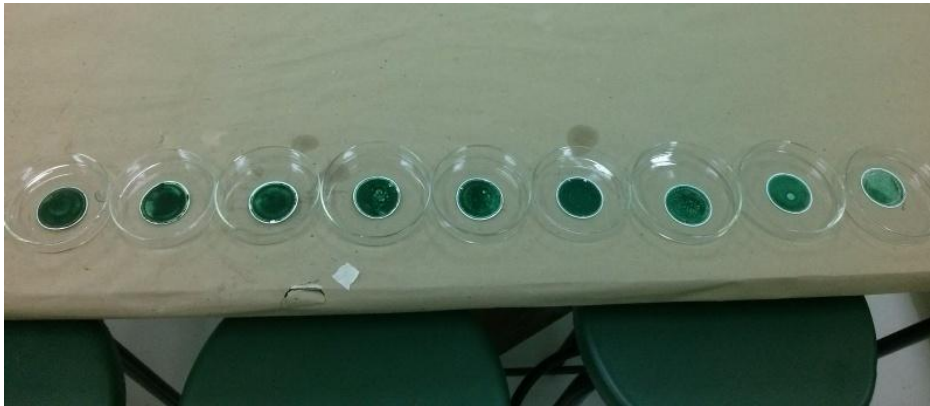
Com os valores de densidade ótica *versus* peso seco foi obtida a curva padrão apresentada em no Anexo B.

Figura 13 - Diluições utilizadas para curva padrão.



Fonte: autora, 2014

Figura 14 – Biomassa filtrada



Fonte: autora, 2014

3.7 Tratamentos dos dados obtidos

Todos os experimentos realizados foram avaliados conforme o tempo de geração (T_g), a velocidade específicas máxima de crescimento (μ_{max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento (ΔLog).

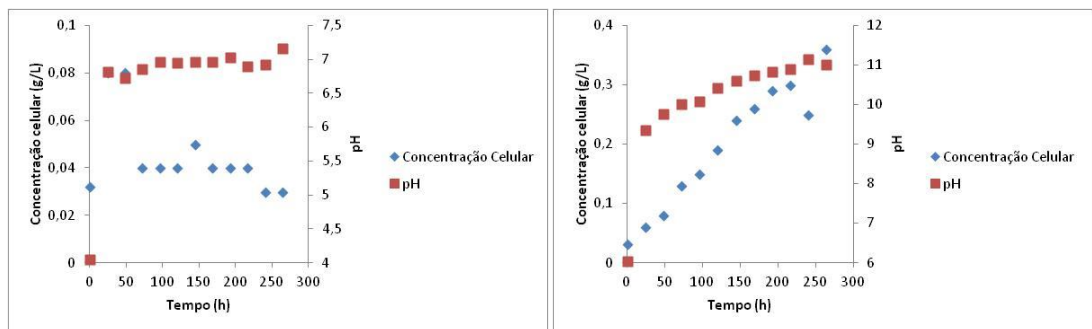
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Cultivo da microalga em diferentes valores de pH

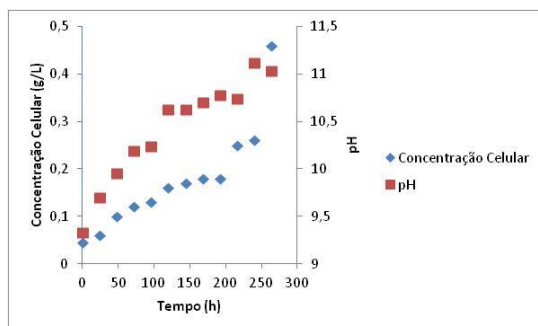
O Meio Zarrouk possui pH em torno de 9,0, nesse sentido, houve a necessidade de averiguar o comportamento da microalga *Synechococcus nidulans*, e verificar o crescimento e desenvolvimento em meios mais ácidos com pH inferior a 7,0. Os meios de cultivos para microalgas apresentam um pH básico, entorno de 9,0, devido a sua formulação. Já os efluentes líquidos gerados na degradação ambiental das áreas de mineração, tornam-se ácidos pelo processo de lixiviação e pela ação da bactéria *Thiobacillus ferroxidans*. Nestes experimentos foi possível verificar o crescimento da microalga *Synechococcus nidulans* em diferentes valores de pH, para que fosse diagnosticado os valores tolerados pela microalga e verificar o seu potencial de crescimento e alcalinização quando submetida a um efluente ácido. A Figura 15 apresenta o crescimento da microalga *Synechococcus nidulans* em meio Zarrouk em diferentes valores de pH.

Figura 15 - Apresenta a média entre as duplicatas no cultivo da microalga em diferentes valores de pH. (a) pH 4,0; (b) pH 6,0; e (c) pH 9,0.



(a)

(b)



(c)

Fonte: autora, 2014

Conforme se observa na figura 15 foi possível constatar crescimento e a alcalinização do meio no cultivo que começaram com pH 6,0, chegando ao pH 11,13. No experimento que utilizou o pH de 1,50, a microalga não apresentou crescimento por isso o resultado não foi apresentado.

No experimento que foi utilizado pH 4,0, apesar de não ter apresentado um crescimento expressivo, o pH do meio foi alterado atingindo valores de pH próximo a 7,0. Este dado se torna importante porque indica que em pH ácido a microalga pode vir a alcalinizar o meio e reduzindo a disponibilidade de metais pesados no meio.

No experimento com pH 6,0 a microalga apresentou um crescimento bastante próximo ao obtido com meio Zarrouk, apresentando velocidade específica máxima de crescimento superior ao controle como podemos ver na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com diferentes pH.

Experimento	Conc. celular final (g.L ⁻¹)	pH	Tg (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	ΔLog (h)
1	0,46±0,025	9,3	42,787	0,0162	48
2	0,03±0,01	4,0	150,684	0,0046	48
3	0,37±0,055	6,0	37,067	0,0187	72

Fonte: autora, 2014

A Tabela 3 apresenta a análise estatística para os valores de concentração celular final da microalga *Synechococcus nidulans* cultivada em diferentes valores de pH.

Verifica-se que pH influenciou (F calculado > F crítico) na concentração celular final obtida pela microalga *Synechococcus nidulans* quando cultivada sob diferentes valores de pH.

Tabela 3 - Análise estatística da concentração celular final do experimento para diferentes valores de pH.

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,200	2	0,100	40,126	0,007	9,552
Dentro dos grupos	0,007	3	0,003			
Total	0,208	5				

Análise de variância $\alpha=5\%$

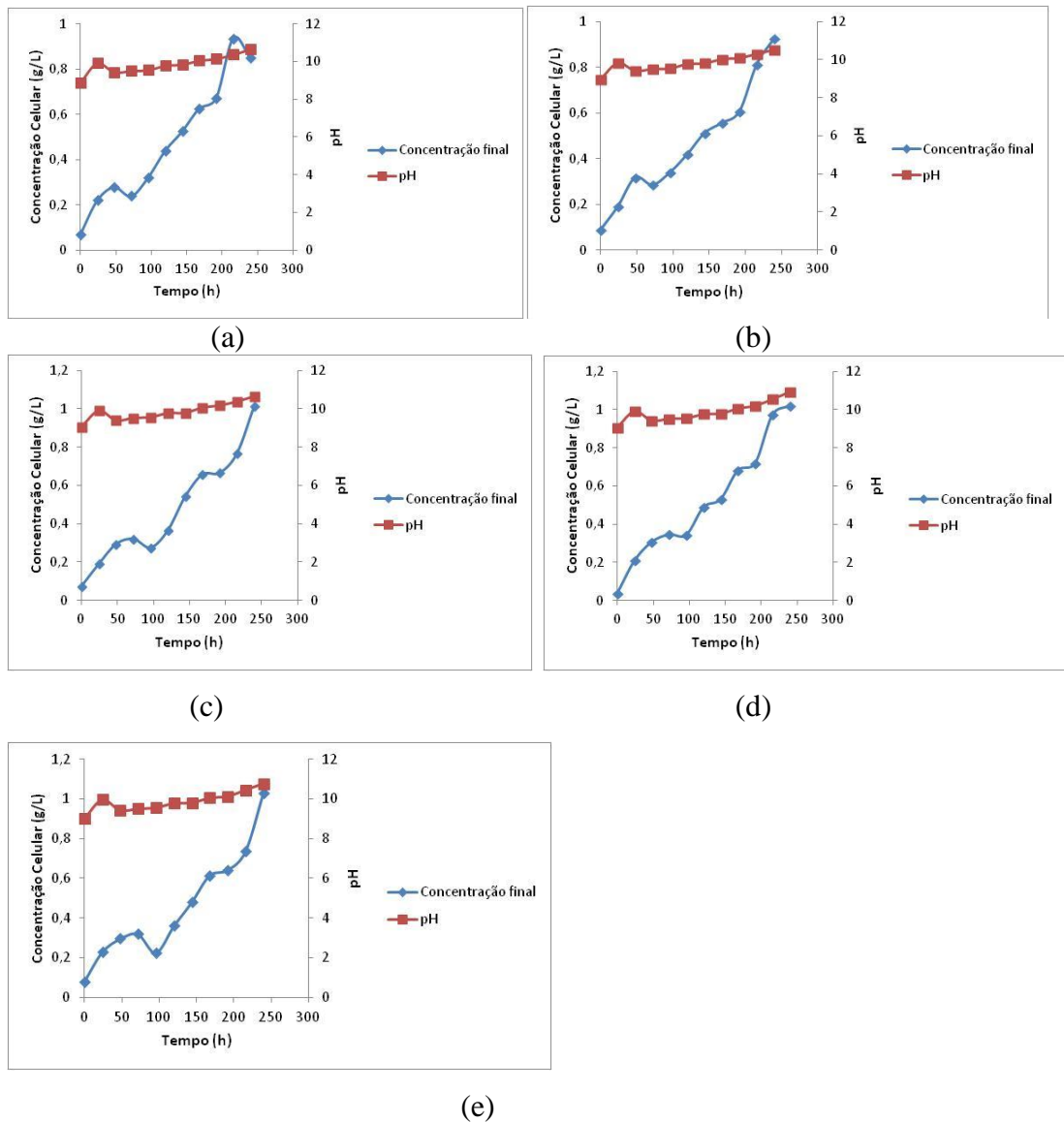
Fonte: autora, 2014

4.2. Concentrações de cádmio

Analisando a figura 13, pode-se observar que não houve variação de concentração de biomassa e pH entre os cultivos para as diferentes concentrações de cádmio utilizadas.

Nas figuras 13a, 13b, 13c, 13d e 13e estão representadas a concentração celular e o pH para o cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* em meio Zarrouk sem adição de cádmio, em meio Zarrouk com adição de 0,2mg/L de cádmio, em meio Zarrouk com adição de 0,4mg/L de cádmio, em meio Zarrouk com adição de 0,8mg/L de cádmio, e em meio Zarrouk com adição de 1,6 mg/L de cádmio, respectivamente..

Figura 13 - Cultivo de *Synechococcus nidulans* em diferentes concentrações de Cádmio: (a) Somente Meio Zarrouk. (b) Com adição de 0,2 mg/L de Cádmio. (c) Com adição de 0,4 mg/L de Cádmio. (d) Com adição de 0,8 mg/L de Cádmio. (e) Com adição de 1,6mg/L de Cádmio.



A Tabela 4 apresenta a concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com diferentes concentrações de cádmio.

Tabela 4 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com diferentes concentrações de cádmio.

Experimento	Conc. celular final (g.L ⁻¹)	Concentração de cádmio (mg.L ⁻¹)	Tg (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	ΔLog (h)
1	0,862±0,177	0	68,628	0,010	96
2	0,937±0,180	0,2	84,530	0,008	72
3	0,898±0,004	0,4	55,452	0,013	72
4	1,019±0,002	0,8	77,882	0,009	72
5	0,887±0,054	1,6	50,228	0,014	72

Fonte: autora, 2014

Ao realizar uma análise dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 4, não se pode traçar um perfil do comportamento da microalga frente ao seu crescimento em diferentes concentrações de cádmio. Observa-se que a maior μ_{\max} foi obtida no cultivo realizado com maior concentração de cádmio. Contudo, a maior biomassa final foi obtida no experimento realizado com 0,8 mg.L⁻¹ de cádmio.

Observa-se que os valores de biomassa obtidos ao final do cultivo tanto para os cultivos realizados somente com meio Zarrouk, quanto para os realizados com cádmio foram semelhantes. Através de análise de variância (Tabela 5), foi verificado que as diferentes concentrações de cádmio utilizadas não afetaram (F calculado < F crítico) os valores finais de biomassa obtidos.

Tabela 5 - Análise de variância para biomassa final obtida no cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* em diferentes concentrações de cádmio.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,030	4	0,007	0,568	0,69	5,192
Dentro dos grupos	0,066	5	0,013			
Total	0,097	9				

Fonte: autora, 2014

Contudo, ressalta-se que nos experimentos 4 e 5 foram obtidos valores elevados erro padrão da média, o que pode ter prejudicado em parte a análise estatística realizada. Pode-se inferir que de alguma forma a microalga assimilou o metal pesado presente no meio de cultivo, pois há naturalmente uma adsorção rápida quando micro-organismos são expostos a metais livres, ou uma acumulação lenta no interior da célula. Entretanto, é necessário que se realize análises no meio logo após o cultivo para determinação de quanto foi efetivamente adsorvido e acumulado de cádmio pela microalga.

O cádmio é um metal pesado com alto potencial toxicológico encontrado na composição das cinzas do carvão que forma o rejeito, depositado nas cavas de mineração. A presença natural de cádmio no meio ambiente, aparentemente, não tem causado problemas significativos para a saúde humana, pois encontra-se em baixas concentrações. Porém, a DAM em áreas de mineração torna o cádmio um dos mais frequentes contaminantes do meio ambiente. Para os seres humanos, os efeitos adversos causados pela exposição aos metais pesados estão relacionados mais com a exposição funcional do que com os níveis gerais de metais no ambiente. Isto se aplica tanto aos trabalhadores do setor de mineração, industrial ou agrícola, quanto às pessoas que utilizam compostos de metais pesados diretamente em suas ocupações (JEFFERY, 2001).

Por não apresentar cádmio na composição do Meio Zarrouk e pelo seu potencial toxicológico, foi realizado o experimento para detectar o crescimento e desenvolvimento da microalga *Synechococcus nidulans* em concentrações conhecidas do metal cádmio e superiores a concentração permitida baseadas na Resolução CONAMA n°. 430 de 2011. Essa resolução dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, onde determina que o padrão de lançamento de efluentes para o Cádmio seja no máximo de 0,2mg/L e testado a tolerância até oito vezes o permitido.

A capacidade das algas para absorver altas concentrações de metais pesados apresenta-se como uma possibilidade para a remoção desses íons das águas residuais. Isto será possível pelo desenvolvimento de tecnologias eficazes envolvendo a utilização algas e tornar viável comercialmente através do conhecimento da metalssorção por algas (CRITICAL REVIEWS, 2005).

4.3 Caracterização do efluente

Os efluentes oriundos de sistemas de disposição final de resíduos sólidos de qualquer origem devem atender às condições e padrões definidos no artigo 16 da Resolução 430, de 13 de maio de 2011 do CONAMA que dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Foram realizadas análises quantitativas de fósforo, nitrogênio, ferro, alcalinidade, dureza, cloretos e a avaliação da demanda química de oxigênio (DQO) e a demanda biológica de oxigênio (DBO) em cinco dias.

Para lançamento de efluente a legislação permite pH em torno de 5 a 9, porém este efluente não é lançado, mas sim é o resultado da lixiviação do depósito de sólidos gerados durante o processo de mineração e que apresentou pH de 3,12 condutividade 424µS/cm, Oxigênio dissolvido 12,5mg/L e turbidez 2,62 UNT.

Não há vazão de lançamento do efluente, são lagoas formadas pelo acúmulo da chuva, drenagem do solo e relevo do terreno, portanto os valores de DBO e DQO não podem ser avaliados conforme a legislação. Os valores de DBO e DQO encontrados foram DBO 8,5mg/L, DQO 33,0935mg/L, sendo que a legislação apenas fala em remoção mínima de 60% de DBO para o corpo receptor.

Para nitrogênio amoniacal e para ferro dissolvido a legislação permite 20,0 mg/L N e 15,0 mg/L Fe. Foram encontrados através dos métodos utilizados os valores de 0,42 mg/L de N e 0,25 mg/L de Fe, para fósforo foi encontrado 0,013 mg/L de P, enquanto que a legislação fala em padrões de lançamento de fósforo conforme parâmetros de ecotoxicidade.

Tabela 6 - Caracterização do efluente do processo de mineração e valores exigidos segundo a legislação.

Padrões	Efluente	Legislação para águas classe 3	Legislação efluentes de mineração
pH	3,12	6,0 a 9,0	5,0 a 9,0
Condutividade	424µS/cm	-	-
OD	12,5mg/L	4 mg/L	-
Turbidez	2,62 UNT	100 UNT	-
DBO	8,5mg/L	10 mg/L	-
DQO	33,09mg/L	-	-
Ferro dissolvido	0,25 mg/L	5,0 mg/L	15,0 mg/L
N amoniacal	0,42 mg/L	13,3 mg/L N, para pH ≤ 7,5	20,0 mg/L
P	0,013 mg/L	0,05 mg/L	-

Fonte: autora, 2014

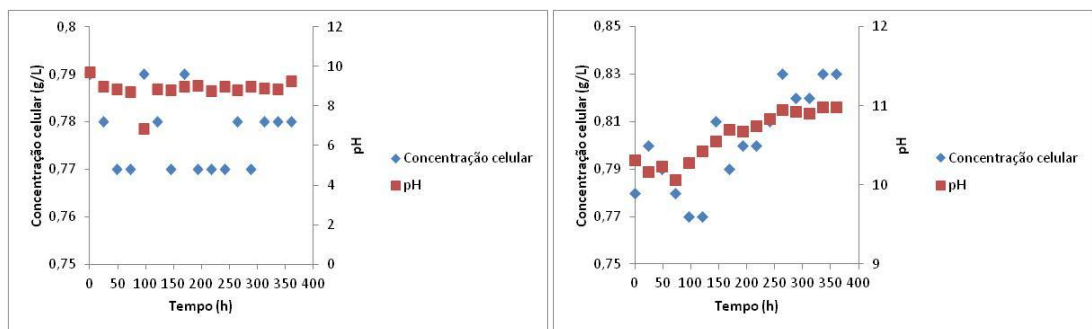
Efluente gerado da lixiviação também foi analisado quanto a alcalinidade que apresentou 162,14 mg/L de CaCO_3 , quanto a dureza 202,1 mg/L de CaCO_3 , e para cloretos 29,69 mg/L de Cl.

4.4 Cultivo da microalga em efluente de mineração

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a microalga apresentou crescimento bastante limitado nos experimentos em que foram utilizadas somente o efluente, bem como o efluente suplementado com os nutrientes NaHCO_3 e NaNO_3 .

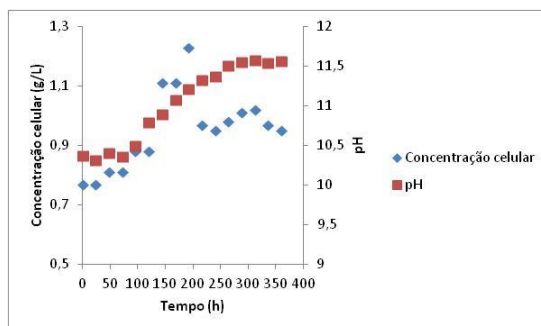
Na figura 17 apresenta o cultivo da Microalga *Synechococcus nidulans* e a variação de pH quando cultivada no efluente (malha 1), efluente (malha 1 suplementado com NaHCO_3 e NaNO_3) e no meio Zarrouk.

Figura 17 - Cultivo da microalga *Synechococcus nidulans* em efluente de mineração: (a) microalga no efluente, (b) microalga no efluente suplementado e (c) microalga em meio Zarrouk.



(a)

(b)



(c)

Fonte: autora, 2014

A Tabela 7 apresenta a concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com efluente do processo de mineração.

Tabela 7 - Concentração celular final, tempo de geração (Tg), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e intervalo da fase logarítmica de crescimento para os experimentos realizados com efluente do processo de mineração

Experimento	Meio de cultivo	Conc. celular final (g.L ⁻¹)	Tg (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	ΔLog (h)
1	Malha 1	0,777 ± 0,003	693,147	0,001	48
2	Malha 1 + NaHCO ₃ + NaNO ₃	0,829 ± 0,007	693,147	0,001	48
3	Zarrouk	0,948 ± 0,001	138,62	0,005	72

Fonte: autora, 2014

A concentração celular final obtida para os cultivos utilizando o efluente suplementado com NaHCO₃ e NaNO₃ obtiveram maior valor quando comparado com os cultivos utilizando somente o efluente. Contudo, as μ_{\max} foram idênticas. Pode-se afirmar que a microalga não apresenta crescimento adequado utilizando somente o efluente. Faz-se necessário um novo estudo sobre a composição de nutrientes a serem adicionados ao efluente para que a mesma consiga obter maior crescimento.

A Tabela 8 apresenta a análise de variância para a resposta concentração celular final da microalga. *Synechococcus nidulans* cultivada em diferentes meios de cultivo.

Tabela 8 - Análise de variância para a resposta concentração celular final da microalga. *Synechococcus nidulans* cultivada em diferentes meios de cultivo.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,030	2	0,015	374,869	0,000252	9,552
Dentro dos grupos	0,0001	3	4,11E-05			
Total	0,031	5				

Fonte: autora, 2014

Ao se realizar a análise de variância (Tabela 8), pode-se verificar que os diferentes meios de cultivo influenciaram na resposta concentração celular final obtida pela microalga.

O mesmo foi observado nos cultivos realizados em efluente de mineração da malha I da área da CRM, apresentando depósito no fundo do frasco, fato provavelmente ocorrido devido ao baixo pH de 3,5 do efluente, fora da faixa de metabolismo das microalgas utilizadas.

Quando o efluente teve o pH alterado com adição de NaHCO_3 e NaNO_3 também apresentou crescimento limitado. O experimento foi realizado com fotoperíodo de 12 h, em trabalhos realizados por Benchraka (2014), foram monitorados os valores diário do pH e a taxa de luminosidade, onde o pH foi aumentado quando maior era a incidência de luz, ou seja quando a microalga realiza fotossíntese tende a aumentar o pH do meio, sugere-se como alternativa utilização de incidência de luz 24 h.

Para o sequestro de metais pesados por microalgas vivas depende da seletividade da microalga para o metal em questão (BROWN, 1996). Microalgas são muito sensíveis a mudanças em seu ambiente. Em resposta a níveis de concentração de diversos poluentes orgânicos e inorgânicos, incluindo metais pesados, ocorrem mudanças no seu metabolismo geral. As microalgas são, portanto, muitas vezes usadas como sensores biológicos para a detecção de potenciais efeitos tóxicos de metais pesados (TORRES *et al*, 2000;. CHOUTEAU *et al.*, 2004;. DURRIEU *et al*, 2011).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto a tolerância das microalgas aos metais pesados, a *Synechococcus nidulans* apresentou crescimento em soluções de cádmio em concentrações de 0,2 mg/L a 1,6 mg/L.

No que se refere ao seu metabolismo, a microalga apresentou crescimento a partir de pH 6,0.

Através dos experimentos realizados com o efluente gerado pela DAM pode-se concluir que a microalga apresenta crescimento limitado em águas de drenagens ácidas mesmo suplementadas com NaHCO_3 e NaNO_3 . A utilização desse efluente para o crescimento da microalga requer uma nova abordagem para torna-se talvez uma alternativa biotecnológica para o tratamento do mesmo.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Obtenção de informações que permitam avaliar e comprovar através de análise de absorção atômica a capacidade de retenção de metais pesados pela microalga.
- Caracterização do efluente quanto a presença de metais pesados.
- Utilizar maiores concentrações iniciais de biomassa para a realização dos experimentos.
- Testar outros micro-organismos para verificar o potencial de tratamento deste tipo de efluente.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, N.Z.; KREBS, A.S.J. Qualidade das Águas Superficiais do Município de Criciúma, SC. Porto Alegre: CPRM, 1995. 1 v. Programa de Informações Básicas para Gestão Territorial de Santa Catarina – PROGESC. (Série Recursos Hídricos, v.6).

ANDREOLA, A. Avaliação dos Atributos Químicos de um Solo Construído Pós-Mineração de Carvão no Município de Lauro Müller, SC. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2011. 61 p. Disponível em:
<[http://manejodosolo.cav.udesc.br/www17/messias_up/conteudos/737b04b11960546b17bdad9deb832056/file/Di ssertacao%20de%20Mestrado%20Ariane%20Andreola.pdf](http://manejodosolo.cav.udesc.br/www17/messias_up/conteudos/737b04b11960546b17bdad9deb832056/file/Di%20ssertacao%20de%20Mestrado%20Ariane%20Andreola.pdf)>.

BACCAN, N., ANDRADE, IC, GODINHO, O. E. S et al. Química Analítica Quantitativa Elementar. 3 ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2004.

BENCHRAKA C.; Algae Removal of Heavy Metals from Mining Wastewaters Bachelor's thesis 40 pages, appendices 4 pages March 2014 Finlandia.

BETHMANN, B. & SCHÖNKNECHT, G. 2009. pH regulation in na acidophilic Green alga – a quantitative analysis. *New Phytologist*. 183:327 -339.

BORBA, R. F., Carvão Mineral In: INFORMATIVO ANUAL DA INDÚSTRIA CARBONÍFERA, – 2001 – Brasília – DNPM.

Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Informativo Anual da Industria Carbonífera, DNPM, Brasília, 1996.

BROWN, L. M.; Removal of heavy metals from water with microalgal resins I. PROCESS DEVELOPMENT CLF Technologies, Inc. P.O. Box 24036 Denver, CO 80224 Agreement No. 1425-5-CR-81-20290 Water Treatment Technology Program Report No. 74 October 1996

Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J-M. & Durrieu, C. (2004) Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosens. Bioelectron*. 19: 1089– 1096.

COTORAS, D.; VIEDMA, P.; CIFUENTES, L. e MESTRE, A.; Sorption of metal ions by whole cells of Bacillus and Micrococcus. *Environ. Technol. Lett*. 13:551–559, 1992.

CRIST, R. H.; OBERHOLSER, K.; SCHWARTZ, D.; MARZOFF, J.; RYDER, D.; CRIST, D. R.; Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* 22(7):755-760, 1988.

Critical Reviews in Biotechnology 2005, Vol. 25 Issue 3, p113-152-152, <http://content.epnet.com/> (acessado em: 24 abril, 2014)

[Dinis, M.A.P.](#), Monteiro, A. e Boaventura, R. Tratamento de Águas Residuais: O Papel das Microalgas, [Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia](#), Universidade Fernando Pessoa, (1), 41-54. (2004).

Durrieu, C., Guedri, H., Fremion, F. & Volatier, L. (2011) Unicellular algae used as biosensors for chemical detection in Mediterranean lagoon and coastal waters. *Res. Microbiol.* 162: 908–914.

FAISON, B. D.; CANCEL, C. A.; LEWIS, S. N. e ADLER, H. I.; Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*. *Appl. Environ. Microbio.* v. 56, n. 12, pp. 2.649-3.656, 1990.

FORES, E. M. M., Utilização de amostras ambientais das regiões de Candiota e de Charqueadas (RS) como bioindicadores de poluição. Santa Maria, 1990. 158p. Dissertação (Mestrado em química) – Curso de Pós- graduação em química as UFSM.

FUNGARO, D. A., IZIDORO J. C, Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 735-740, 2006

GADD, G. M.; Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119, 2004.

Gadd, G.M. & White, R.D. (1993) Microbial treatment of metal pollution – working biotechnology? *Trends Biotechnol.* 11: 353–359.

Garnham, G. W.; Codd, G. A.; Gadd, G. M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 39, 666.

Gazea, B.; Adam, K.; Kontopoulos, A.; *Miner. Eng.* 1996, 9, 23.

GAZSÓ, L.G. ; The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment, *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.* 7, pp. 178–185, 2001.

GOYER, R. A. Toxic Effects of Metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons, New York: McGraw Hill, 1996. p. 691-736.

GRASSHOF, K. Determination of nitrate and nitrite. In: KOROLEFF, F. Methods of Seawater analysis. 2ed. Verlag Chemie, Weinheim, p. 134-144. 1976.

GRIFFITH, J. J. Recuperação conservacionista da superfície de áreas mineradas: uma revisão de literatura. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, UFV, 1980. 106p.

Groudeva, V. I.; Groudeva, S. N.; Doycheva, A. S.; *Int. J. Miner. Process.* 2001, 62, 293.

Gupta, V. K.; Shrivastava, A. K.; Jain, N.; *Water Res.* 2001, 35, 4079.

HOLANDA NETO, M. R. Atributos microbiológicos de um solo construído vegetado com gramíneas após mineração de carvão em Candiota/RS. Dissertação de Mestrado 2011.

Inthorn, d. 2001. Removal of Heavy Metal by Using Microalgae. In: Kojima, H. & Lee, Y. K. Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology. Hong Kong: Springer. 111 – 135p.

Kapoor, A.; Viraraghavan, T.; *Water Res.* 1998, 32, 1968.

LEFFA, D. D.; ANDRADE, V. M. Potencial genotóxico de metais em areias mineradas de carvão. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*, Vol. 4, Nº 1. UNESC: 2008. Disponível em: <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/viewFile/141/146>

LEMOS, J. S.; CARLOS, M. C.; FARIAS, Y. P-T. M. M.; SANTOS, R. L. C. Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008, 65p.

Macêdo, M. I. F.; *Resumos do Encontro Nacional de Química Analítica*, São Luís, Brasil, 2003.

Maschio, J.; *Folha de São Paulo*, São Paulo, Caderno Cotidiano, 21 de novembro de 2004, p. C5.

Mckinnon, W.; Choung, J. W.; Xu, Z.; Finch, J. A.; *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 2576.

Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA no 357 de 17 de Março de 2005, <http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>, acessada em Abril 2006.

MÓDENES, A. N.; QUINÕNE, F. R. E.; LAVARDA, F. L.; COLOMBO, A.; BORBA, C. E.; LEICHTWEIS, W. A.; MORA, N. D.; Remoção dos metais pesados Cd(II), Cu(II) e Zn(II) pelo processo de bioabsorção utilizando a macrófita *Eichhornia crassipes* – Rem: Revista Escola de Minas, vol. 66, num. 3, Julio-septiembre, 2013, PP. 355-362 Escola de Minas Ouro Preto, Brasil

MURPHY, J. & RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27; 31-36, 1962

NAKAJIMA, A.; SAKAGUSHI, T.; Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, pp. 59-64, 1986.

OLIVEIRA, A.P.A.; LUZ, A.B. Recursos hídricos e tratamento de águas na mineração. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001.36 p. (Série Tecnologia Ambiental, 24).

Pierangeli M.A.P., Eguchi E., Ruppim R.F., Costa R.B.F., Vieira D.F. 2009. Teores de As, Pb, Cd e Hg e fertilidade de solos da região do Vale do Alto Guaporé, sudoeste do estado de Mato Grosso. *Revista Acta Amazônica*,39(1):61-70.

Pollumaa, L.; Maloveryan, A.; Trapido, M.; Sillak, H.; Kahru, A.; *Altern. Lab. Anim.* 2001, 29, 259.

SANTOS, D. C. Alterações químicas e biológicas em solo de área de mineração de carvão submetido a diferentes cultivos. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

SANTUCCI, J. O papel do carvão mineral na geração de energia. In: Carvão mineral: responsável por 40% da eletricidade mundial. Porto Alegre, RS. CREARS, 2009, 38p.
Sasowsky, I.; Foos, A.; Miller, C.; *Water Res.* 2000, 34, 2742.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC – UPF*, v.4, n. 1, p.48-60, 2012.

Schneider, H. C. 2006. Controle da Drenagem Ácida de Minas na Mineração de carvão de Santa Catarina: Caso da Mina Um II – Verdinho. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. 133p.

Torres, E., Cid, A., Herrero, C. & Abalde, J. (2000) Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Water, Air, Soil Pollut.* 117: 1–14.

VIDOTTI, E.C; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos a biorremediação e a química analítica. *Quim. Nova*, v.27, n. 1, 139 – 145, 2004.

Yan, G.; Viraraghavan, T.; *Bioresour. Technol.* 2001, 78, 243).

Anexos

Composição química do meio Zarrouk

Reagentes	Quantidades
NaHCO ₃	3 16,8(g.L-1)
K ₂ HPO ₄	0,5(g.L-1)
NaNO ₃	2,5(g.L-1)
K ₂ SO ₄	1,0(g.L-1)
NaCl	1,0(g.L-1)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2(g.L-1)
CaCl ₂	0,04(g.L-1)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01(g.L-1)
EDTA	0,08(g.L-1)
Solução A5	1 mL
Solução B6	1 mL

Solução A5 (g.L-1): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,222; CuCO₃.5H₂O: 0,079; MnO₃: 0,015.

Solução B6 (g.L-1): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; NaWO₄. 2H₂O: 17,94; 34 TiOSO₄. H₂SO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

Curva padrão utilizada no experimento

