

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Caracterização da Diversidade de
Eucariotas Fototróficos Provenientes de
Águas Ácidas de Mina**

Telma Cristina Teixeira Valente

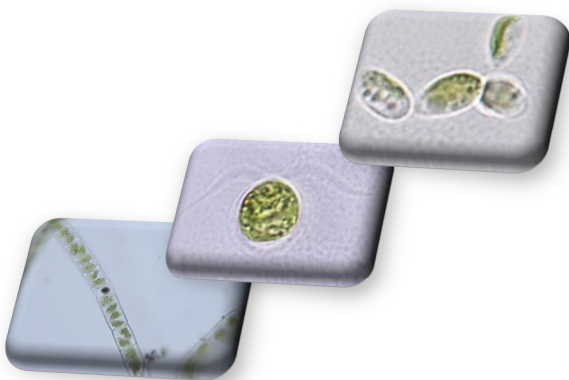
Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Faro 2012

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

*Caracterização da Diversidade de Eucariotas
Fototróficos Provenientes de Águas Ácidas de Mina*

Telma Cristina Teixeira Valente
(Licenciada em Bioquímica)
Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana



Orientada por:

Prof.^a Doutora Margarida P. Reis

Prof.^a Doutora Filomena Fonseca

CIMA – Laboratório de Ecologia Molecular e Microbiana

Faro 2012

After a while you learn
the subtle difference between
holding a hand and chaining a soul
and you learn
that love doesn't mean leaning
and company doesn't always mean security.

And you begin to learn
that kisses aren't contracts
and presents aren't promises
and you begin to accept your defeats
with your head up and your eyes ahead
with the grace of woman, not the grief of a child
and you learn
to build all your roads on today
because tomorrow's ground is
too uncertain for plans
and futures have a way of falling down
in mid-flight.

After a while you learn
that even sunshine burns
if you get too much
so you plant your own garden
and decorate your own soul
instead of waiting for someone
to bring you flowers.
And you learn that you really can endure
you really are strong
you really do have worth
and you learn
and you learn
with every goodbye, you learn...

Veronica Shoffstall

1971

Este trabalho é da exclusiva responsabilidade de:

Telma Valente

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria acontecido sem a boa influência de algumas pessoas que foram fundamentais.

Primeiro tenho que agradecer à pessoa que motivou o ingresso no Mestrado, mas que foi a que mais vezes ficou privada da minha companhia, a minha filha. Sem ela nada disto teria o mesmo sentido ou o mesmo sabor... Em igualdade de direitos, e com um “muito obrigado” muito especial, agradeço aos meus pais que sempre tiveram ao meu lado, e que, à sua maneira, me foram transmitindo confiança e motivação para seguir em frente.

Agradeço à Professora Doutora Margarida Reis que me “deu o bichinho” das microalgas e me orientou. Agradeço à Professora Doutora Filomena Fonseca pela orientação que me proporcionou e pela infinita paciência que teve para as “perguntas que não lembram a ninguém”. Não poderia faltar o agradecimento à Filipa Esteves, que me orientou nas “lides” da biologia molecular e que, também, tem uma paciência muito grande.

À Maria Rodrigues, que soube empurrar e “dar nas orelhas” quando foi preciso, que soube incentivar quando a motivação não era muita, mas principalmente quando partilhou comigo os bons momentos aqui vividos.

À Célia Domingos que teve sempre uma palavra de incentivo, mesmo quando não sabia que ela era necessária.

Às Colegas do laboratório 1.73, Ana Flor e Sandra Mesquita, do laboratório 2.8, Cátia Guerra e do gabinete 1.72, Cristina Costa e Sandra Caetano, que sempre se mostraram disponíveis e tiveram sempre uma palavra de incentivo.

A alguém especial que soube transmitir, apesar de longe, confiança e que em alguns momentos foi muito importante.

Agradeço a todos os que de uma forma mais ou menos presente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Estou grata por ter trabalhado com pessoas que me transmitiram um pouco do conhecimento que possuem. A todos,

Muito Obrigada!

Resumo

O presente trabalho teve por objetivos principais caracterizar a diversidade de organismos fototróficos acidófilos ou acidotolerantes presentes nas águas ácidas provenientes da drenagem ácida de mina, na Área Mineira Abandonada de S. Domingos (Mértola, Portugal); produzir culturas unialgais de microalgas acidotolerantes e/ou acidófilas; e verificar o potencial biotecnológico de uma estirpe isolada com base na sua caracterização fisiológica.

Procedeu-se à recolha de amostras que foram identificadas morfológicamente, recorrendo a microscopia, e molecularmente, recorrendo a técnicas de extração de DNA, de amplificação por PCR, de clonagem e de sequenciação, com base em marcadores como sequências conservadas dos 18S rDNA e 23S rDNA. Identificou-se quatro géneros de organismos fototróficos acidófilos, nomeadamente, *Euglena*, *Coccomyxa*, *Chlamydomonas* e *Klebsormidium*, bem como diatomáceas (Bacillariophyceae). Além destes eucariotas, também foi possível identificar, molecularmente, dois géneros de bactérias, *Acidiphilium* e *Variovorax*.

Isolou-se duas microalgas dos géneros *Coccomyxa* e *Chlamydomonas*, em culturas unialgais, mas não axénicas, utilizando o meio MK a pH 2.5 e recorrendo a técnicas como o riscado à exaustão. Com o isolado de *Coccomyxa* sp. foi possível fazer estudos fisiológicos, de modo a determinar os potenciais biotecnológicos desta microalga, utilizando como alvos a acumulação de carotenóides e a produção malondialdeído (MDA). Verificou-se a taxa de crescimento desta microalga em dois níveis de pH diferentes (2.5 e 6.5/7.0), duas fontes de azoto (ureia - MKU e nitrato - MK) e em duas intensidades luminosas diferentes. A combinação entre o pH 6.5, a intensidade luminosa mais elevada e a fonte de azoto sob a forma de nitrato proporcionou a taxa de crescimento média mais elevada. A acumulação de carotenoides foi maior na cultura em meio MK a pH 6.5 com a intensidade luminosa elevada. Mediu-se MDA como parâmetro indicador da indução de stress oxidativo em duas concentrações de cobre (0.4 e 0.8 mM).

Palavras-chave: AMD; microalgas; extremófilos; isolamento; cultivo; interesse biotecnológico; carotenoides; stress oxidativo.

Abstract

The objective of this work was to characterize the main diversity of acidophilic and acid tolerant phototrophic organisms present in acidic waters produced by acid mine drainage at the Abandoned Mining Site of S. Domingos (Mértola, Portugal); to produce unialgal cultures of acidophilic / acid tolerant microalgae and to assess their biotechnological potential based on physiological characters.

Collected samples were morphologically identified through microscopic observations and molecularly, using DNA extraction techniques, PCR amplification, cloning and sequencing, with 18S rDNA and 23S rDNA genes as markers. Four genera of phototrophic acidophilic organisms were identified, namely *Euglena*, *Coccomyxa*, *Chlamydomonas*, *Klebsormidium* as well as diatoms (Bacillariophyceae). In addition to these eukaryota, it was possible to molecularly identify two genera of bacteria, *Acidiphilium* and *Variovorax*.

Two microalgae from the genera *Coccomyxa* and *Chlamydomonas* were isolated in unialgal but non axenic cultures, using the MK medium pH 2.5 and techniques such as plate streaking for purification. The *Coccomyxa* sp. isolate was submitted to physiological studies in order to estimate the biotechnology potential, by targeting carotenoid accumulation and malondialdehyde (MDA) production. Growth rates at two different pH levels (2.5 and 6.5/7.0), two sources of nitrogen (urea - MKU and nitrate - MK) and two different light intensities were determined. The combination of pH 6.5, with the highest light intensity and nitrate as nitrogen source provided the highest median growth rate. Higher carotenoid accumulation was detected in MK medium cultures at pH 6.5 with the high radiation intensity. MDA was measured as indicator parameter for oxidative stress induction, for two concentrations of copper (0.4 and 0.8 mM).

Keywords: AMD, microalgae, extremophiles, isolation, cultivation, biotechnological interest, carotenoids, oxidative stress.

Abreviaturas

A – Absorvência

AMA – Área Mineira Abandonada

AMD – Acid Mine Drainage

ARD – Acid Rock Drainage

Aps – Ammonium Persulfate

BHT – Butylated Hydroxytoluene (hidroxitolueno butilato)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – base pair(s) (par(es) de bases)

C – Concentração

CCAP – Culture Collection of Algae and Protozoa (Coleção de Culturas de Algas e Protozoários)

CCMAR – Centro de Ciências do Mar

Cu²⁺ - Ião Cobre (II)

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante)

DMSO – Dimetil sulfoxide

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DO – Densidade Ótica

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

EPS – Extracellular Polymeric Substances (substâncias poliméricas extracelulares)

Fe₂S – Sulfureto de ferro (pirite)

HL – High Light

H₂S – Ácido Sulfídrico

IPB – Iberian Pyrite Belt (Faixa Piritosa Ibérica)

IPTG – Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside

LB Agar – Lysogeny Bertani Agar

LL – Low Light

MDA – Malondialdeido

MK – K9 Modificado (meio de cultura)

MKU – K9 Modificado com Ureia (meio de cultura)

Abreviaturas

Mt – Megatoneladas (10⁶ toneladas)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

PCR – Polymerase Chain Reaction

pf – Peso fresco

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

rpm – rotações por minuto

RuBisCO – Ribulose-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase

SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism

t – Tempo

TAE – Tris-Acetate-EDTA

TBA – Thiobarbituric Acid (Ácido Tiobarbitúrico)

TBE – Tris-Borate-EDTA

TCA – Trichloroacetic Acid (Ácido Tricloroacético)

TGGE – Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese Desnaturante por Gradiente de Temperatura)

UV – Ultravioleta

X-gal – 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

°C – Graus centígrados

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1 – Faixa Piritosa Ibérica e a localização da Área Mineira Abandonada de S. Domingos ●. Adaptado de Torno, (2006)	3
Figura 2 - Escombreira (A1), cinzas (A2) e escórias (B), Achada do Gamo, Área Mineira Abandonada de S. Domingos, registadas a 31 de março de 2011 (Fotografias Telma Valente)	4
Figura 3 – Exemplo das terras queimadas, fotografia tirada dia 31 de março de 2011, Telheiro – Área Mineira Abandonada de S. Domingos (Fotografia Telma Valente).	5
Figura 4 – Locais de amostragem assinalados (1, 2 e 3) no mapa da área mineira abandonada de S. Domingos. Fonte: Google Earth (8.05.2011).	15
Figura 5 – Aspeto dos locais de recolha de biofilme em diferentes pontos na Achada do Gamo (AMA de S. Domingos, 31 de março de 2011). A - zona onde foi recolhido bentos; B - zona onde foi recolhido plâncton; C - zona onde foi recolhido plâncton. (Fotografias Telma Valente)	15
Figura 6 – Recolha de amostras planctónicas usando um copo adaptado a um cabo extensível, Achada do Gamo (AMA de S. Domingos, 31 de março de 2011). (Fotografias Telma Valente)	16
Figura 7 – Três das quatro amostras recolhidas dia 9 de fevereiro de 2011 na Área Mineira Abandonada de S. Domingos. A - amostra de plâncton; B - amostra de plâncton; C - amostra de bentos. (Fotografias Telma Valente)	17
Figura 8 – Esquema do processo de desnaturação dos fragmentos para aplicar nos géis de acrilamida 8% (v/v) em TBE 1x.	22
Figura 9 – Protocolo de revelação dos géis de SSCP.	23

Lista de Figuras

- Figura 10** – Microalga filamentosa do género Klebsormidium; 1. Zoósporos dentro dos zoosporângios, 2. Cloroplasto, 3. Poro de saída do zoósporo. 25
- Figura 11** – Microalga filamentosa do género Klebsormidium; 1. Cloroplasto. 26
- Figura 12** – Microscopia de epifluorescência com o corante Azul do Nilo; Microalga filamentosa do género Klebsormidium; 1. Cloroplasto, 2. Estrutura Lipídica. 26
- Figura 13** – Microscopia de campo claro, colónia de organismos eucariotas idênticos a coanoflagelados. 27
- Figura 14** – A: Microscopia de campo claro. Microalgas do género Coccomyxa; B: Microscopia de epifluorescência. Estruturas cloroplastidiais da microalga do género Coccomyxa. 27
- Figura 15** – Diatomáceas. **A** - microscopia de campo claro com identificação de: **1** - vista valvar, **2** - vista pleural. **B** – microscopia de epifluorescência onde se observa os cloroplastos. 28
- Figura 16** – Microalga do género Chlamydomonas; 2 - Flagelos. 28
- Figura 17** – Formas vegetativas (1) do género Chlamydomonas e hifa (2) de fungo. 29
- Figura 18** – A - Formas vegetativa da microalga do género Chlamydomonas. B - Microscopia de epifluorescência, Cloroplastos (vermelho) e gotas lipídicas (amarelo) nas formas vegetativas da microalga do género Chlamydomonas. 29
- Figura 19** – Eucariota do tipo Euglena. 29

Lista de Figuras

- Figura 20** – Exemplo de um gel de eletroforese resultante da amplificação dos triplicados da amostra 3 (9 de fevereiro de 2011). A - fragmento de 700 bp correspondente ao marcador molecular 18S rDNA e de 410 bp correspondente ao marcador molecular 23S rDNA; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo; M: Marcador de DNA. B – Marcador O'GeneRuler™100 bp Plus. 30
- Figura 21** – Padrões de SSCP referentes ao marcador molecular 18S rDNA, os números assinalados correspondem aos padrões enviados para sequenciação. 31
- Figura 22** – Padrões de SSCP referentes ao marcador molecular 23S rDNA, os números assinalados correspondem aos padrões enviados para sequenciação. 31
- Figura 23** – Dendrograma, obtido com o marcador molecular 18S rDNA nuclear, da diversidade presente nas águas ácidas da AMA de S. Domingos. 33
- Figura 24** – Dendrograma, obtido com o marcador molecular 23S rDNA plastidial, da diversidade presente nas águas ácidas da AMA de S. Domingos. A - Organismos fototróficos; B – Bactérias. 34/35
- Figura 25** – A. Esquema do riscado usado no isolamento e purificação de organismos eucariotas fototróficos aquáticos acidófilos. B. Esquema do riscado simples usado para manter as culturas em placa (subcultura). 42
- Figura 26** – Esquema do procedimento utilizado para obter culturas unialgais. 43
- Figura 27** – Esquema da reação de ligação do fragmento de interesse ao vetor pJET1.2/blunt. 45
- Figura 28** – Placas com meio MK sólido. Riscados de culturas unialgais. 48
- Figura 29** – Cultura unialgal, volume 15 ml. A. Cultura em meio MK a pH 2.5 – inóculo; B. Cultura em meio MK a pH 2.5 após 2 meses. 48

Lista de Figuras

- Figura 30** – Isolado unialgal do género *Coccomyxa* em microscopia de campo claro (A) e microscopia de epifluorescência com as estruturas cloroplastidiais (B). 49
- Figura 31** – Isolados unialgais do género *Chlamydomonas*. 1. Flagelos; 2. Estigma; 3. Cloroplasto; 4. Pirenoide. 49
- Figura 32** – Eletroforese em agarose com os fragmentos amplificados para cada um dos marcadores moleculares. A: eletroforese correspondente ao marcador molecular 18S rDNA com a amplificação de fragmentos com ± 700 bp. B: eletroforese correspondente ao marcador molecular 23S rDNA com a amplificação de fragmentos com ± 410 bp. Legenda: M – marcador de DNA (O'GeneRuler™100 bp Plus); 1-4 – isolados de *Coccomyxa*; 5-6 – isolados de *Chlamydomonas*. 50
- Figura 33** – Padrões de SSCP obtidos das culturas unialgais. Números selecionados são os padrões que foram enviados para sequenciação. A: padrões dos fragmentos do marcador molecular 18S rDNA. B: padrões dos fragmentos do marcador molecular 23S rDNA. 51
- Figura 34** – Dendrograma (marcador filogenético 18S rDNA) de isolados do género *Chlamydomonas*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining. 52
- Figura 35** – Dendrograma (marcador filogenético 18S rDNA) de isolados do género *Coccomyxa*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining. 53
- Figura 36** – Dendrograma (marcador molecular 23S) da cultura unialgal do género *Chlamydomonas*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining. Os clones assinalados com ● são identificados como microalgas do género *Chlamydomonas* e os clones assinalados com ● são bactérias do género *Acidophilum*. 54

Lista de Figuras

- Figura 37** – Dendrograma (marcador molecular 23S) da cultura unialgal do género *Coccomyxa*. Os clones assinalados com ■ são identificados como microalgas do género *Coccomyxa* e o clone assinalado com ■ pertence ao género *Variovorax*. 54
- Figura 38** – Curva teórica de crescimento de uma cultura em sistema fechado. Legenda: 1-fase lag; 2-fase de aceleração; 3-fase exponencial; 4-fase de abrandamento; 5-fase estacionária e 6-morte celular. 57
- Figura 39** – Quadrícula da Câmara de Bürker com nove quadrados A, e cada um destes está dividido em 16 quadrados B. A contagem das células foi feita de acordo com o seguimento dos números de 1 a 6. 62
- Figura 40** – Desenho experimental para avaliar o stress oxidativo provocado pelo sulfato de cobre através da determinação de MDA. 64
- Figura 41** – Volumes de cada solução e de extrato para cada amostra a determinar o teor de MDA. 65
- Figura 42** – Triplicados das culturas unialgais ao fim de 3 semanas de crescimento. A. Cultura de microalgas do género *Chlamydomonas* sp.; B. Cultura de microalgas do género *Coccomyxa* sp., HL replicados sujeitos a intensidade luminosa mais elevada, LL replicados expostos à intensidade luminosa mais baixa. 67
- Figura 43** – Curvas de crescimento de isolados unialgais. A. ▲ Cultura *Coccomyxa* sp., intensidade luminosa alta; △ Cultura *Coccomyxa* sp., intensidade luminosa baixa; B. ● Cultura *Chlamydomonas* sp., intensidade luminosa alta; ○ Cultura *Chlamydomonas* sp., intensidade luminosa baixa. 68

Lista de Figuras

- Figura 44** – Curvas de crescimento da microalga *Coccomyxa* sp. a diferentes condições de luz, pH e fonte azoto. ■ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; □ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta; ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta. A seta indica o dia em que as culturas foram separadas, ou seja, metade dos replicados ficaram a luz de intensidade baixa e a outra metade foi colocada a intensidade luminosa alta. 69
- Figura 45** – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MK a pH 2,5. A. microscopia de campo claro, B. microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo. 71
- Figura 46** – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MKU a pH 7.0. A. microscopia de campo claro. B. microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo. 71
- Figura 47** – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MK a pH 6.5. A. microscopia de campo claro. B. microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho. C. microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo. 72
- Figura 48** – Volume celular (A) e a razão entre o eixo maior e o eixo menor (B) das células de *Coccomyxa* sp. dos três meios de cultura para a intensidade luminosa baixa 72
- Figura 49** – Pigmentos fotossintéticos, extraídos com DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MK a pH 2.5. A. Intensidade luminosa baixa. B. Intensidade luminosa alta. 75
- Figura 50** – Pigmentos fotossintéticos, extraídos em DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MKU a pH 7.0. A. Intensidade luminosa baixa. B. Intensidade luminosa alta. 76

Lista de Figuras

Figura 51 – Pigmentos fotossintéticos, extraídos em DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MK a pH 6.5. A. Intensidade luminosa baixa. B. Intensidade luminosa alta. 77

Figura 52 – Razão entre a clorofila a e a clorofila b para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta. 78

Figura 53 – Clorofila total por célula para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta. 79

Figura 54 – Carotenoides por célula para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta. 79

Figura 55 – Variação do pH ao longo da curva de crescimento para cada meio de cultura. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta. *** P<0.001 80

Lista de Figuras

- Figura 56** – Replicados para a determinação do MDA após as 72h. A. Meio MK a pH 2,5; B. Meio MK a pH 6,5. 1. Controlo, 2. C (Cu 2+) =0.4 mM, 3. C (Cu 2+) =0.8 mM. 81
- Figura 57** – Número de células no tempo zero e 72h depois de adicionar as concentrações de cobre em ambos os meios de cultura. A. Meio MK a pH 2.5; B. Meio MK a pH 6.5. 81
- Figura 58** – Pigmentos extraídos para cada tratamento na indução de stress oxidativo com duas concentrações de cobre. A. Culturas em meio MK a pH 2.5. B. Culturas em meio MK a pH 6.5. 82
- Figura 59** – Valores de MDA, resultantes do teste de duas concentrações de Cobre, após 72h. 83
- Figura 60** – Valores de MDA, em nmol por 10⁶ células, resultantes do teste de duas concentrações de Cobre, após 72h, em meio MK. *** P <0.001 83

Lista de Tabelas

	Página
Tabela I – Número de amostras recolhidas por data e localização na área mineira abandonada de S. Domingos.	14
Tabela II – Primer escolhidos para amplificar duas regiões conservadas do genoma de eucariotas fototróficos.	18
Tabela III – Mistura dos componentes usados para a amplificação por PCR.	19
Tabela IV – Componentes usados na reação de ligação do fragmento de interesse ao vetor pGem – Teasy (Promega, Madison, WI) e os respetivos volumes usados.	20
Tabela V – Componentes para amplificar colónias por PCR.	21
Tabela VI – Reagentes e volumes necessários para a formação de dois géis de acrilamida 8% em TBE 1x.	22
Tabela VII – Soluções para a revelação dos géis de SSCP.	23
Tabela VIII – Número de frascos inoculados por cada meio de cultura a testar.	61
Tabela IX – Taxa de crescimento média, taxa máxima de crescimento e tempo de duplicação para a microalga <i>Coccomyxa</i> sp. nos diferentes tratamentos.	70
Tabela X – Teste de comparação múltiplo de Tukey para o volume celular, nos diferentes tratamentos para a intensidade luminosa baixa.	73
Tabela XI – Teste de comparação múltiplo de Tukey para a relação eixo maior vs eixo menor, nos diferentes tratamentos para a intensidade luminosa baixa.	73

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Abreviaturas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas.....	xiii
Índice.....	xiv
I. Enquadramento e objetivos	
1. Ambientes Extremos	1
1.1. Drenagem Ácida de Mina	1
1.2. Área Mineira Abandonada de S. Domingos	2
2. Organismos Extremófilos	5
2.1. Microalgas	6
2.1.1. Adaptação a meios ácidos	6
2.1.2. Identificação taxonómica	8
3. Objetivos	9
II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos	
1. Introdução	10
2. Objetivos	13
3. Metodologia	
3.1. Amostragem	14
3.2. Processamento das amostras	16
3.3. Microscopia e identificação	17
3.4. Extração de DNA	18
3.5. Amplificação de regiões alvo para identificação molecular	18
3.6. Clonagem	20
3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)	21
3.8. Amplificação e isolamento do plasmídeo	24
3.9. Análise de dados	24
4. Resultados	
4.1. Identificação morfológica	25

4.2. Identificação molecular	
4.2.1. Amplificação por PCR.....	30
4.2.2. Análise de SSCP	30
4.2.3. Análise Filogenética	32
5. Discussão	36
III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos	
1. Introdução	38
2. Objetivos	40
3. Metodologia	
3.1. Meios de cultura	
3.1.1. Meio líquido	41
3.1.2. Meio sólido com agar	41
3.2. Cultivo e isolamento	42
3.3. Observação ao microscópio	44
3.4. Extração de DNA	44
3.5. Amplificação de regiões alvo para identificação molecular	44
3.6. Clonagem	45
3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)	46
3.8. Amplificação e isolamento do plasmídeo	46
3.9. Análise de dados	46
4. Resultados	
4.1. Cultivo e isolamento	48
4.2. Identificação morfológicas das culturas unialgais	49
4.3. Identificação molecular das culturas unialgais	
4.3.1. Amplificação por PCR.....	50
4.3.2. Análise de SSCP	50
4.4. Análise Filogenética.....	51
5. Discussão	55
IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de <i>Coccomyxa</i> sp.	
1. Introdução	57
2. Objetivos	59

3.	Metodologia	
3.1.	Curva de crescimento	
3.1.1.	Teste dos isolados obtidos.....	60
3.1.2.	Isolado de <i>Coccomyxa</i> sp.	
3.1.2.1.	Inóculo	60
3.1.2.2.	Contagem celular, pigmentos, pH e observação ao microscópio	62
3.2.	Indução de stress oxidativo	
3.2.1.	Inóculo.....	63
3.2.2.	Determinação de MDA	65
3.2.3.	Cálculos	66
4.	Resultados	
4.1.	Curva de crescimento	
4.1.1.	Isolados obtidos	67
4.2.	Estudo fisiológico de um isolado de <i>Coccomyxa</i>	
4.2.1.	Monitorização do crescimento	
4.2.1.1.	Densidade celular.....	69
4.2.1.2.	Pigmentos fotossintéticos	74
4.2.1.3.	Variação do pH	79
4.2.2.	Stress oxidativo	
4.2.2.1.	Densidade celular e pigmentos	79
4.2.2.2.	Quantificação de MDA.....	81
5.	Discussão	84
V.	Conclusão	89
VI.	Bibliografia.....	92
Anexos		
I.	Meio K9 Modificado	I
II.	Alinhamento dos clones obtidos das culturas unialgais para o marcador 18S rDNA	III
III.	Ramo do dendrograma com os clones de <i>Chlamydomonas</i> e os clones não cultivados de Rio Tinto.	VII
IV.	Alinhamento obtido para os isolados de microalga do género <i>Coccomyxa</i> e para a bactéria acompanhante, com o marcador 23S rDNA.	VIII

Índice

V. Alinhamento obtido para os isolados de microalga do género *Chlamydomonas* e para a bactéria acompanhante, com o marcador 23S rDNA. XI

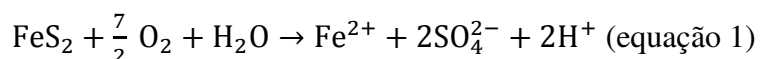
I. Enquadramento e objetivos

1. Ambientes Extremos

Na Terra existem diversos ambientes extremos, resultantes quer de atividades geológicas, quer de atividades antrópicas (Gross, 2000). Fontes hidrotermais, glaciares, salinas e lagos de águas ácidas são alguns exemplos de ambientes naturais onde se verifica a presença de organismos expostos a condições extremas (Oarga, 2009).

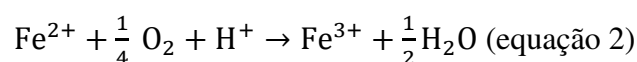
1.1. Drenagem Ácida de Mina

As águas ácidas podem ter origem natural, como nos lagos de Yellowstone National Park, mas em muitos casos, a presença de água ácida em cursos de água, lagos e lagoas deve-se à ação do Homem (Johnson, 1995). O ácido sulfúrico comumente encontrado no meio ambiente estabelece um tampão fraco a pH 2. Este provém ou de ácido sulfídrico (H₂S) maioritariamente de origem biológica, ou de sulfuretos metálicos, como por exemplo, a pirite (FeS₂), sendo produzido por oxidação química ou por atividade sulfo-oxidante de bactérias (Gross, 2000). De facto, a drenagem ácida proveniente de rocha (ARD) é um processo contínuo. Os sulfuretos metálicos são estáveis em condições de anóxia e de desidratação (Johnson, 2003), mas quando expostos ao ar (oxigénio) e à água, os iões presentes nos sulfuretos metálicos constitutivos de rochas como a pirite são oxidados, com solubilização de grandes quantidades de sulfato. A drenagem ácida de mina (Acid Mine Drainage – AMD) é um caso particular da ARD, em que as escombrelas e as escórias de pirite libertam para a água ião ferroso, sulfato e protões (equação 1) com consequente diminuição do pH para valores frequentemente inferiores a 3. O processo de acidificação origina a dissolução e ionização de metais promovendo o aumento de elementos dissolvidos (Brake e Hasiotis, 2010; Johnson, 2003).

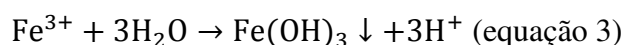


I. Enquadramento e objetivos

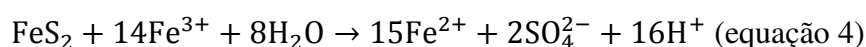
Na presença de oxigénio ocorre a oxidação do ião ferroso (Fe^{2+}), que é potenciada pela ação de bactérias quimiolitotróficas oxidadoras do ferro (equação 2).



Quando o pH varia entre 2,3 e 3,5 a maioria do ião férrico (Fe^{3+}) precipita sob a forma de hidróxido de ferro (III) (equação 3) com uma cor amarela-alaranjada ou mesmo avermelhada, característica de muitos cursos de AMD (Das *et al.*, 2009).



A pequena percentagem de ião férrico que não precipita permite a oxidação da pirite que está exposta, formando-se novamente ião ferroso, sulfato e protões, como indicado na equação 4 (Akcil e Koldas, 2006).



A regeneração do ião ferroso, por reação do ião férrico com a pirite é o ponto-chave da reação de oxidação dos sulfuretos metálicos (Johnson e Hallberg, 2005), que faz da AMD um processo autossustentado.

1.2. Área Mineira Abandonada de São Domingos

A Faixa Piritosa Ibérica (Iberian Pyrite Belt – IPB) (figura 1) é uma das maiores reservas de maciços de sulfuretos, com mais de 1700 Megatoneladas (Mt). Esta reserva, através da exploração mineira, permitiu durante milhares de anos a subsistência de populações que se fixaram nesta zona.

I. Enquadramento e objetivos

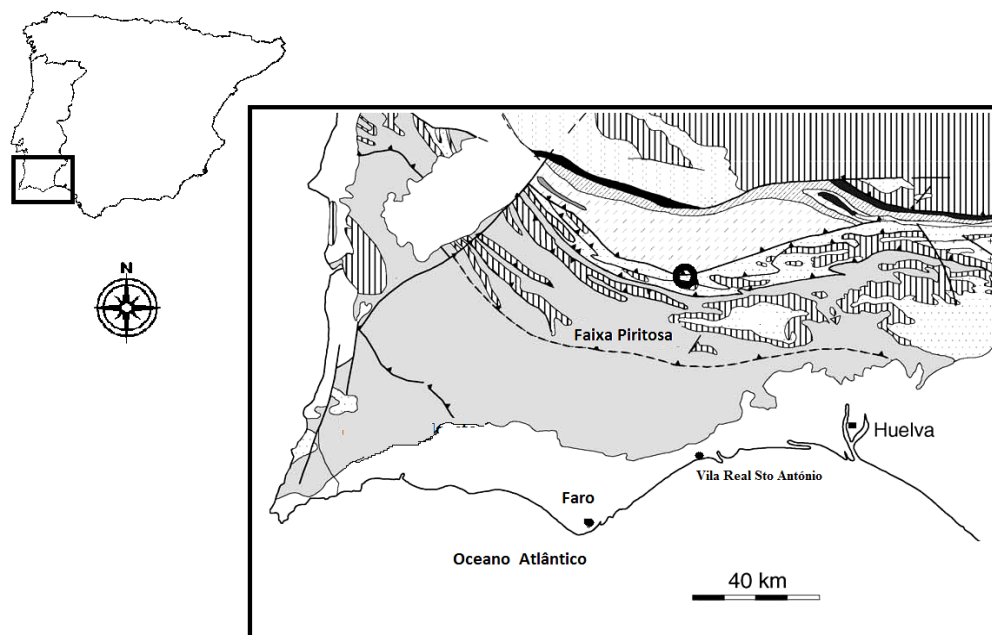


Figura 1 – Faixa Piritosa Ibérica e a localização da Área Mineira Abandonada de S. Domingos ●. Adaptado de Torno, (2006).

O registo de atividade mineira aponta os fenícios e cartagineses como os primeiros povos a principiarem a perscrutação. Os Romanos também contribuíram para a exploração, mas a atividade mineira mais intensa ocorreu durante a segunda metade do século XIX e nas primeiras décadas do século XX. A maioria das minas foi encerrada na segunda metade do século XX. Apesar de abandonadas, estas continuam a ser uma fonte de poluição causada pela oxidação de sulfuretos promovida pelo contacto das escombrelas e escórias (figura 2) com água da chuva. Estes processos biogeoquímicos naturais geram um sistema de águas ácidas de mina (Pérez-López *et al.* 2008, Pérez-López *et al.* 2010, Novis e Harding 2007, Oliveira e Oliveira 2002).

I. Enquadramento e objetivos

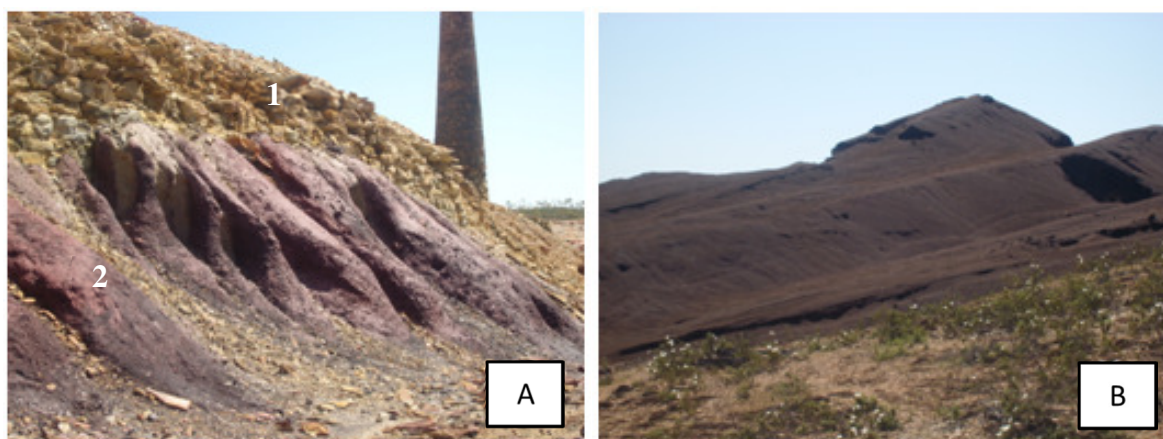


Figura 2 - Escombreira (A1), cinzas (A2) e escórias (B), Achada do Gamo, Área Mineira Abandonada de S. Domingos (31 de março de 2011, Fotografias Telma Valente)

A Área Mineira Abandonada (AMA) de São Domingos situada em plena IPB (figura 1) é um dos exemplos de ocorrência de AMD, com afetação de uma área de 16km², na qual se encontram depositadas escórias e escombreiras resultantes da exploração mineira. Além destas geram AMD os sedimentos enriquecidos em diversos metais, acumulados ao longo de muitos anos de utilização de um método para minimização da contaminação para jusante, que consistia na evaporação das águas ácidas enriquecidas em ferro por dispersão ao longo das “terras queimadas” (figura 3). A permanência de zonas expostas à água da chuva, após a sua desativação, contribuiu para o agravamento de um processo que começou com a atividade mineira. O minério extraído, desta mina, consistia essencialmente em cobre, chumbo e zinco, no entanto há indícios da extração de outros metais na época romana como, por exemplo, ouro e prata. O enxofre também teve muita importância na indústria química, para o fabrico de ácido sulfúrico, mas a sua recolha foi gradualmente descontinuada (Custódio, 2002, Oliveira e Oliveira, 2002).



Figura 3 – Exemplo das terras queimadas. (31 de março de 2011, Telheiro – Área Mineira Abandonada de S. Domingos, Fotografia Telma Valente).

2. Organismos extremófilos

Os ambientes ácidos são classificados como oligotróficos pois a quantidade de carbono orgânico dissolvido é muito baixa. Neste contexto são favorecidos os organismos fixadores de dióxido de carbono, com resistência ou tolerância à toxicidade por metais, que podem ser quimioautotróficos capazes de obter energia a partir dos elementos disponíveis como o ferro e enxofre ou fotoautotróficos que utilizam a luz solar para produção de energia (Johnson 1998). Os organismos que colonizam os ambientes ácidos são denominados acidófilos, mas esta designação abrange, muitas vezes, um leque de organismos que toleram o meio ácido (acidotolerantes), mas que não são verdadeiramente acidófilos (Brake e Hasiotis, 2010). Para autores como Gross (2000) e Johnson (1998), a definição de organismos acidófilos diz respeito apenas a organismos que tenham como pH ótimo de crescimento valores inferiores ou iguais a três; todos os outros que subsistem em meio ácido são apenas acidotolerantes, visto que o seu pH ótimo de crescimento é na maior parte dos casos próximo de valores neutros.

Nas duas últimas décadas, o interesse pelos organismos que habitam os ambientes extremos aumentou, por múltiplas razões, que incluem a preciosa informação que podem oferecer sobre o processamento celular de proteínas, as propriedades das membranas e os mecanismos de reparação celular em condições de stress (Rothschild, 2001). Além disso, têm sido estudados, em Astrobiologia, como modelos de vida fora do planeta Terra (Aguilera *et al.*, 2007). Estes organismos e os seus componentes celulares têm igualmente recebido atenção por permitirem a operação de processos num leque mais alargado de condições do que os isolados a partir de ambientes neutros (Johnson, 1998).

Os organismos procariotas quimiolitotróficos habitantes de águas ácidas têm vindo a ser estudados, devido ao seu papel na diminuição do pH durante a exposição da pirite extraída das minas e à sua utilização em biomineração (Barton e Northup, 2011). Em contrapartida, a preponderância de organismos eucariotas nos contextos físico-químicos das águas ácidas, não apresenta estudos tão aprofundados (Brake e Hasiotis, 2010; Bond, Druschel e Banfield, 2000).

2.1. Microalgas

Nas águas ácidas surgem muitas vezes extensos biofilmes dominados por eucariotas fototróficos. As microalgas eucariotas dominam as comunidades aquáticas dos leitos dos cursos de águas ácidas com um fluxo estável e são representantes de um grande número de *taxa* (Johnson, 1998, Aguilera *et al.*, 2007). Na verdade, o termo microalga engloba uma variedade de organismos que não têm uma origem comum e que têm diferentes origens filogenéticas, sendo um grupo polifilético. Deste modo, encontram-se microalgas em quatro das cinco linhagens, nomeadamente, *Plantae*, *Chromalveolata*, *Rhizaria* e *Excavata*. Verifica-se que Protozoa do género *Euglena* e Carófito do género *Klebsormidium* ocorrem com mais frequência que outros géneros nos leitos dos cursos de águas ácidas (Novis e Harding, 2007).

2.1.1. Adaptação a meios ácidos

A colonização das zonas de AMD por microalgas beneficia de algumas vantagens

I. Enquadramento e objetivos

como, por exemplo, a ausência total de predadores como peixes e a reduzida abundância de invertebrados bentónicos. Esta limitação da sua predação favorece o aumento da sua biomassa. Porém, estas algas estão sujeitas a desvantagens que condicionam o seu desenvolvimento, como é o caso do pH ser inferior a 3, a elevada concentração de metais existente na água e a diminuição do caudal dos cursos de água durante o tempo seco com sobre-elevação do teor da água em metais (Novis e Harding, 2007, Aguilera *et al.*, 2007).

Os metais como o ferro, o alumínio, o cobre, o chumbo, o zinco, o cádmio e o selénio em quantidades adequadas são benéficos para os eucariotas, pois são importantes para o bom funcionamento de proteínas e enzimas. Mas em AMD a concentração destes metais é elevada, sendo muitas vezes tóxica e provoca, nestes organismos, alterações nos processos metabólicos. Estas alterações podem comprometer a integridade da membrana celular e dos organelos, ou promover a desnaturação das proteínas, bloqueando o grupo funcional, permutando um metal essencial ou alterando a conformação do centro ativo (Das *et al.*, 2009; Brake, Dannelly e Connors, 2001).

Nestas condições, as células desenvolveram mecanismos de protecção ao nível da membrana, nomeadamente modificações na membrana plasmática de modo a diminuir a permeabilidade a protões e o aumento do número de bombas de protões, assim como de outros canais iónicos que estejam em contacto com o meio exterior, permitindo assim o seu efluxo. Estes mecanismos permitem aos microrganismos manterem o pH intracelular próximo de valores neutros. A superfície extracelular é carregada positivamente devido ao pH baixo e permite uma redução do influxo de protões para o citosol (Brake e Hasiotis, 2010; Gross, 2000).

Alguns eucariotas fototróficos aquáticos desenvolveram mecanismos para conseguirem colonizar os meios ácidos evitando e/ou minimizando a toxicidade dos metais. Mecanismos que permitem complexar metais no exterior da célula, como ligação extracelular e precipitação, reduzem a quantidade de metais que entram na célula. Além disto, há um efluxo aumentado de metais e destoxificação ou compartimentação destes na célula (Brake e Hasiotis, 2010).

A formação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), normalmente denominadas por mucilagem, permite às células enfrentar o meio inóspito que as rodeia. As EPS não têm uma composição definida em todos os organismos, mas a sua finalidade é similar para todos, principalmente no conjunto das populações associadas em biofilmes

(Brake e Hasiotis, 2010).

As substâncias poliméricas extracelulares podem ser secretadas de várias formas, por exemplo, bainhas, tubos e filamentos. Para além de auxiliarem na aderência, também promovem a protecção das células minimizando as mudanças físico-químicas bruscas. Têm, ainda, a capacidade de agir como uma barreira de difusão que protege contra toxinas. Em biofilmes, onde se verificam populações mistas, as EPS permitem-lhes subsistir concomitantemente em diferentes áreas químicas (Brake e Hasiotis, 2010).

2.1.2. Identificação taxonómica

Como se disse, as microalgas são um grupo polifilético, cuja identificação morfológica requer conhecimentos de especialistas na sistemática de vários filos. Além disso, a identificação taxonómica, destes organismos, é muitas vezes dificultada pela falta de informação relativa às diferenças entre tipos morfológicos. Estes podem resultar apenas de diferenças nas substâncias que os envolvem ou em estruturas que estão reduzidas ou aumentadas ou mesmo da falta de cruzamento de dados por parte dos investigadores. Geram-se deficiências na identificação de géneros e espécies, o que leva a que alguns organismos acabem por mudar de nome passado algum tempo e outros tenham dois nomes (Brake e Hasiotis, 2010). Estas dificuldades podem ser superadas pela utilização de métodos moleculares que permitem a identificação com base em classificações filogenéticas, através da homologia de zonas conservadas de genes. Zonas do DNA que codifiquem para proteínas são as mais utilizadas, pois estas são mantidas ao longo da evolução, mas apresentam pequenas diferenças que permitem distinguir entre géneros ou famílias. As regiões que codificam para as subunidades ribossomais são as mais utilizadas, uma vez que estas proteínas têm um papel importante na célula. Qualquer alteração significativa na sequência de DNA gera proteínas não funcionais, travando a difusão da alteração ocorrida. Nos eucariotas, o gene que codifica para a subunidade ribossomal 18S é o mais comumente utilizado, enquanto nos procariotas e nas linhagens cloroplastidiais utiliza-se frequentemente o gene que codifica para a subunidade ribossomal 16S, no entanto o gene que codifica para a subunidade ribossomal 23S também tem adquirido credibilidade (Sherwood e Presting, 2007).

3. Objetivos

A AMD proporciona condições para o desenvolvimento de organismos fototróficos acido-tolerantes e acidófilos, com adaptações ecofisiológicas específicas que estão em grande parte por identificar e estudar. A prospeção da diversidade destes organismos, com a sua inventariação taxonómica e avaliação de potenciais utilizações de metabolitos produzidos como resposta ao stresse ambiental deveria constituir uma das prioridades no estudo da AMD. O presente trabalho pretende contribuir para o estudo das potencialidades oferecidas pela AMD da área mineira abandonada de S. Domingos.

Para tal o trabalho foi dividido em três partes que se complementam, executadas por uma ordem cronológica. Na primeira parte pretendeu-se identificar, morfológica e molecularmente, a diversidade de eucariotas fototróficos presentes na água ácida da AMA de S. Domingos. Na segunda parte do trabalho pretendeu-se isolar organismos recolhidos de modo a obter culturas unialgais. Na terceira parte pretendeu-se estudar as características fisiológicas de um isolado unialgal, verificando as potencialidades biotecnológicas deste.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

1. Introdução

A taxonomia das algas baseou-se durante muito tempo em critérios morfológicos e quimiotaxonómicos, como o tipo e diversidade de pigmentos. No início do século XX diversos investigadores observaram, em microscopia ótica, e descreveram formas vegetativas, de resistência e estruturas reprodutivas de géneros e espécies de organismos fototróficos aquáticos, elucidando os seus ciclos de vida e construindo chaves baseadas na morfologia celular (Lewis 2007). Assim, a observação ao microscópio de estruturas e formas celulares pode permitir a identificação de microalgas pelo menos até ao nível do género. O reconhecimento de estruturas com valor taxonómico requer, no entanto, experiência que se baseia em informação nem sempre devidamente registada.

Situações de evolução convergente, estase morfológica e plasticidade fenotípica podem, no entanto, interferir na identificação taxonómica (Lewis 2007). Atualmente é possível colmatar este tipo de falhas através da utilização de técnicas de biologia molecular. Estas para além de grande utilidade para complementar a investigação realizada através de técnicas de microscopia quer ótica, quer eletrónica (Klaveness e LØvhØiden 2007), permitem identificar espécies não cultivadas, revelando a presença de mais espécies do que as que se conheciam inicialmente. Além disso, permitem esclarecer a taxonomia atribuída quer às espécies com dimorfismo, quer a espécies com morfologia idêntica ou convergente (Lewis 2007).

Novis e Harding (2007) referem que *Klebsormidium rivulare* elucidada bem a dificuldade de nomear as espécies que crescem em AMD. Em 1845, Kützing recolheu microalgas que identificou como *Hormidium rivulare*. Um século depois desta identificação, dois investigadores mostraram, através de microscopia eletrónica, que as espécies recolhidas eram do género *Klebsormidium*. Em meados da década de 90 do século passado, Lokhorst identificou as mesmas espécies como *Ulothrix implexa*, e não concordou com a mudança de nome das espécies de *Hormidium rivulare* para *Klebsormidium rivulare*. As descrições

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

fornecidas por Kützing (1845) não permitiam distinguir os géneros referidos e não era possível fazer uma análise ultra-estrutural (Novis e Harding 2007).

Algumas espécies são identificadas com o recurso a informação molecular, usando genes com valor filogenético, ou seja, genes que tenham uma evolução lenta para distinguir relações filogenéticas distantes, ou genes com evolução suficientemente rápida para permitir distinguir espécies próximas. Utilizando ainda o exemplo das microalgas do género *Klebsormidium*, a identificação da espécie *Klebsormidium acidophilum* foi elucidada recorrendo às variações contidas no gene que codifica para a subunidade grande da enzima RuBisCO (*rbcL*), onde se verifica a resolução desta espécie em relação às outras já conhecidas (Novis e Harding 2007).

A sistemática das algas evoluiu, assim, decisivamente nas últimas três décadas com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), as técnicas de deteção de assinaturas moleculares (“fingerprinting”) e as técnicas de sequenciação de DNA (Lopez-Bautista *et al.*, 2007).

A amplificação por PCR requer a escolha de genes que tenham valor filogenético, e posteriormente a obtenção de primers que franqueiem zonas previamente definidas nesses genes. Nos eucariotas fototróficos os genes que mais se utiliza para a filogenia são os genes que codificam para a subunidade ribossomal 18S rRNA (alguns autores utilizam a denominação 18S rDNA, referindo-se ao gene), para a subunidade 16S rRNA, para a subunidade 23S rRNA e para a subunidade maior da RuBisCO (*rbcL*).

Os cloroplastos apresentam ribossomas constituídos por uma subunidade grande (50S) e uma subunidade pequena (30S). A subunidade 50S contém os genes que codificam para o 23S rRNA e 5S rRNA, e a subunidade 30S contém o gene que codifica para o 16S rRNA. As árvores filogenéticas baseadas nos genes 16S e 23S rRNA apresentam uma boa concordância entre si, no entanto o gene 5S rRNA não apresenta um número de sequências suficiente para gerar uma concordância significativa (Pei *et al.*, 2009). O gene 23S rRNA não tem sido utilizado para a análise filogenética em favorcimento do gene 16S rRNA (Sherwood e Presting 2007). Estudos recentes mostram que o gene que codifica para a subunidade 23SrRNA tem regiões conservadas permitindo a conceção de primers universais, que franqueiam estas regiões, com um grau de similaridade aos primers universais que franqueiam o gene que codifica para a subunidade 16S rRNA (Pei *et al.* 2009, Sherwood *et al.*, 2008). O

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

Domínio V do gene 23S rRNA é uma da zona conservada que se pode utilizar pois este é o principal sítio de ligação do tRNA à subunidade ribossomal 50S (Harris *et al.*, 1994).

As pequenas alterações nas zonas conservadas permitem obter padrões (assinaturas moleculares) que podem ser analisados pela técnica que deteta polimorfismos de cadeias simples (SSCP – “Single-Strand Conformation Polymorphism”). A técnica é simples e é usada após a amplificação por PCR das zonas alvo no DNA. Os fragmentos obtidos, designados por amplicões, são então desnaturados antes da sua aplicação num gel de eletroforese em acrilamida. A conformação das cadeias simples do DNA desnaturado difere sempre que existam diferenças de pelo menos um nucleótidos nas sequências. Os padrões de migração dos fragmentos no gel, durante a eletroforese, são condicionados pelo seu tamanho e pela sua conformação. Técnicas como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE – “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”) e eletroforese desnaturante por gradiente de temperatura (TGGE – “Temperature Gradient Gel Electrophoresis”) são muito semelhantes à de SSCP, pois fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, mas sequências diferentes, podem ser separados através da diferente mobilidade baseada no ponto de fusão da cadeia. Esta separação é feita por eletroforese, sendo no contexto de DGGE usado um gel de poliacrilamida de gradiente desnaturante, produzido com uma mistura de ureia e formamida. Em TGGE o gradiente desnaturante é de temperatura. (Beier 1993, Muyzer e Small 1998, Muyzer 1999).

A obtenção de assinaturas moleculares permite determinar a variabilidade de organismos na amostra. Mesmo que não seja possível cultivar os organismos todos de uma amostra ambiental pode-se, através do isolamento destas assinaturas moleculares, tentar obter a identificação dos organismos. A sequenciação é uma ferramenta muito útil que permite obter uma sequência do fragmento de DNA que foi amplificado e gerou a assinatura molecular. As sequências obtidas podem ser depositadas em bases de dados, com o GenBank, que permitem uma maior divulgação da informação obtida, permitindo que outros investigadores possam comparar dados.

2. Objetivos

Nesta primeira parte do trabalho pretendeu-se investigar a diversidade de organismos fototróficos aquáticos acidófilos associados à AMD detetada na Ribeira de S. Domingos.

Para tal, delinearam-se objetivos específicos como i) recolher amostras diversificadas ao longo da AMD da Ribeira de S. Domingos até ao Telheiro (figura 4); ii) observar organismos fototróficos aquáticos acidófilos ou ácido-tolerantes recolhidos; iii) identificar, morfológicamente, alguns géneros presentes nas águas ácidas e iv) verificar a diversidade de organismos presentes por métodos moleculares, utilizando como marcadores moleculares o 18S rDNA e o domínio V do 23S rDNA.

3. Metodologia

3.1. Amostragem

A amostragem teve sobretudo objetivos qualitativos de detecção da diversidade de organismos recolhidos, sem qualquer preocupação quantitativa ou recurso a volumes e áreas fixas nas 3 estações de recolha.

As amostras foram recolhidas em três ocasiões, a saber, em 16 de Junho de 2008 e a 9 de Fevereiro e 31 de Março de 2011 de acordo com a tabela I. Cada local de amostragem está assinalado no mapa da figura 4. Foram recolhidas amostras bentónicas e planctónicas (figura 5).

Tabela I – Número de amostras recolhidas por data e localização na área mineira abandonada de S. Domingos

Locais da amostragem/Data	16 de junho de 2008	9 de fevereiro de 2011	31 de março de 2011
Lagoa de drenagem do caminho-de-ferro (1)		Três amostras planctónicas e uma amostra bentónica	Três amostras bentónicas e três amostras planctónicas
Achada do Gamo (2)			Três amostras bentónicas e oito amostras planctónicas
Telheiro (3)	Uma amostra bentónica		

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

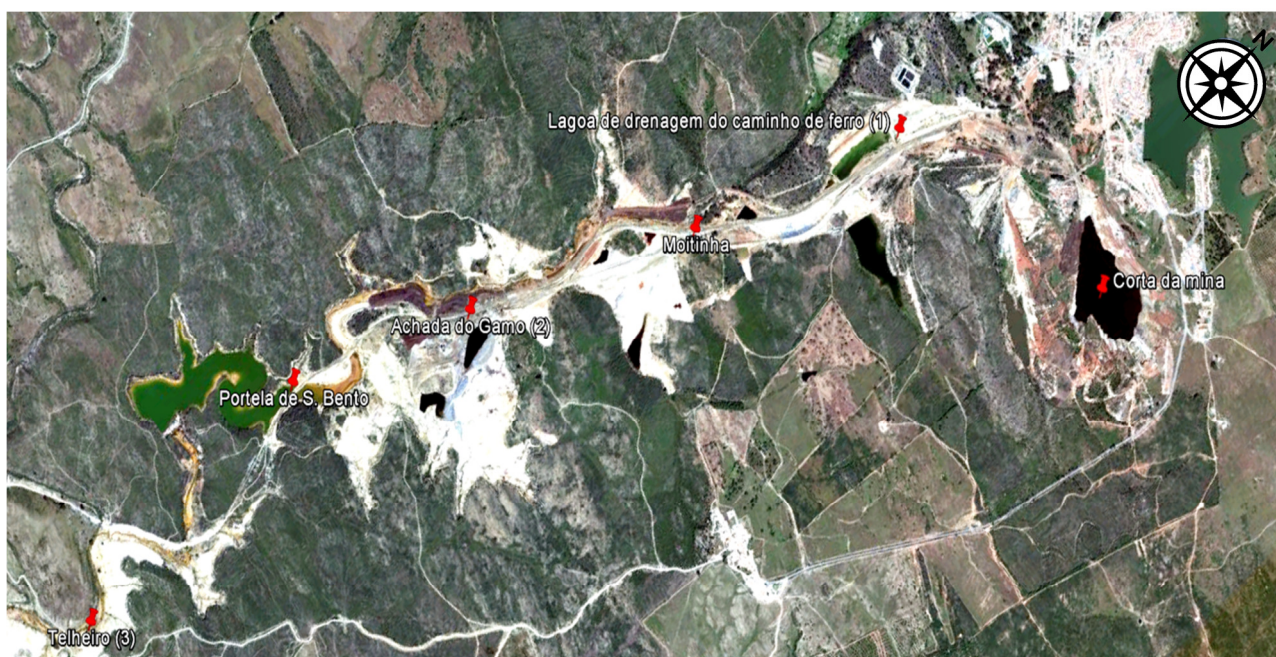


Figura 4 – Locais de amostragem assinalados (1, 2 e 3) no mapa da área mineira abandonada de S. Domingos. Fonte: Google Earth (8.05.2011).



Figura 5 – Aspeto dos locais de recolha de biofilme em diferentes pontos na Achada do Gamo (AMA de S. Domingos, 31 de março de 2011). **A** - zona onde foi recolhido *bentos*; **B** - zona onde foi recolhido *plâncton*; **C** - zona onde foi recolhido *plâncton*. (Fotografias Telma Valente)

As amostras planctónicas foram recolhidas com o recurso a um copo adaptado a um cabo extensível (figura 6) e colocadas em tubos estéreis de 50 ml identificados, que foram acondicionados no frio. As amostras bentónicas foram recolhidas raspando diretamente, os tubos estéreis de recolha, no fundo. Depois de fechados e identificados foram também acondicionados no frio. A água para concentração de amostras foi recolhida em garrações de 5l em Politereftalato de etileno (PET).



Figura 6 – Recolha de amostras planctónicas usando um copo adaptado a um cabo extensível, Achada do Gamo (AMA de S. Domingos, 31 de março de 2011). (Fotografias Telma Valente)

3.2. Processamento das amostras

A amostra de 16 de junho de 2008 foi filtrada por filtros de acetato de celulose EZ-Pak 0.45 μm de poro e 47 mm de diâmetro (Ref. EZHAWG474, MF-Millipore, Merck, França) e colocada em frascos de vidro exposta à luz do dia.

As amostras recolhidas no dia 9 de fevereiro de 2011 foram colocadas em balões de vidro de 5l para manter, as condições naturais usando a água ácida, proveniente da Área Mineira Abandonada de S. Domingos, recolhida no dia da amostragem como suporte nutritivo (figura 7).

Das 17 amostras recolhidas no dia 31 de março de 2011 dez foram processadas, as restantes sete não continham material suficiente para todo o processo ou apresentavam um volume de sedimento que não permitia a extração conveniente de DNA.

As 15 amostras referidas foram observadas em microscopia (cf. 3.3) e extraiu-se DNA total (cf. 3.4).

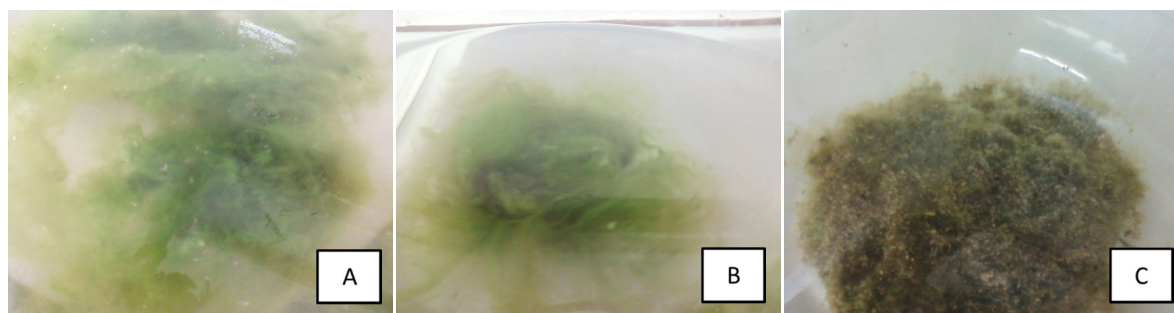


Figura 7 – Três das quatro amostras recolhidas dia 9 de fevereiro de 2011 na Área Mineira Abandonada de S. Domingos. **A** - amostra de plâncton; **B** - amostra de plâncton; **C** - amostra de bentos. (Fotografias Telma Valente)

3.3. Microscopia e identificação

Preparações frescas, de cada amostra, foram observadas em microscopia de campo claro e de epifluorescência. Utilizou-se o microscópio Leitz DMLB, com oculares HC Plan 12.5x/16 (Leica), objetivas NPlan 10x/0.25 e NPlan 40x/0.65, e as objetivas de imersão Plan APO 63x/1.32 – 0.6 e NPlan 100x/1.25. Este microscópio tem acoplado uma câmara fotográfica digital Leica DC 300FX com um sistema de aquisição de imagem servido pelo programa Leica QWin versão 3.2.1.

Em microscopia de campo claro observou-se a forma e dimensão das células e estruturas como cloroplastos, flagelos, estigmas, pirenoides, zoósporos e frústulas, entre outras, necessárias para identificar microalgas. Em microscopia de epifluorescência observou-se a autofluorescência das estruturas cloroplastidiais, recorrendo a um filtro verde (Leica LP590 N2.1) para excitar a clorofila *a* a comprimentos de onda entre os 515 e os 560 nm, o que permitiu verificar a viabilidade das células observadas. Para além da fluorescência natural, recorreu-se ao corante Azul do Nilo para registar a presença de lípidos nas células fotossintéticas. Este corante tem uma afinidade para as moléculas lipídicas formando um complexo que, quando excitado com luz azul, emite luz amarela que é mais intensa quanto maior a quantidade de lípidos (Bertozzini *et al.*, 2011). A intercalação de um filtro (Leica LP515 I3) no feixe de luz UV emitida pelo microscópio permitiu obter luz azul de comprimento de onda entre 450 e 490nm.

3.4. Extração de DNA

As amostras selecionadas para extrair DNA foram colocadas em tubos Eppendorf de 1.5 ml e de seguida centrifugadas a 10000 xg para eliminar a água ácida. Esta água foi decantada, adicionou-se 800µl de PBS 1x a cada tubo para lavar as amostras e foram novamente centrifugadas. Repetiu-se o processo de decantação, retirando todo o líquido presente nos tubos com a ajuda de uma pipeta, após o que as amostras foram extraídas em triplicado com DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as indicações do fabricante.

3.5. Amplificação de regiões alvo para identificação molecular

Depois de extraído, o DNA foi amplificado com um conjunto de primers escolhidos que flanqueassem duas zonas conservadas, com o propósito de obter amplicões que abrangesse toda a diversidade de microalgas presentes nas amostras. Com os primers escolhidos para o gene nuclear que codifica para a subunidade 18S rRNA (designado por 18S rDNA) obteve-se fragmentos com ± 700 bp. No caso dos primers escolhidos para o gene plastidial que codifica o Domínio V da subunidade ribossomal 23S rRNA (designado por 23S rDNA) obtiveram-se fragmentos de ± 410 bp. Os primers foram sintetizados por Metabion (Alemanha), de acordo com as sequências indicadas na tabela II.

Tabela II – Primer escolhidos para amplificar duas regiões conservadas do genoma de eucariotas fototróficos.

Referência	Primer	Sequencia 5' → 3'	Domínio
Rasoul-Amini <i>et al.</i>, 2009	18S_f	GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA	18S rRNA
	18S_r	AGGGCAGGGACGTAATCAACG	
Sherwood e Presting, 2007	23SrV_f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	Domínio V
	23SrV_r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	23S rRNA Plastidial

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

Os replicados extraídos, de cada amostra, foram amplificados, por PCR, usando os volumes de cada componente conforme descrito na tabela III, para um volume final de reação de 50 μ l. Foram usados tubos para PCR (VWR Collection) de 0.2 ml livres de DNase, RNase e DNA humano. Os tubos de PCR foram sujeitos a ciclos de temperaturas num termociclador (Biometra Uno-Thermoblock) iniciando a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de aquecimento e arrefecimento sucessivo a 3 temperaturas com a seguinte sequência: 95°C durante 30s, 55°C durante 30s e 72°C durante 60s; e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela III – Mistura dos componentes usados para a amplificação por PCR.

Componentes	Volume para cada reação	Concentração final
Água para biologia molecular estéril (Sigma-Aldrich, USA)	40.8 μ l	-
Tampão 10X Dream Taq (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	5.0 μ l	1x
dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	1.0 μ l	400 μ M
Primer direto	1.0 μ l	400 μ M
Primer inverso	1.0 μ l	400 μ M
Dream Taq DNA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	0.2 μ l	0,04U. μ l ⁻¹
DNA extraído	1.0 μ l	-

NOTA: O tampão 10x Dream Taq já contém MgCl₂ adequado à reação.

Para verificar se os fragmentos amplificados correspondiam às regiões pretendidas foram realizadas eletroforeses em gel de agarose (1.5%) com greensafe, usando o marcador O'GeneRuler™100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) como referencia. A migração do DNA foi efetuada durante 30 minutos a 100V. Os géis foram visualizados num transiluminador (Elettrofor UV for transilluminator) com aquisição de imagem.

3.6. Clonagem

As amostras que apresentavam uma banda de DNA na zona dos 700bp ou 400bp, foram ligadas ao vetor pGem – Teasy (Promega, Madison, WI) e clonadas por transformação de células competentes previamente preparadas. A reação foi feita pela ordem apresentada na tabela IV, misturada e incubada a 4°C durante a noite.

Tabela IV – Componentes usados na reação de ligação do fragmento de interesse ao vetor pGem – Teasy (Promega, Madison, WI) e os respetivos volumes usados.

Componente	Volume (µl)
Tampão de ligação rápido 2x para T4 DNA ligase	5.0
Vetor pGem – Teasy	1.0
Produto de PCR	6.0
T4 DNA ligase	1.0

As células competentes (Dh5α – preparadas no laboratório, pelo método do cloreto de cálcio e armazenadas a -80° C, com adição de DMSO) foram descongeladas lentamente por manutenção em gelo. Adicionou-se 6µl de cada produto de ligação a cada tubo de células competentes, devidamente identificadas, e foram incubadas durante 30 minutos no gelo. Posteriormente foram colocadas durante 90s a 42°C, e de seguida foram arrefecidas em gelo durante 90s. Retiraram-se os tubos com as células do gelo e adicionou-se 250µl de meio SOC incubando-se de seguida numa estufa (Heidolph inkubator 1000 com Heidolph unimax 1010) a 37° C durante pelo menos 45 minutos com agitação a 200 rotações por minuto (rpm).

Às placas com meio LB Agar (Promadisa, Espanha) com ampicilina (50 µg/ml, Stratagene) foi adicionado 40µl de X-gal (20 mg/ml). De seguida adicionou-se 5µl de IPTG (1M), a cada tubo de células. As células competentes transformadas foram plaqueadas de imediato e as placas foram colocadas na estufa (Heidolph inkubator 1000) a 37° C durante 16h.

As colónias foram rastreadas pela diferenciação da cor azul que evidenciam a presença de vetor sem fragmento. Só as colónias brancas foram testadas para confirmar, por PCR, a presença do fragmento de interesse no vetor, o que permitiu selecionar só as colónias adequadas para o prosseguimento do trabalho. Para tanto, as colónias foram repicadas para

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

novas placas com o mesmo meio e amplificadas em 50 µl de solução para PCR (tabela V), utilizando, no termociclador (Biometra Uno Thermoblock), a sequência de ciclos acima referida. Todos os clones que apresentavam o fragmento de interesse, amplificado pelo correspondente par de primers, foram escolhidos para gerar polimorfismos de acordo com a técnica designada por SSCP.

Tabela V – Componentes para amplificar colônias por PCR.

Componentes	Volume por cada reação	Concentração final
Água estéril (Sigma-Aldrich, USA)	41.8 µl	-
Tampão 10X Dream Taq (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)	5.0 µl	1x
dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)	1.0 µl	400 µM
Primer direto	1.0 µl	400 µM
Primer inverso	1.0 µl	400 µM
Dream Taq DNA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)	0.2 µl	0.04 U.µl ⁻¹

3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

A análise SSCP permitiu obter padrões dos diferentes clones. Os géis de acrilamida a 8% (v/v) foram feitos de acordo com o descrito na tabela VI. O tampão de desnaturação foi constituído por 950 µl de formamida, 40 µl de EDTA (0.5 M; a pH 8) e azul de bromofenol e misturado no agitador de vortex. O processo de desnaturação dos fragmentos está ilustrado na figura 8.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

Tabela VI – Reagentes e volumes necessários para a formação de dois géis de acrilamida 8% em TBE 1x.

Reagente	Volume
Água miliQ estéril	6 ml
TBE 5x (Takara, Japão)	2 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida 40% (29:1) (Applichem, Alemanha)	2 ml
APS 10 % (MERCK, Alemanha)	100 µl
Temed (MERCK, Alemanha)	10 µl

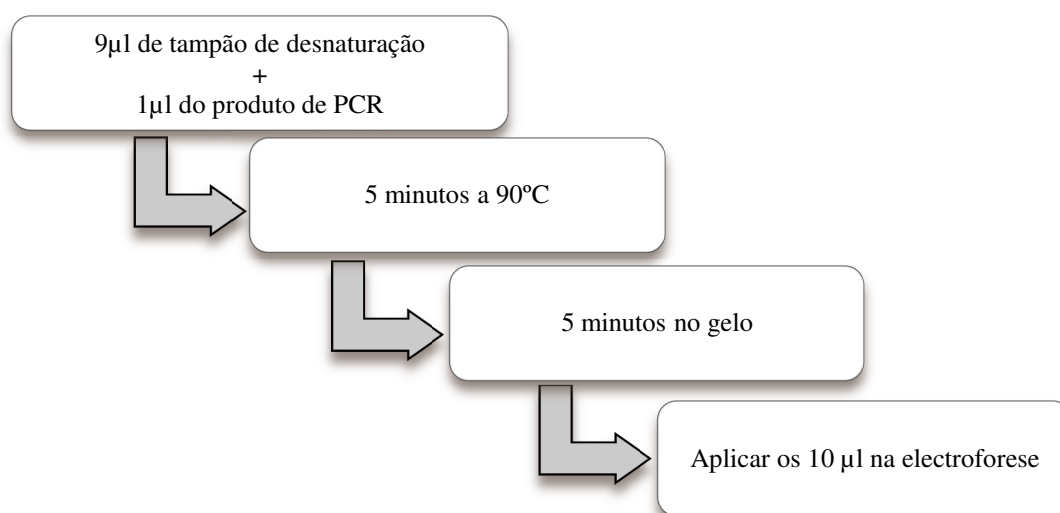


Figura 8 – Esquema do processo de desnaturação dos fragmentos para aplicar nos géis de acrilamida 8% (v/v) em TBE 1x.

A migração em eletroforese, para a obtenção dos padrões de SSCP, foi feita a 4° C durante duas horas para os fragmentos de 400 bp ou duas horas e trinta minutos para os fragmentos de 700 bp, a 200 V e 400 mA. Após a eletroforese, os géis foram retirados, marcados e colocados em ácido acético a 10%, no mínimo 20 minutos. As soluções foram feitas sempre que foi necessário revelar géis de SSCP de acordo com a tabela VII. O protocolo da revelação apresenta-se em esquema na figura 9.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

Tabela VII – Soluções para a revelação dos géis de SSCP.

Reagente	Quantidade (por 100 ml)	Solução
Carbonato de sódio (Panreac, Espanha)	3.0 g	A
Formaldeído 37% (Sigma-Aldrich, EUA)	150 µl	
Tiosulfato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA)	100 µl	
Nitrato de prata (Sigma-Aldrich, EUA)	0.1 g	B
Formaldeído 37% (Sigma-Aldrich, EUA)	150 µl	
Ácido nítrico 1% (Sigma-Aldrich, EUA)	1.0 ml	C

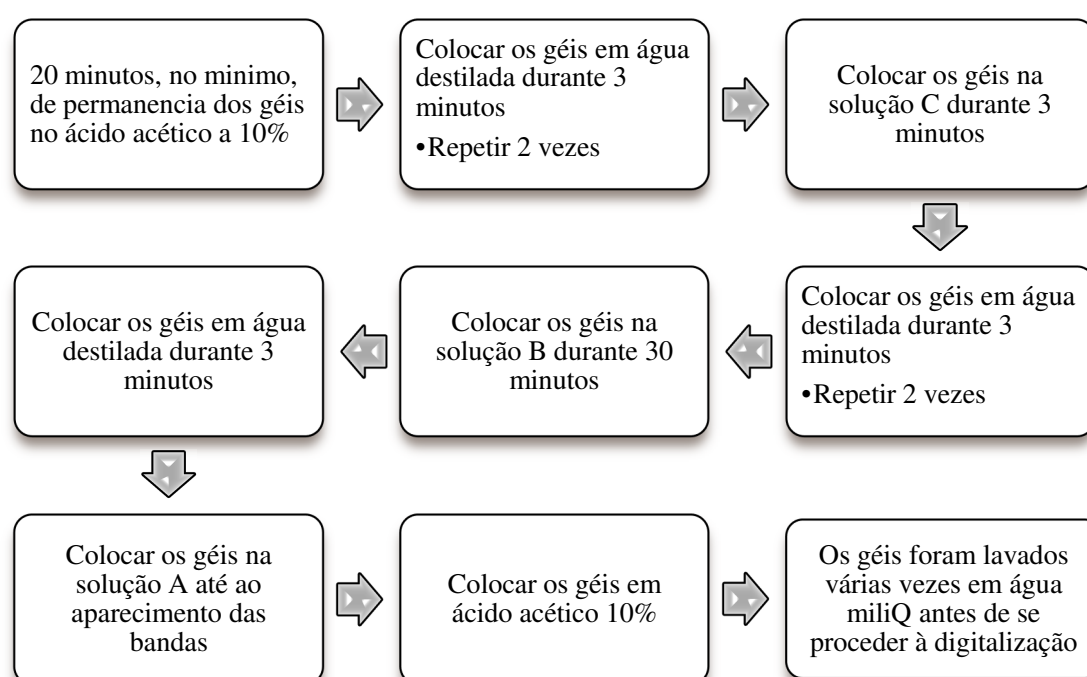


Figura 9 – Protocolo de revelação dos géis de SSCP.

Após o tratamento de revelação dos géis de acrilamida foram escolhidos padrões. Esta escolha foi feita com base na distância entre as bandas resultantes da migração dos fragmentos de DNA desnaturado. Todos os padrões diferentes foram selecionados. Dentro dos diferentes padrões foram selecionados dois iguais.

3.8. Amplificação e isolamento do plasmídeo

Para obter um número elevado de cópias do plasmídeo com o fragmento de interesse, cada colônia selecionada foi colocada em 5 ml de meio LB (Pronadisa, Espanha) com ampicilina (50 µg/ml, Stratagene) e foram incubadas (Heidolph inkubator 1000 com Heidolph unimax 1010) com agitação (200 rpm) a 37° C durante 16 h. O plasmídeo foi extraído com NZYMiniprep kit (NZYTech) de acordo com as indicações do fabricante. A restrição do fragmento foi feita com a enzima EcoRI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). A qualidade da purificação do plasmídeo e a respetiva restrição foi verificada por eletroforese. As restrições que apresentaram o fragmento foram selecionadas para enviar para sequenciação comercial no Centro de Ciências do Mar (CCMAR – UALG).

3.9. Análise de dados

As sequências foram separadas em dois ficheiros, um para cada marcador molecular utilizado. De seguida, foram verificadas e tratadas através do programa BioEdit (versão 7.0.9.0) (Hall 1999) para averiguar a presença de quimeras e a qualidade.

Cada clone foi submetido a uma análise com o programa bioinformático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no Site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As sequências devolvidas pela base de dados são agrupadas com um parâmetro de identidade máxima em relação ao clone que foi submetido. Todas as sequências que apresentavam pelo menos 97% de identidade máxima foram, então, introduzidas no BioEdit juntamente com os clones de modo a construir uma base de dados. Quando cada ficheiro ficou completo, as sequências foram alinhadas com a opção ClustalW multiple alignment, no BioEdit. O alinhamento foi verificado e corrigido à mão. As sequências foram truncadas ao comprimento das sequências do respetivo marcador molecular. Cada ficheiro foi submetido no programa MEGA5 (Tamura K 2011) para a elaboração de dendrogramas e posterior análise.

4. Resultados

4.1. Identificação morfológica

A identificação morfológica dos géneros observados foi feita com base em John, Whitton e Brook (2008). As figuras compreendidas entre 10 e 19 corroboram a premissa de que se encontram organismos fototróficos na AMD da Área Mineira Abandonada de S. Domingos.

As microalgas recolhidas na área mineira abandonada apresentaram filamentos que foram observados ao microscópio, sendo possível identificar estruturas como o cloroplasto, os zoósporos e os zoosporângios (figura 10, 11 e 12). Após a identificação destas estruturas, a microalga filamentosa foi considerada como semelhante a microalgas do género *Klebsormidium* (reino Viridiplantae, filo Streptophyta, Classe Klebsormidiophyceae, ordem Klebsormidiales, família Klebsormidiaceae). Este apresenta células cilíndricas (figura 10) ou em forma de barril (figura 11) com parede fina e lisa, unisseriadas e sem ramificações observadas. Em cada célula, o cloroplasto é único e parietal, com uma constrição a meio, não ocupando totalmente a periferia da célula (figura 12). Apresenta reprodução assexuada por zoósporos, em que em cada célula há formação de um zoósporo que sai, posteriormente, por um poro (figura 10).



Figura 10 – Microalga filamentosa do género *Klebsormidium*; **1.** Zoósporos dentro dos zoosporângios, **2.** Cloroplasto, **3.** Poro de saída do zoósporo.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos



Figura 11 – Microalga filamentosa do género *Klebsormidium*; 1. Cloroplasto.

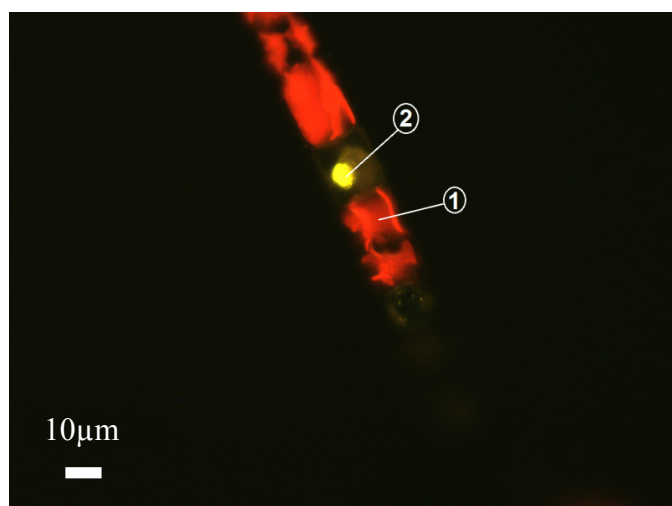


Figura 12 – Microscopia de epifluorescência com o corante azul do Nilo; Microalga filamentosa do género *Klebsormidium*; 1. Cloroplasto, 2. Estrutura Lipídica.

Nas amostras de microalgas filamentosas observou-se uma estrutura esférica com “flagelos” que não apresentava cloroplastos viáveis na observação com o filtro verde em microscopia de epifluorescência. Esta estrutura esférica sugere ser um conjunto de microrganismos flagelados que estão agregados em colónia, denominados coanoflagelados (figura 13).

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

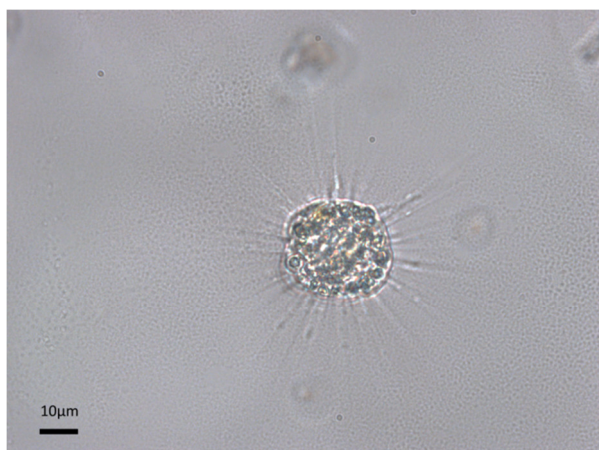


Figura 13 – Microscopia de campo claro, colônia de organismos eucariotas idênticos a coanoflagelados.

As amostras bentônicas recolhidas apresentavam microalgas unicelulares com formas elipsoides, muitas vezes assimétricas e com parede fina (figura 14). Não foram observados grupos nestas microalgas delimitados por mucilagem, nem apresentavam mobilidade. Apresentam um cloroplasto parietal, tipo placa, em posição lateral (figura 14 B). Estas microalgas apresentam semelhanças morfológicas com as microalgas do género *Coccomyxa* (reino Viridiplantae, filo Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem não atribuída «Trebouxiophyceae incertae sedis», família Coccomyxaceae).

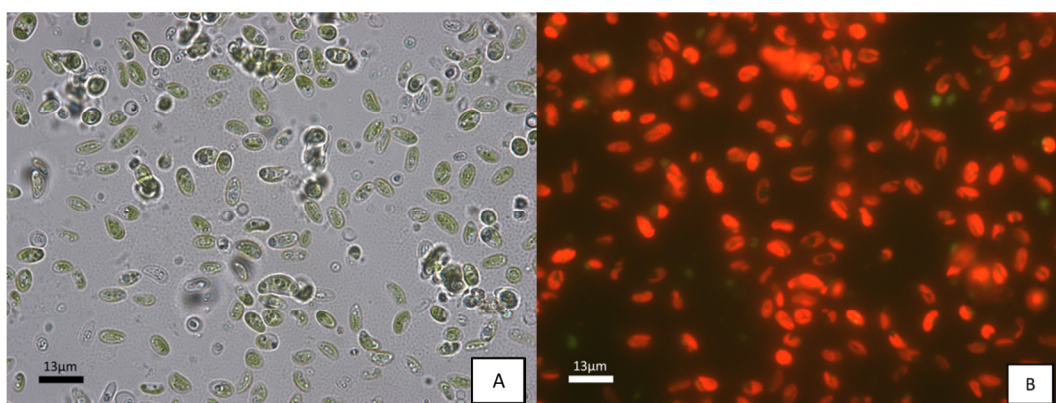


Figura 14 – A: Microscopia de campo claro. Microalgas do género *Coccomyxa*; B: Microscopia de epifluorescência. Estruturas cloroplastidiais da microalga do género *Coccomyxa*.

Além das microalgas do género *Coccomyxa*, verificou-se a presença de diatomáceas (filo Bacillariophyta) em outras amostras bentônicas recolhidas. Estas são classificadas de acordo com a estrutura e ornamentação da parede celular – frústula. Para a identificação que é

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

feita em material não vivo, é necessário um tratamento prévio. As preparações analisadas continham material vivo e de acordo com as estruturas observadas as células não tinham simetria radial, sendo pinuladas. Apresentam uma forma alongada (figura 15 A) com um cloroplasto amarelo esverdeado em forma de H (figura 15 B).



Figura 15 – Diatomáceas. **A** - microscopia de campo claro com identificação de: **1** - vista valvar, **2** - vista pleural. **B** – microscopia de epifluorescência onde se observa os cloroplastos.

As células presentes nas figuras 16, 17 e 18 são do género *Chlamydomonas* (reino Viridiplantae, filo Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales, família Chlamydomonadaceae). As células são arredondadas ou ovoides com paredes finas e lisas. Estas células têm dois flagelos iguais, mais compridos que a célula e inseridos apicalmente (figura 16). Têm reprodução sexuada e assexuada, verificando-se a presença de zoósporos nas amostras (figura 18).

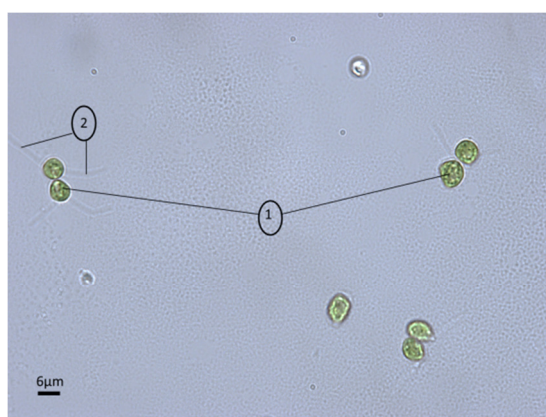


Figura 16 – **1** - Microalga do género *Chlamydomonas*; **2** - Flagelos.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

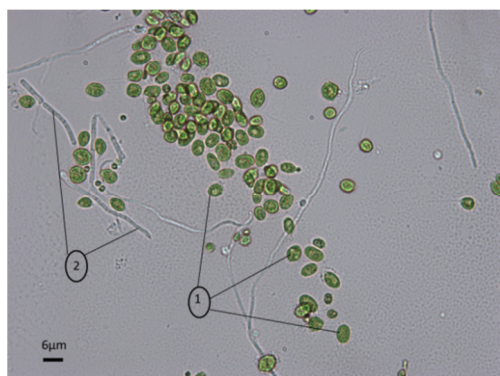


Figura 17 – Formas vegetativas (1) do género *Chlamydomonas* e hifa (2) de fungo.

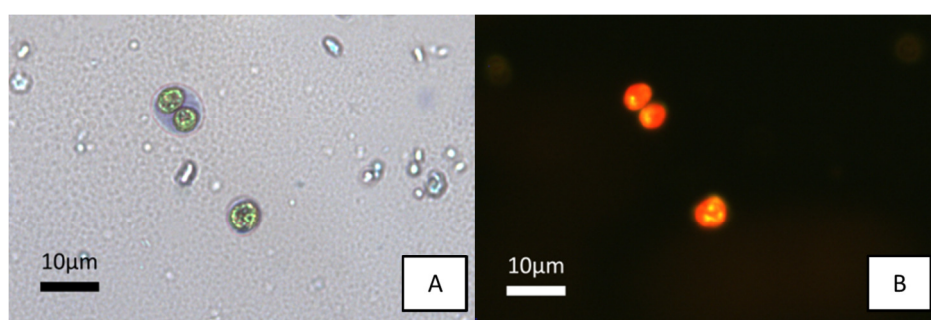


Figura 18 – **A** - Formas vegetativa da microalga do género *Chlamydomonas*. **B** - Microscopia de epifluorescência, Cloroplastos (vermelho) e gotas lipídicas (amarelo) nas formas vegetativas da microalga do género *Chlamydomonas*.

O biofilme recolhido permitiu observar organismos dos géneros *Euglena* (reino Viridiplantae, filo Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales, família Chlamydomonadaceae). As microalgas do género *Euglena* observadas eram unicelulares alongadas, não foram observados flagelos (figura 19). As células apresentavam três ou mais cloroplastos e um estigma.

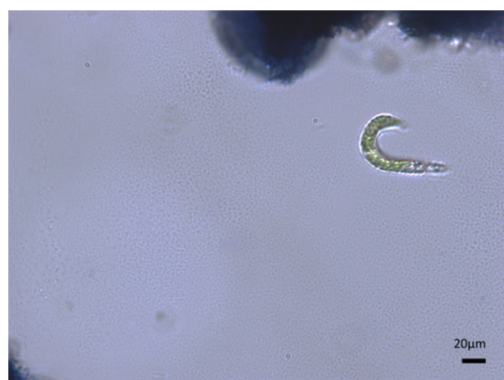


Figura 19 – Eucariota do tipo *Euglena*.

4.2. Identificação molecular

4.2.1. Amplificação por PCR

A amplificação dos marcadores moleculares pretendidos foi melhor sucedida para o 23S rDNA do que para o 18S rDNA. Das quinze amostras selecionadas seis amplificaram com o par de primers 18S rDNA e 12 amplificaram com o par de primers 23S rDNA. A figura 20 exemplifica o resultado da amplificação dos triplicados da amostra 3, recolhida dia 9 de fevereiro de 2011 para ambos os marcadores moleculares.

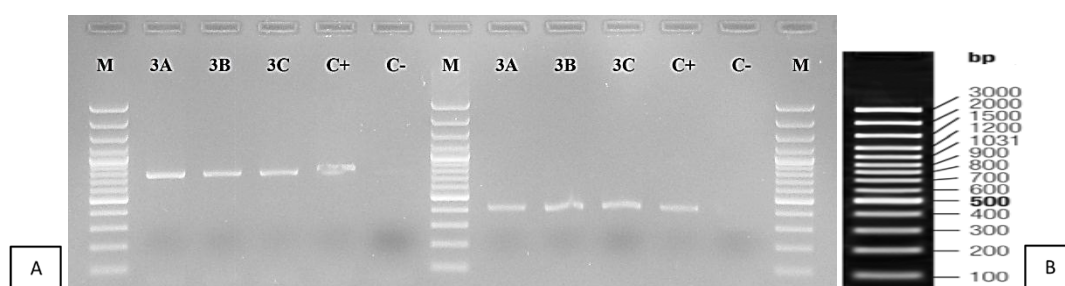


Figura 20 – Exemplo de um gel de eletroforese resultante da amplificação dos triplicados da amostra 3 (9 de fevereiro de 2011). **A** - fragmento de 700 bp correspondente ao marcador molecular 18S rDNA e de 410 bp correspondente ao marcador molecular 23S rDNA; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo; M: Marcador de DNA. **B** – Marcador O'GeneRuler™100 bp Plus.

4.2.2. Análise de SSCP

Os padrões (figura 21) obtidos através de SSCP, para o marcador 18S rDNA, correspondem à amostra recolhida em 2008 e a duas amostras recolhidas dia 9 de fevereiro de 2011. Os padrões (figura 22) referentes ao marcador 23S correspondem à amostra recolhida em 2008, a quatro de 9 de fevereiro e cinco amostras de dia 31 de março de 2011.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

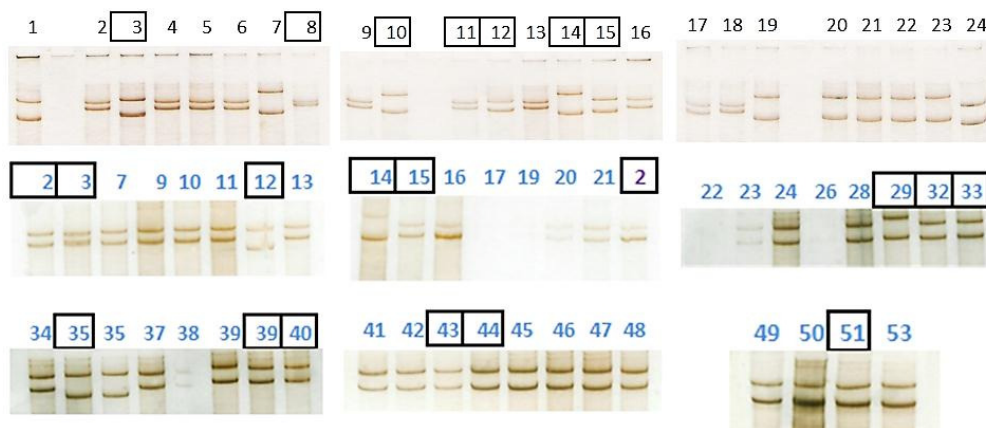


Figura 21 – Padrões de SSCP referentes ao marcador molecular 18S rDNA, os números assinalados correspondem aos padrões enviados para sequenciação.

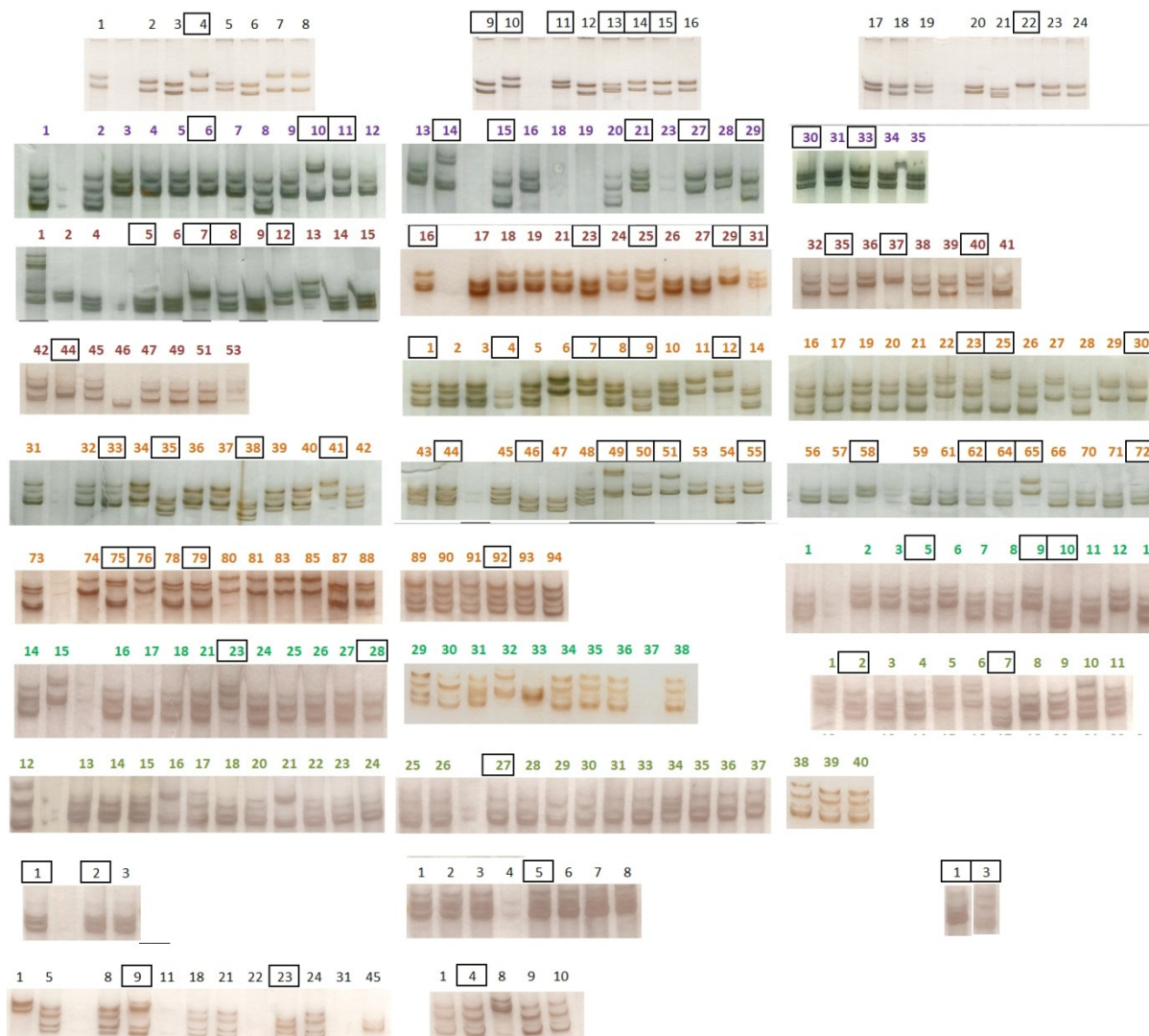


Figura 22 – Padrões de SSCP referentes ao marcador molecular 23S rDNA, os números assinalados correspondem aos padrões enviados para sequenciação.

4.2.3. Análise Filogenética

O agrupamento das associações de *taxa* foi feito pelo método Neighbor-Joining, obtendo-se um dendrograma de consenso a partir da análise de 1000 replicados. O dendrograma (figura 23) que corresponde ao marcador 18S rDNA evidencia os organismos eucariotas presentes na AMD da AMA de S. Domingos, que agrupam com outras sequências depositadas na base de dados GenBank, por diversos autores, e que permitem identificar os grupos *Viridiplantae* (*Chlorophyta* e *Streptophyta*), *Stramenopiles*, *Choanoflagellata* e *Fungi*. Por sua vez, o dendrograma (figura 24) correspondente ao marcador 23S rDNA mostra organismos da linhagem cloroplastidial que agrupam com sequências obtidas na base de dados GenBank, verificando a presença dos grupos *Viridiplantae* (*Chlorophyta* e *Streptophyta*), *Stramenopiles* – *Bacillariophyta*, *Euglenozoa*, *Alfaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

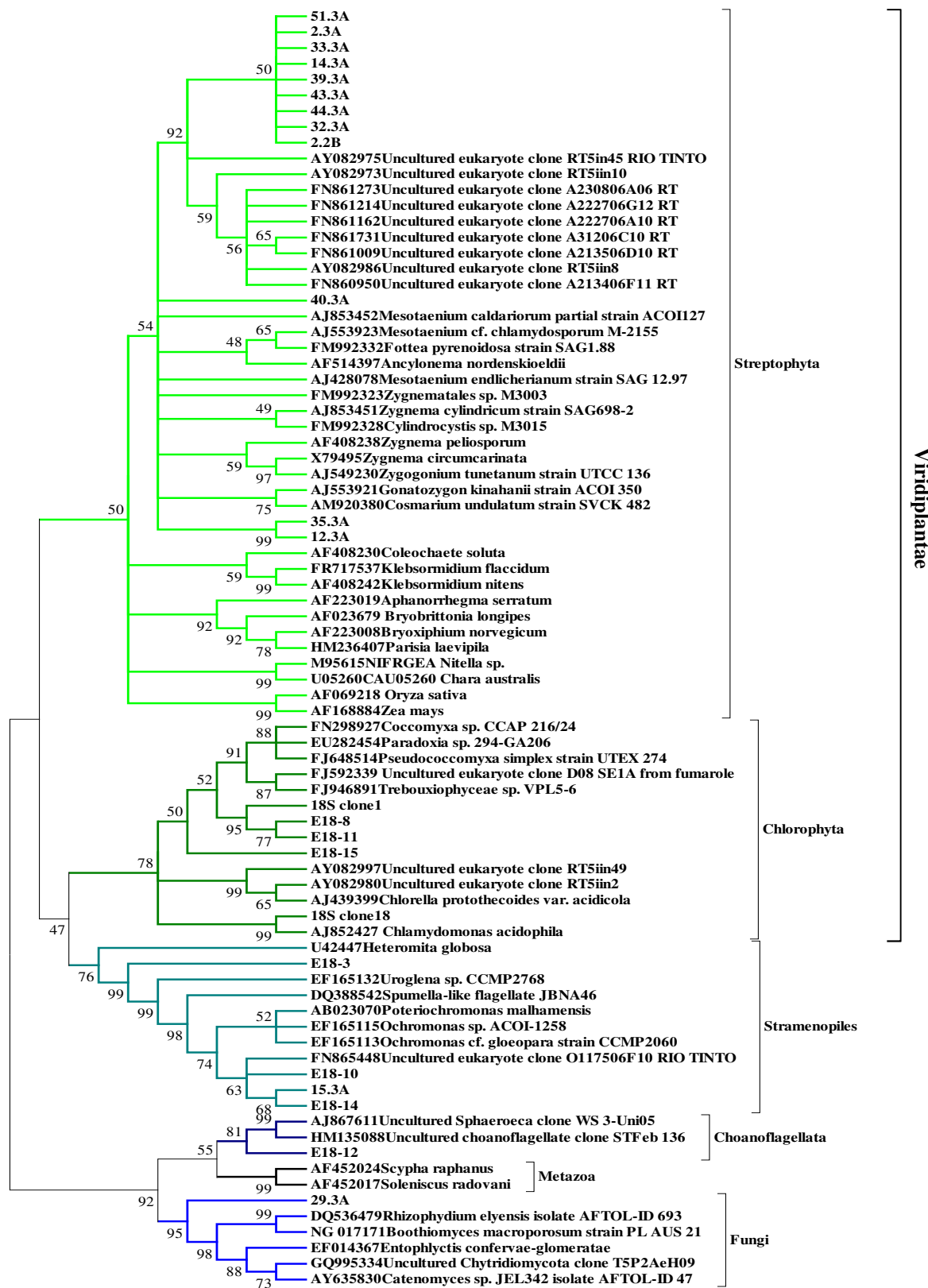
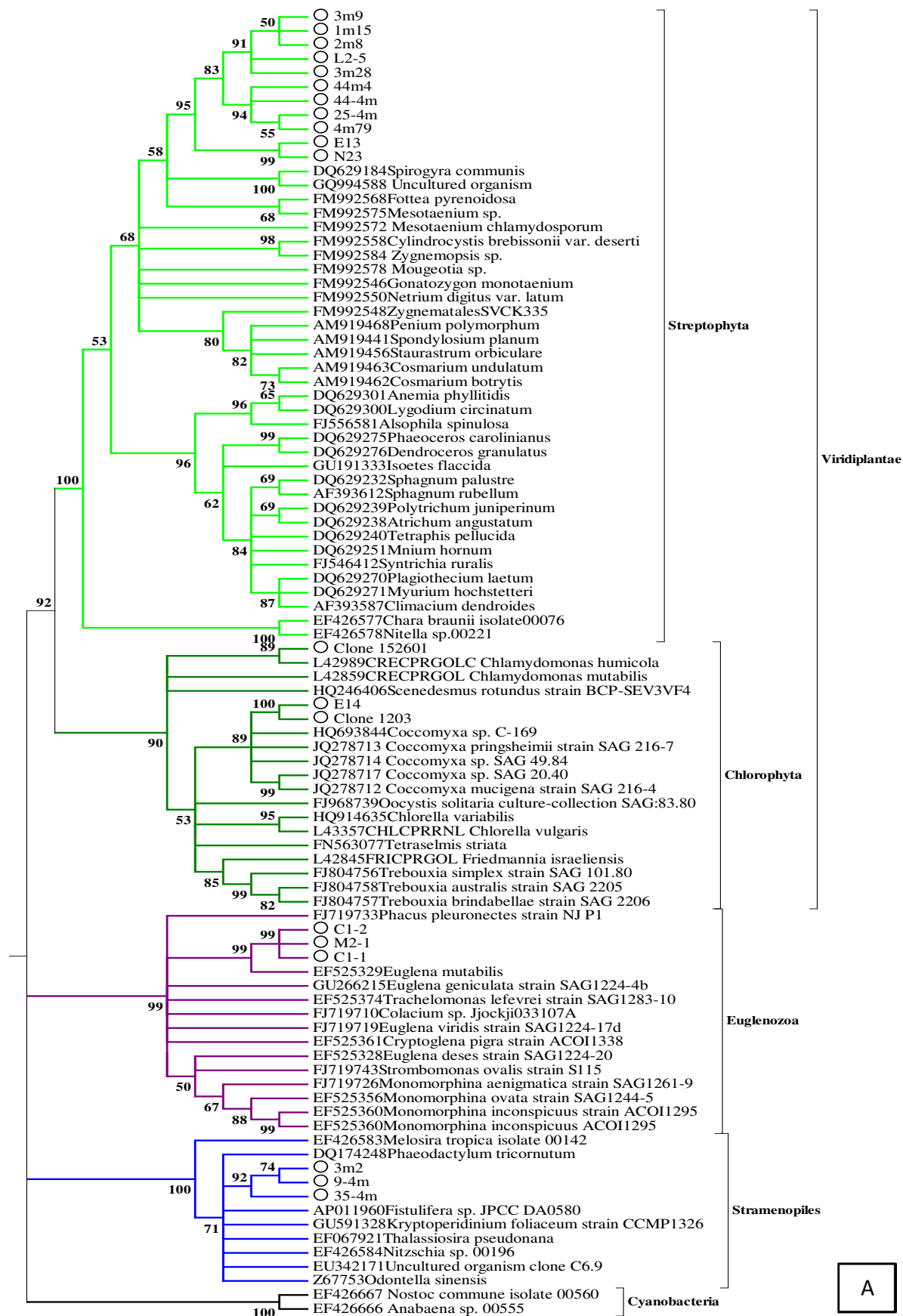


Figura 23 – Dendrograma, obtido com o marcador molecular 18S rDNA nuclear, da diversidade presente nas águas ácidas da AMA de S. Domingos.

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos



Caracterização da Diversidade de Eucariotas Fototróficos Provenientes de Águas Ácidas de Mina

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

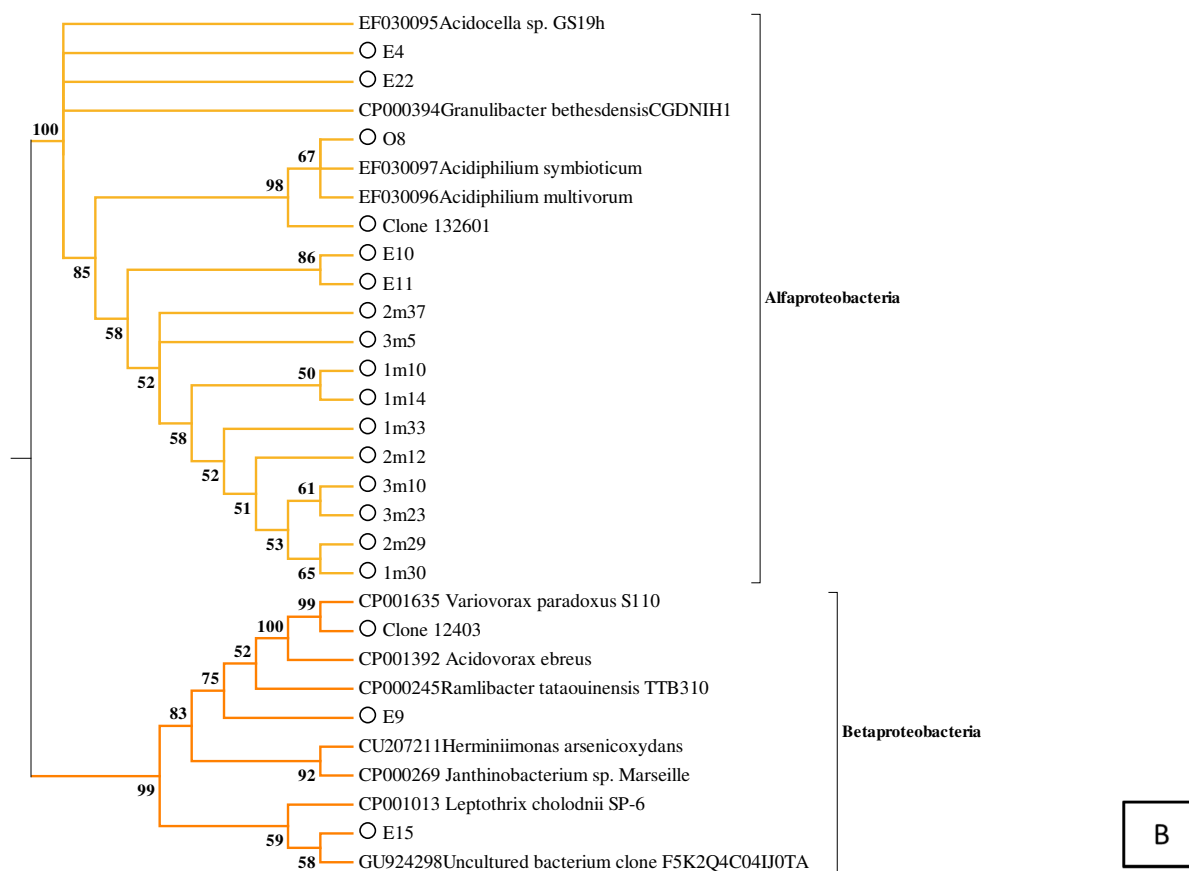


Figura 24 – Dendrograma, obtido com o marcador molecular 23S rDNA plastidial, da diversidade presente nas águas ácidas da AMA de S. Domingos. **A** - Organismos fototróficos; **B** – Bactérias.

5. *Discussão*

No final deste capítulo é possível verificar a presença de diferentes gêneros de microalgas. A observação da morfologia permitiu identificar microalgas dos gêneros *Klebsormidium*, *Chlamydomonas*, *Coccomyxa* e *Euglena*. A presença de diatomáceas também foi referenciada, mas estas não foram identificadas até ao género, pois, o método de identificação requer um tratamentos em que apenas a frústula é observada ao microscópio, e com base nesta atribui-se a identificação. Com estes cinco tipos de organismos observados distinguem-se 3 linhas evolutivas distintas. A identificação morfológica requer, como já foi referido, treino de observação e comparação das estruturas observadas, com outras descritas, por autores que tenham executado o mesmo tipo de identificação em organismos expostos às condições existentes nas águas ácidas de onde provêm as amostras. Muitas vezes, as comparações dos organismos amostrados são feitas com base em organismos identificados que provêm de ambientes considerados ideais, enquanto estes organismos provêm de ambientes designados extremos onde as condições não são as ideais, apesar de se verificar a adaptação dos mesmos.

Na identificação molecular encontraram-se grupos de organismos que iam ao encontro do que foi observado através da microscopia, excetuando as bactérias. Estudos efetuados por Aguilera A. *et al.*, 2007; Aguilera, A. *et al.*, 2007 e Das *et al.*, 2009 em Rio Tinto mostram a presença de organismos fotototróficos acidófilos como os que foram identificados na AMA de S. Domingos. Sendo regiões próximas e com condições ambientais muito idênticas, esperava-se uma concordância na identificação dos organismos presentes nas amostras recolhidas.

A amplificação, com os primers escolhidos, foi melhor para o marcador 23S rDNA uma vez que dos cloroplastos resultam múltiplas cópias do genoma (Heinhorst e Cannon 1993) enquanto o núcleo tem apenas uma cópia do genoma nuclear.

O marcador 18S rDNA apresenta ramos com 45% de consenso que distinguem as relações filogenéticas entre os diferentes grupos. Os ramos que distinguem as relações filogenéticas, da diversidade amostrada, com base no marcador 23S rDNA apresentam 70% de consenso. Com estes valores de percentagem de consenso mostra-se que a definição dada para as amostras aqui tratadas é melhor para o marcador molecular 23S rDNA do que para o marcador molecular 18S rDNA. Verifica-se que a base de dados disponível no Genbank é

II. Identificação de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

mais completa, em termos de diversidade, para o marcador 18S rDNA do que para o 23S rDNA.

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

1. Introdução

O desenvolvimento de técnicas de cultivo de microalgas tem sido muito importante para o estudo das mesmas, quer a nível morfológico, quer a nível experimental (Silva, 2008).

As algas são consideradas autotróficas e em cultura crescem sem fonte de carbono orgânico. No entanto há algumas espécies que requerem uma fonte de carbono orgânico assim como vitaminas. Portanto, um meio de cultura deve conter fontes de todos os elementos constituintes das células a cultivar numa forma que seja por elas assimilável. Na ausência de conhecimento sobre a constituição das células poder-se-á, teoricamente, obter um meio apropriado, reproduzindo aproximadamente o ambiente de onde se retirou o organismo a cultivar e/ou isolar (Barsanti e Gualtieri, 2006). Organismos adaptados a flutuações do meio ambiente sejam elas nictemerais, sazonais ou interanuais, e a viver em consórcio, passarão inevitavelmente por uma fase de adaptação às condições de cultivo que incluem, para além do meio de cultura, as condições de iluminação e de temperatura, mesmo que estas mimetizem as existentes no seu habitat natural (Barsanti e Gualtieri, 2006). Alterações na composição do meio, assim como nas condições de temperatura e de luz são fatores que terão repercussões nas taxas de crescimento.

As técnicas de cultivo podem ser aplicadas a microalgas unicelulares, coloniais ou filamentosas. As microalgas filamentosas podem ser recolhidas com uma ponta curva e os filamentos, preferencialmente jovens, podem ser passados por uma superfície com agar pouco gelificado para retirar outros organismos que estejam associados à alga filamentosa e que não interessam manter em conjunto com esta (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Para obter culturas unialgais pode-se usar diferentes técnicas, nomeadamente, riscado e inoculação sucessiva em placas Petri com meio gelificado com agar agar, diluições seriadas ou recolha de células por capilares.

As culturas axénicas devem conter apenas uma espécie de microalga eliminando os restantes organismos associados à microalga, quer sejam bactérias, fungos ou protozoários.

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

As culturas axénicas podem ser obtidas através de um número elevado de lavagens sucessivas ou do uso de um ou mais antibióticos na constituição do meio. No entanto, verifica-se que algumas culturas de microalgas não podem ser axénicas pois, a presença de bactérias (principalmente) influencia o seu crescimento.

A utilização de meios com composição seletiva irá permitir, como o próprio nome indica, seleccionar diferentes organismos em detrimento de outros. Este método não produz culturas unialgais mas pode ser um primeiro passo para posteriores isolamentos.

As diluições seriadas são eficientes quando existe um organismo “dominante” na amostra recolhida. Esta é diluída sequencialmente em um meio adequado e incubada em condições ótimas de crescimento. A maior diluição, onde ocorra crescimento, é provavelmente unialgal, no entanto este método não garante que a cultura obtida seja clonal e muito raramente axénica.

A seleção de estruturas individuais, em condições de esterilidade, permite obter culturas axénicas e clonais. Estas culturas requerem no entanto um bom microscópio de dissecção, pipetas capilares e, por parte do investigador impõe-se destreza e paciência. Os microrganismos a seleccionar deverão apresentar um tamanho relativamente grande e ter movimentos lentos. Existem outros métodos físicos, nomeadamente, filtração seletiva, centrifugação por gradientes de densidade e citometria de fluxo que também podem auxiliar no isolamento de microalgas, pois baseiam-se essencialmente na densidade e no tamanho da célula (Warren, Day e Brown, 1997).

As placas de agar agar são práticas para o crescimento e individualização de colónias de microalgas. Uma gota de amostra pode ser colocada na superfície do meio sólido e espalhada com um espalhador estéril, as colónias irão crescer a partir de uma célula ou de um conjunto de células quando incubadas a condições ótimas de crescimento. Estas colónias devem ser recolhidas, de forma asséptica, e ressuspensas em meio líquido, repetindo-se o método do espalhamento (Warren, Day e Brown, 1997).

Os métodos de isolamento descritos anteriormente são os mais comumente usados, no entanto existem outros que se podem usar. Por exemplo o uso de bactericidas não específicos para eliminar os organismos não desejados, o uso de dióxido de germânio para eliminar diatomáceas, radiações UV, fragmentação e ultrasonicação, centrifugação a baixa velocidade, estímulo de migração e incubação a temperatura elevada (apenas para organismos termófilos) (Warren, Day e Brown, 1997).

Usualmente, em laboratório, utiliza-se a subcultura como forma de manter um isolado de microalga. A frequência da subcultura depende do meio onde se encontra assim como da espécie a manter. Subculturas em placas com meio sólido deverão ser repicadas antes da superfície sólida perder a maioria da água, principalmente se forem microalgas com mobilidade. Normalmente, os isolados são observados ao microscópio para verificar a presença de células viáveis e a ausência de outros organismos. O uso de condições assépticas diminui o risco de contaminações (Warren, Day e Brown, 1997). Verifica-se, no entanto, que as microalgas eucariotas, em subcultura, podem mudar a sua morfologia, perder a viabilidade dos cistos ou não formar flagelos; e em alguns casos, as alterações são irreversíveis (Warren, Day e Brown, 1997).

2. Objetivos

Os objetivos traçados para este capítulo tinham em vista: i) cultivar, isolar e purificar microalgas provenientes da Área Mineira Abandonada de S. Domingos recorrendo a meios de cultivo líquidos e sólidos, com base no pH a que se encontra o habitat destas, ii) identificar os isolados obtidos, quer morfologicamente, quer molecularmente e iii) manter os isolados unialgais, através de subculturas.

3. Metodologia

3.1. Meios de cultura

3.1.1. Meio líquido

Inicialmente procedeu-se à esterilização da água ácida por filtração, pretendendo-se cultivar os organismos recolhidos na AMD da AMA de S. Domingos com esta água. A água ácida foi filtrada primeiro por um filtro de acetato de celulose EZ-Pak 0.45 μm de poro e 47 mm de diâmetro (Ref. EZHAWG474, Millipore, Merck, França) e depois com um filtro de acetato de celulose EZ-Pak 0.22 μm de poro e 47 mm de diâmetro (Ref. EZGSWG474, Millipore, Merck, França). Esta água ácida foi armazenada num armário escuro.

O meio de cultura K9 Modificado (MK, anexo I) (Cuaresma *et al.*, 2006), testado por outros investigadores, foi usado para cultivar e isolar os microrganismos eucariotas fototróficos provenientes das águas ácidas da AMA de S. Domingos. Um meio de cultura sintético definido que mimetiza-se a água ácida permitiu fazer ajustes na sua composição para, por exemplo, fazer crescer os microrganismos e manipular a produção de determinado metabolito, ou aumentar a quantidade de um composto para verificar se interfere na produção final de biomassa.

3.1.2. Meio Sólido com agar

O meio sólido foi preparado com base no meio MK. O agar foi preparado separadamente do meio MK (Cuaresma *et al.*, 2006). Para fazer um litro de meio sólido preparou-se 700ml de meio MK (anexo I) e 300 ml de agar (6 g) em água destilada. A mistura foi feita quando ainda estavam quentes (após a esterilização) e procedeu-se à distribuição pelas placas de Petri (Sarstedt, Alemanha), descartáveis e estéreis, logo de seguida. Depois de misturado e gelificado, este meio, não deve ser reaquecido para distribuir por placas de Petri, pois verificou-se uma deficiente gelificação deste e que inviabiliza a realização de riscados na superfície do meio sólido.

3.2. Cultivo e Isolamento

As diferentes amostras recolhidas, em 2008 e 2011, foram inoculadas em frascos de cultura com tampa com filtro hidrofóbico (Orange Scientific, Bélgica) estéreis por raios Gama, livres de DNA e RNA, com meio MK e placas de Petri com meio MK sólido. Nos frascos de cultura de 40 ml, com 15 ml de volume máximo de trabalho, colocou-se 1 ml de amostra e 9 ml de meio líquido MK. Nas placas com meio sólido MK foram colocados 500 μ l de amostra e espalhada de seguida. Os frascos foram colocados na posição horizontal para que a superfície exposta á luz e ao ar fosse maior, o facto de estes frascos terem uma tampa com filtro hidrofóbico permitiu ter as culturas arejadas com um baixo risco de contaminação. Os frascos e as placas foram colocados em prateleiras com luz ($48.5 \pm 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) e temperatura ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) constantes. Os microrganismos foram sujeitos a um fotoperíodo diário de 16h de luz.

As placas foram repicadas, por riscado à exaustão (figura 25 A), quando se distinguiam colónias isoladas. O riscado simples também foi usado, mas apenas para manter a cultura (figura 25 B).

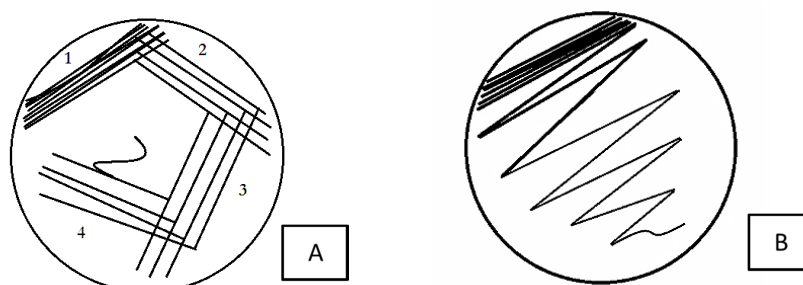


Figura 25 – **A.** Esquema do riscado usado no isolamento e purificação de organismos eucariotas fototróficos aquáticos acidófilos. **B.** Esquema do riscado simples usado para manter as culturas em placa (subcultura).

A figura 26 esquematiza brevemente o processo de isolamento aplicado nas amostras. Entre repicagens, por riscado, as culturas foram observadas no microscópio Leitz DMLB, referido anteriormente, de modo a documentar a presença de uma só microalga.

Após seis repicagens, uma colónia isolada foi transferida para 5 ml de meio MK utilizando tubos de vidro estéreis com tampa. Quando se verificou o desenvolvimento da microalga (por aquisição de cor verde), este volume foi vertido para um frasco de cultura de 40 ml, adicionando meio MK até completar 15 ml. O desenvolvimento das microalgas no

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

volume anterior proporcionou a possibilidade de inocular frascos de cultura maiores (400 ml com volume máximo de trabalho de 100 ml). Com este processo obteve-se biomassa suficiente para realizar extração de DNA e averiguar a presença de uma só espécie de microalga em cada cultura, por métodos moleculares.

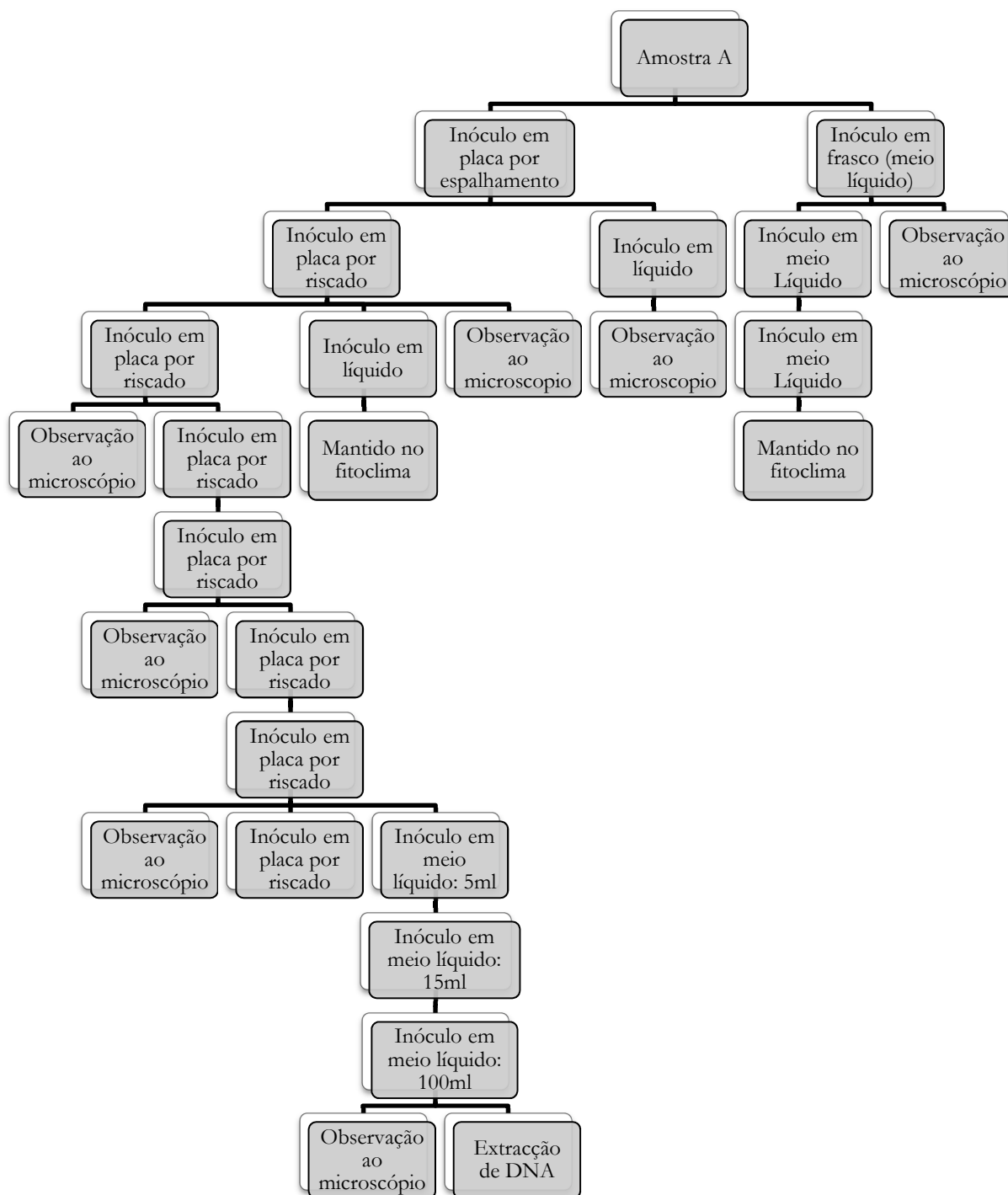


Figura 26 – Esquema do procedimento utilizado para obter culturas unialgais.

3.3. Observação ao microscópio

As amostras das culturas (preparações frescas) foram observadas em microscopia de campo claro e de epifluorescência para verificar se a cultura estava ou não unialgal. Utilizou-se o microscópio Leitz DMLB, referido anteriormente.

Como nas amostras ambientais, também se observou a presença de estruturas lipídicas com o corante Azul do Nilo (Sigma, EUA). Após as observações ao microscópio, foram selecionadas seis culturas para extrair DNA.

3.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada para cada uma das culturas que indicava estar unialgal. Foram pipetados 6 ml de cultura para frascos tipo Falcon de 50 ml que foram centrifugados a 9000g durante 10 minutos para eliminar o meio MK. O meio MK foi decantado, adicionou-se 500µl de PBS 1x a cada frasco para lavar e ressuspender as amostras. O resultado foi colocado em tubos de 1.5 ml que foram centrifugados a 11000g durante 8 minutos. Repetiu-se o processo de decantação, retirando todo o PBS presente em cada tubo com a ajuda de uma micropipeta. A extração de DNA foi realizada com DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). As amostras foram extraídas de acordo com as indicações do fabricante.

3.5. Amplificação de regiões alvo para identificação molecular

Realizou-se amplificações, por PCR, para ambos os fragmentos de interesse descritos no capítulo anterior utilizando os primers referidos na tabela 2.

O programa de PCR, para a amplificação dos fragmentos, foi o descrito no capítulo anterior. A eletroforese para verificar a amplificação dos fragmentos decorreu durante 30 minutos a 100V. Os géis foram fotografados sobre um transiluminador (Elettrofor UV for transilluminator).

3.6. Clonagem

Os fragmentos amplificados por PCR foram ligados com CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. O protocolo dividiu-se em dois passos: i) a reação de *blunting*, a enzima DNA *blunting* reconhece as extremidades do fragmento de DNA, na extremidade 3' retira os nucleótidos até que as duas cadeias estejam do mesmo tamanho e na extremidade 5' faz o resto da sequência para que as duas cadeias fiquem, também, do mesmo tamanho e; ii) ligação do fragmento ao vetor (figura 27). A adição dos componentes para a execução da tarefa foi feita sempre no gelo. A ligação obtida foi usada de imediato na transformação das células competentes da estirpe XL1Blue (preparadas no laboratório, pelo método de Cloreto de cálcio, armazenadas a -80°C com DMSO).

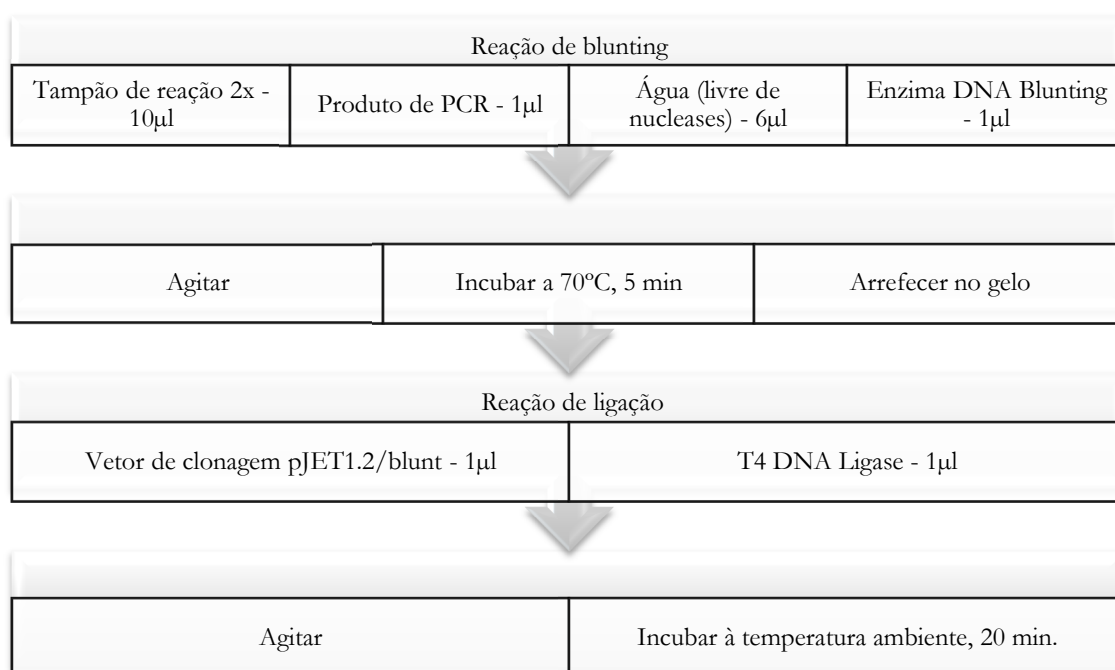


Figura 27 – Esquema da reação de ligação do fragmento de interesse ao vetor pJET1.2/blunt.

As células competentes foram retiradas do armazenamento (-80° C) e mantidas em gelo para descongelarem lentamente. Adicionou-se 6 µL de cada produto de ligação a cada tubo de células competentes, devidamente identificadas, e foram incubadas durante 30 minutos no gelo. Posteriormente foram colocadas durante 90s a 42° C, e de seguida foram

arrefecidas em gelo durante 90 s. Retiraram-se os tubos das células do gelo e adicionou-se 250 µL de meio SOC, colocando-se de seguida numa estufa de incubação (Heidolph inkubator 1000 com Heidolph unimax 1010) com temperatura a 37° C pelo menos 45 minutos com agitação a 200 rpm. As células competentes transformadas foram inoculadas em placas de Petri com meio LB Agar com ampicilina (50 µg/ml, Stratagene). As placas de Petri foram colocadas na estufa (Heidolph inkubator 1000) a 37° C durante 16 h.

Para confirmar que cada colónia continha o vetor com o fragmento de interesse realizou-se amplificações, por PCR, permitindo seleccionar só as colónias adequadas para o prosseguimento do trabalho. As colónias foram repicadas e amplificadas em 50 µl de solução para PCR (capítulo II, tabela III). O programa de PCR foi descrito anteriormente. Todos os clones que apresentavam o fragmento de interesse, amplificado pelo correspondente par de primers, foram escolhidos para obter SSCP.

3.7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

O processo utilizado para obter padrões por SSCP foi o mesmo referido no capítulo II.

3.8. Amplificação e isolamento do plasmídeo

O procedimento referente à amplificação e obtenção do plasmídeo foi o mesmo referido no capítulo II.

3.9. Análise de dados

As sequências foram verificadas no BioEdit para averiguar a qualidade e se existiam quimeras. Foram criados dois ficheiros, um para cada marcador. As sequências foram tratadas e submetidas a um BLAST no Site National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências que retornaram do BLAST, com 97% de identidade, foram adicionadas ao

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

respetivo ficheiro, alinhadas com a opção ClustalW multiple alignment e corrigidas à mão. Foram truncadas ao tamanho das sequências do respetivo marcador molecular, excluindo os primers. Cada ficheiro foi submetido no programa MEGA5 (Tamura K 2011) para a elaboração de dendrogramas e posterior análise.

4. Resultados

4.1. Cultivo e isolamento

As culturas unialgais obtidas por riscado em meio MK sólido estão ilustradas na figura 28. No riscado à exaustão, as primeiras linhas do riscado evidenciam logo alguma cor e onde não se distinguem colónias, contrariamente às últimas linhas do riscado, em que leva algum tempo (± 1 mês) até se distinguirem colónias e conseqüentemente cor. As colónias adquirem um tom verde-escuro com a antiguidade da cultura.

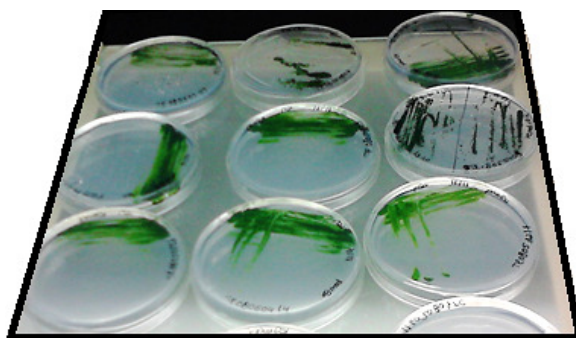


Figura 28 – Placas com meio MK sólido. Riscados de culturas unialgais.

A cultura em meio líquido apresentou-se, inicialmente, quase incolor (figura 29 A), dependendo da quantidade de inóculo que se usou. Esta vai adquirindo um tom mais verde com o decorrer do tempo. Tal como acontece com as culturas em placa, a antiguidade da cultura confere-lhe um tom verde-escuro como mostra a figura 29 B.

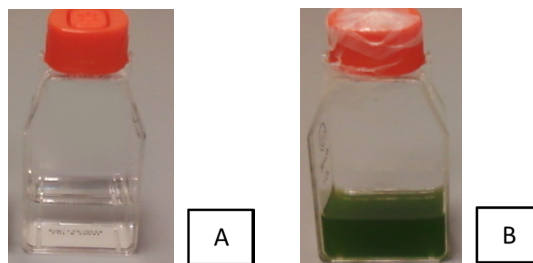


Figura 29 – Cultura unialgal, volume 15 ml. **A.** Cultura em meio MK a pH 2.5 – inóculo; **B.** Cultura em meio MK a pH 2.5 após 2 meses.

4.2. Identificação morfológica das culturas unialgais

Nas seis culturas que aparentavam estar unialgais foram distinguidos dois gêneros de microalgas. As figuras seguintes apresentam isolados de microalgas pertencentes ao gênero *Coccomyxa* (figura 30) e ao gênero *Chlamydomonas* (figura 31).

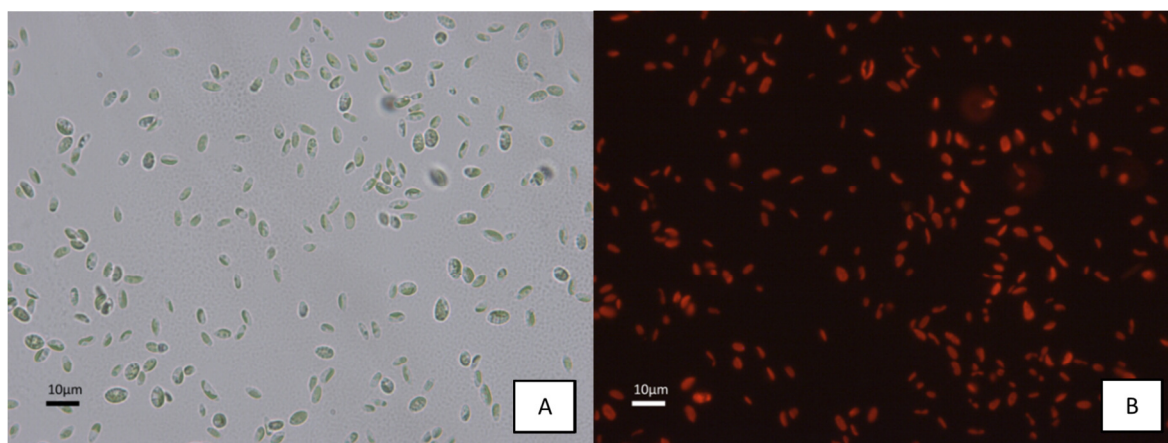


Figura 30 – Isolado unialgal do gênero *Coccomyxa* em microscopia de campo claro (A) e microscopia de epifluorescência com as estruturas cloroplastidiais (B).

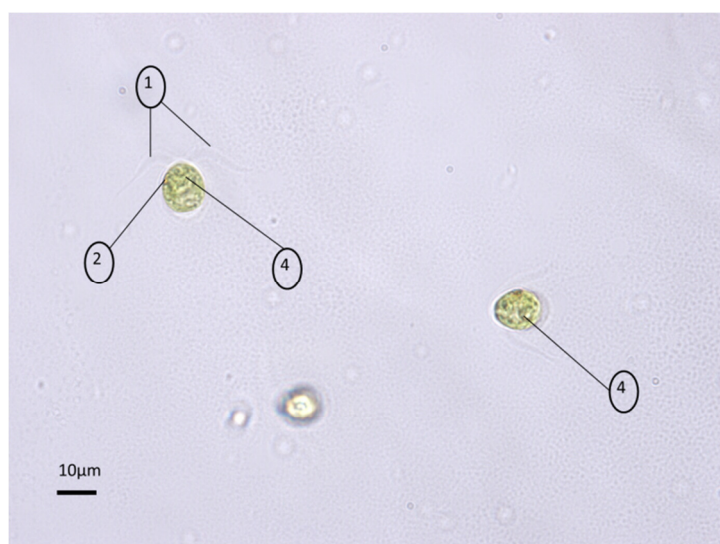


Figura 31 – Isolados unialgais do gênero *Chlamydomonas*. 1. Flagelos; 2. Estigma; 3. Cloroplasto; 4. Pirenoide.

4.3. Identificação molecular das culturas unialgais

4.3.1. Amplificação por PCR

A figura 32 mostra os fragmentos amplificados, que foram verificados por eletroforese, das 6 culturas que, após observação ao microscópio, indicavam estar unialgais. Ambos os marcadores apresentaram amplificação na zona pretendida.

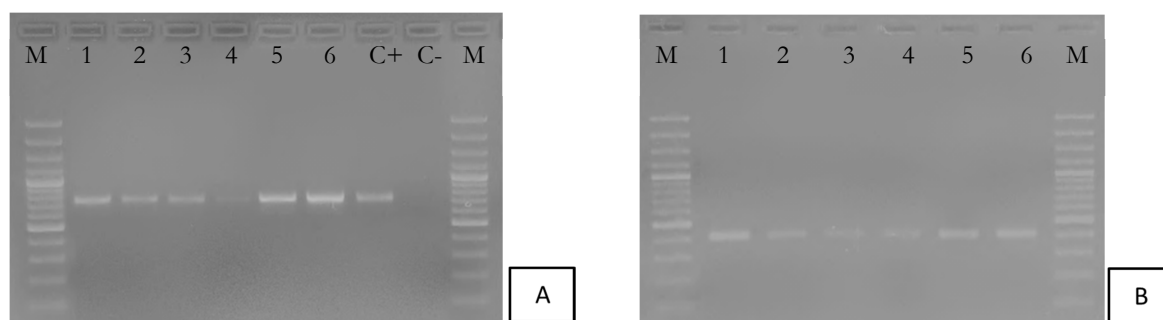


Figura 32 – Eletroforese em agarose com os fragmentos amplificados para cada um dos marcadores moleculares. **A:** eletroforese correspondente ao marcador molecular 18S rDNA com a amplificação de fragmentos com ± 700 bp. **B:** eletroforese correspondente ao marcador molecular 23S rDNA com a amplificação de fragmentos com ± 410 bp. **Legenda:** M – marcador de DNA (O'GeneRuler™100 bp Plus); 1-4 – isolados de *Cocomyxa*; 5-6 – isolados de *Chlamydomonas*.

4.3.2. Análise de SSCP

Nos géis de SSCP dos isolados unialgais distinguiu-se oito padrões diferentes para o marcador molecular 18S rDNA (fig. 33 A) e quinze padrões diferentes para o marcador molecular 23S rDNA (fig. 33 B).

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

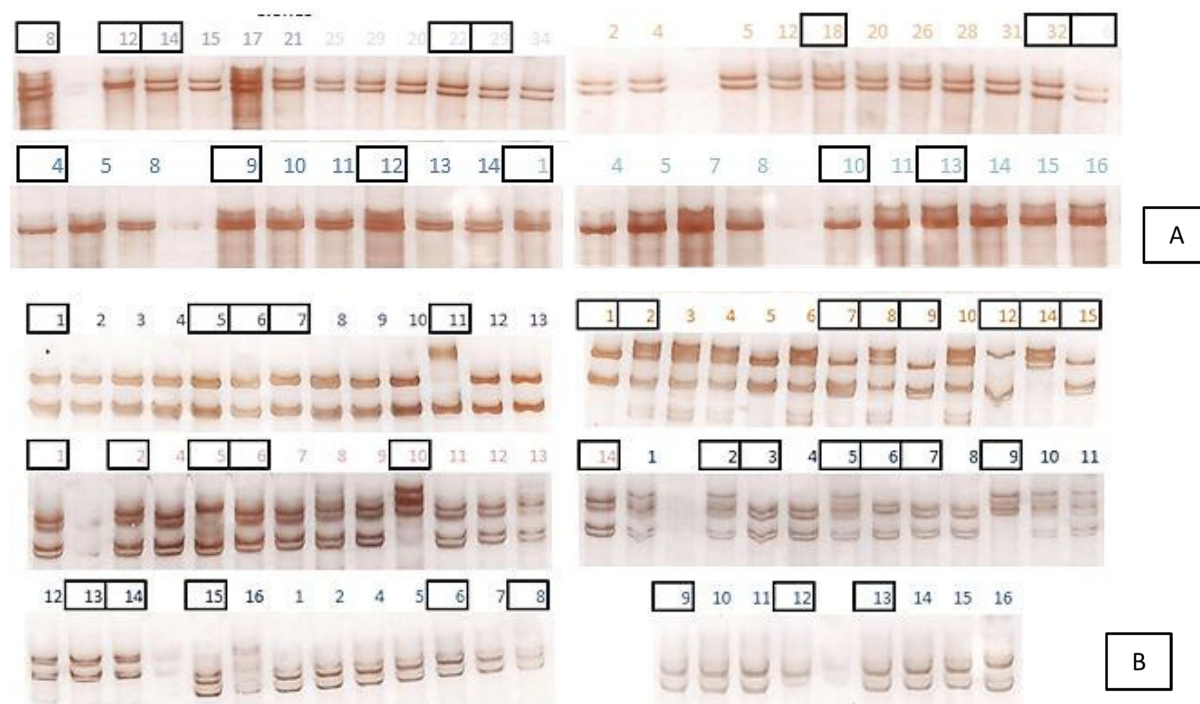


Figura 33 – Padrões de SSCP obtidos das culturas unialgais. Números selecionados são os padrões que foram enviados para sequenciação. **A:** padrões dos fragmentos do marcador molecular 18S rDNA. **B:** padrões dos fragmentos do marcador molecular 23S rDNA.

4.4. Análise Filogenética

As sequências verificadas no programa BioEdit, relativas ao marcador molecular 18S rDNA, apresentavam dois grupos diferentes (anexo II) evidenciando dois tipos de organismos. As sequências retiradas do GenBank apresentavam muitos organismos “não cultivados” que possuem 99% de identidade máxima relativamente aos isolados de *Chlamydomonas* obtidos. O dendrograma (anexo III) apresenta um grupo em que os isolados unialgais aparecem conjuntamente com os organismos “não cultivados” e com organismos da espécie *Chlamydomonas acidophila* da coleção de culturas de algas e protozoários (CCAP). Uma vez que os organismos não cultivados não fornecem informação taxonômica, optou-se por fazer um dendrograma sem as sequências dos organismos não cultivados (figura 34).

O dendrograma referente aos isolados de *Coccomyxa* mostra os clones todos agrupados, sem a ocorrência de outros isolados retirados da base de dados do GenBank. O

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

grupo mais próximo apresenta organismos, na sua maioria, do género *Coccomyxa*, alguns do género *Pseudococcomyxa*, do género *Chlorella* e do género *Paradoxia* (figura 35).

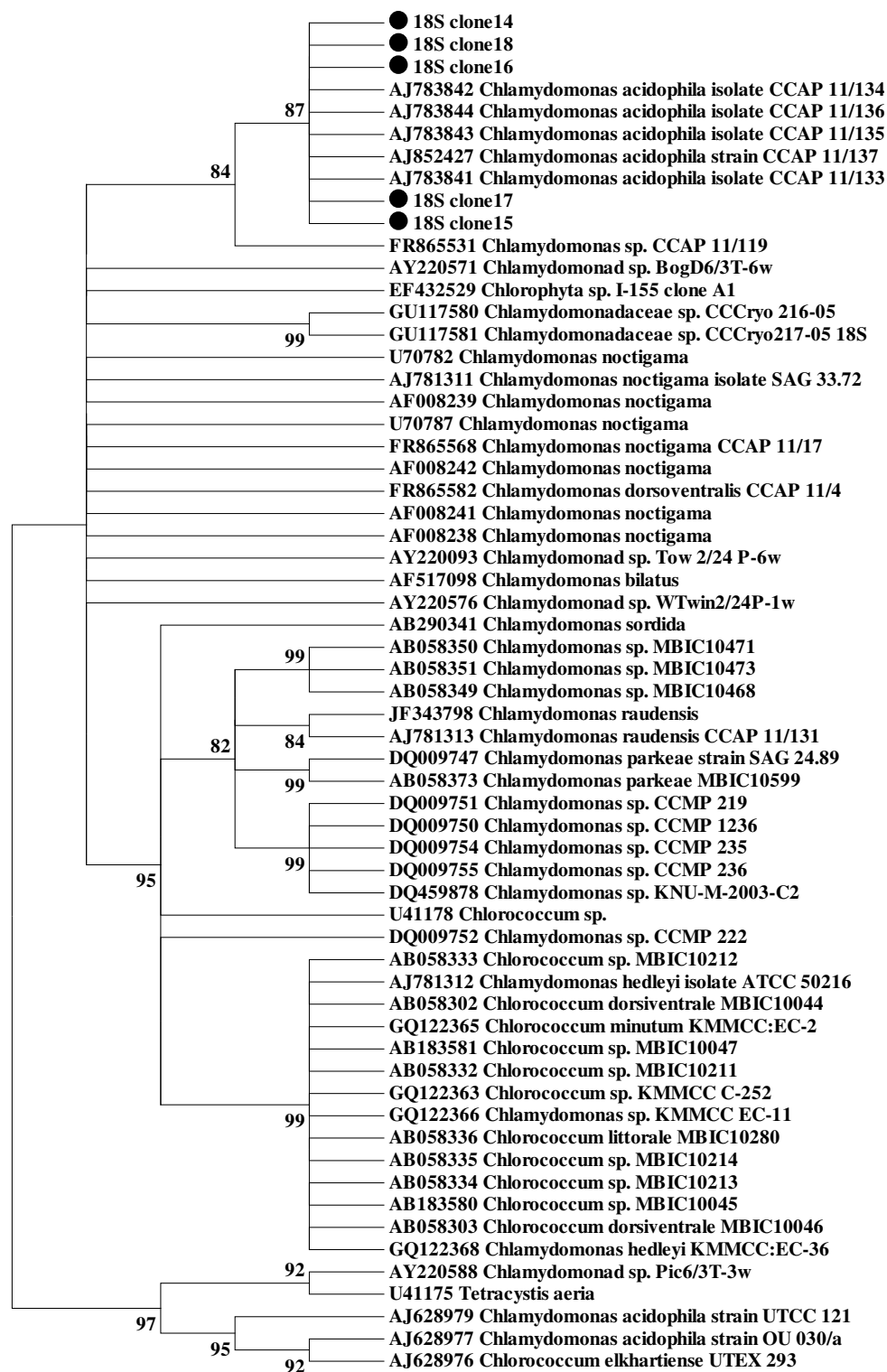


Figura 34 – Dendrograma (marcador filogenético 18S rDNA) de isolados do género *Chlamydomonas*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining.

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

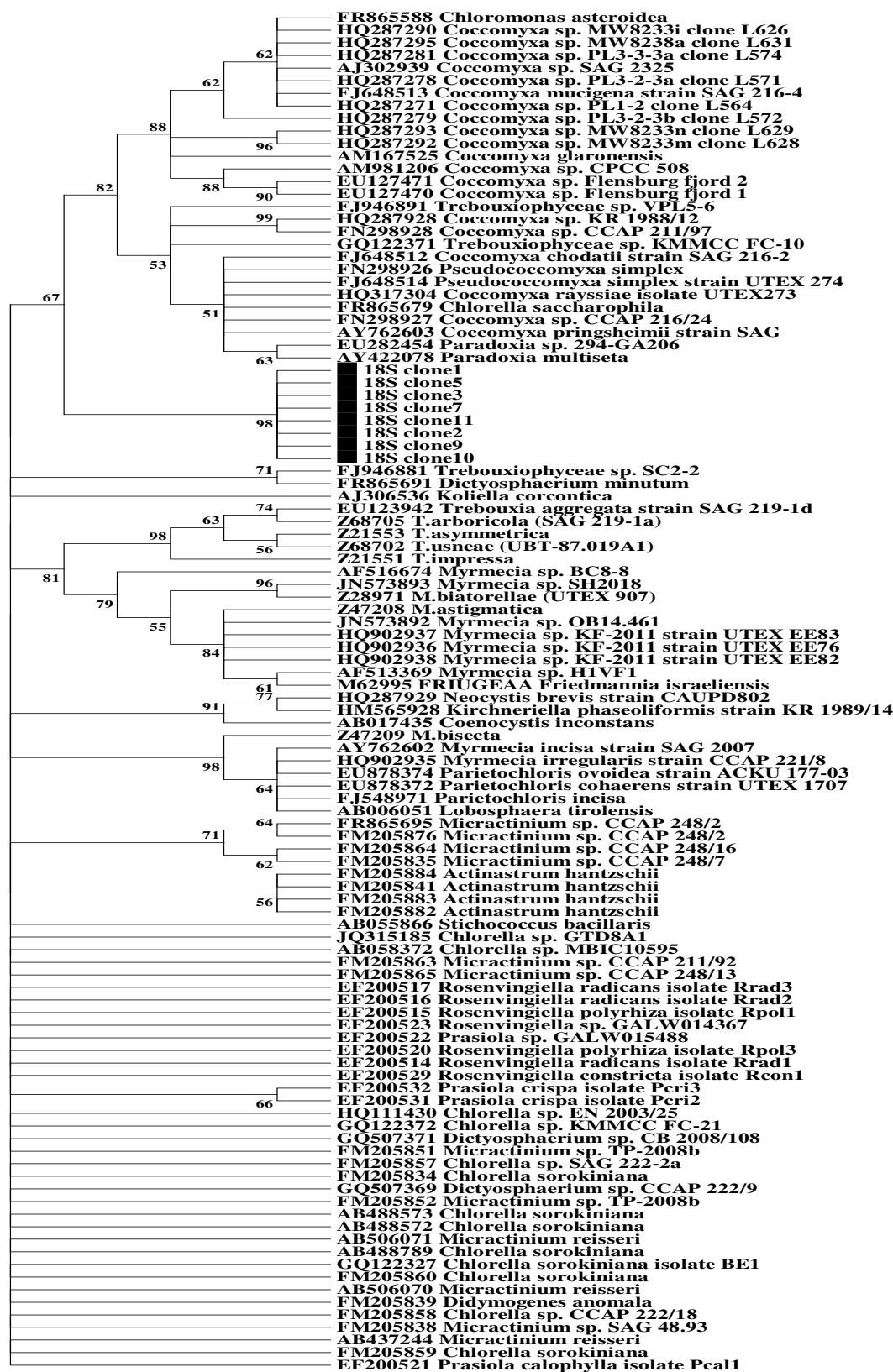


Figura 35 – Dendrograma (marcador filogenético 18S rDNA) de isolados do género *Coccomyxa*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining.

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

As sequências obtidas para o marcador molecular 23S rDNA mostraram quatro grupos de sequências diferentes, prevendo quatro organismos diferentes (anexo IV e V). Após o BLAST das sequências verificou-se que existiam duas microalgas e duas bactérias, em que cada microalga era acompanhada de uma bactéria. Os dendrogramas foram feitos com base nesta associação. Assim, os isolados de *Chlamydomonas* apresentam uma alfa-proteobactéria do gênero *Acidiphilium* (figura 36 e anexo IV) e os isolados de *Coccomyxa* apresentam uma beta-proteobactéria do gênero *Variovorax* (figura 37 e anexo V).

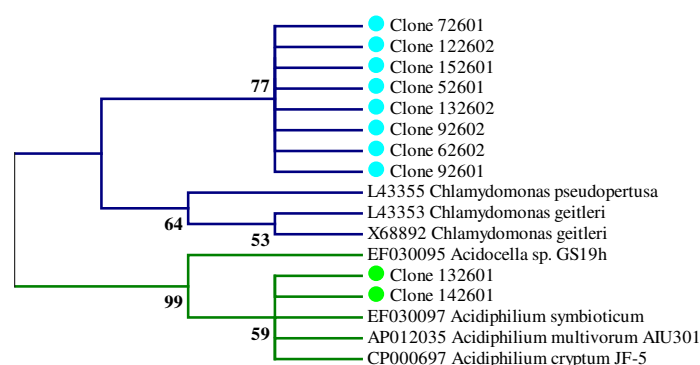


Figura 36 – Dendrograma (marcador molecular 23S) da cultura unialgal do gênero *Chlamydomonas*, obtido com o programa MEGA5 através do método de Neighbor-Joining. Os clones assinalados com ● são identificados como microalgas do gênero *Chlamydomonas* e os clones assinalados com ● são bactérias do gênero *Acidiphilium*.

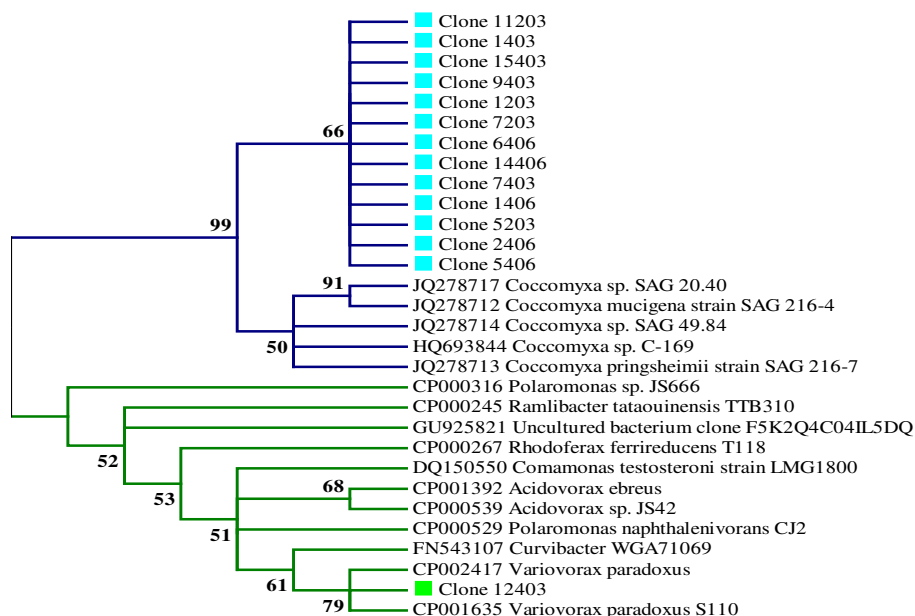


Figura 37 – Dendrograma (marcador molecular 23S) da cultura unialgal do gênero *Coccomyxa*. Os clones assinalados com ■ são identificados como microalgas do gênero *Coccomyxa* e o clone assinalado com ■ pertence ao gênero *Variovorax*.

5. Discussão

A tentativa de cultivar os organismos recolhidos, com a água ácida recolhida na ARD da AMA de S. Domingos, não retornou os resultados esperados. Verificou-se que o uso de água ácida não era a solução viável por dois motivos: i) seriam despendidas muitas horas na recolha de água e na sua filtração e ii) a composição da água altera ao longo do ano na quantidade de metais, o que requereria a análise desta, de cada vez que fosse recolhida, e como tal nunca teríamos um meio de cultivo sempre igual.

O uso de meios sintéticos facilita, em grande medida, o isolamento e cultivo de qualquer tipo de microalga. Sabe-se sempre a composição do meio, é de fácil obtenção, na maioria dos casos, e permite ajustar parâmetros para testar outras abordagens no crescimento do(s) organismo(s) em estudo. Os meios de cultura para organismos acidófilos podem ser adaptados de meios de cultura já existentes e testados (no cultivo de microalgas de água fresca, por exemplo), ajustando o pH e outros compostos que sejam necessários ao desenvolvimento do organismo.

O uso de meios sólidos em microalgas, com ou sem mobilidade, pode não ser o mais aconselhado, mas neste caso, se a quantidade de água disponível for a adequada, estas formam colónias que serão utilizadas para continuar o trabalho de isolamento. Nesta parte do trabalho usou-se 6g de agar, para cada litro de meio sólido, garantido que o meio gelificava, mas ficaria com uma disponibilidade de água superior à que normalmente ocorre em placas com meio sólido.

O isolamento de dois géneros de microalgas, com características morfológicas ligeiramente diferentes, comprovou que o riscado em placa não é de todo desajustado à obtenção de isolados de microalgas acidófilas. Os isolados de *Coccomyxa* são microalgas bentónicas sendo o meio sólido, neste caso específico, uma vantagem onde se possa cultivar este género de microalgas. Os isolados de *Chlamydomonas* ofereceram algumas dúvidas relativamente ao crescimento e isolamento em placa, no entanto verificou-se que este género também cresce em placa com meio sólido.

A identificação molecular confirmou as observações feitas ao microscópio, verificando-se que as culturas estavam unialgais, mas não estavam axénicas, pois foram identificados dois géneros de bactérias acompanhantes, um para cada isolado obtido. Na

III. Cultivo e identificação de isolados unialgais de eucariotas fototróficos acidófilos aquáticos

identificação molecular dos isolados de *Chlamydomonas* obteve-se um elevado número de sequências de organismos “não cultivados”, através da base de dados do GenBank, para o marcador molecular 18S rDNA, que não nos dá informação taxonómica. A tentativa de obter organismos cultivados para extração de DNA é importante de forma a completar as bases de dados existente e de forma a ter mais informação disponível que permita fazer comparações em investigações futuras. Nos isolados de *Coccomyxa* não se verificou a ocorrência de organismos “não cultivados” nas sequências obtidas para o marcador molecular 18S rDNA, existindo algumas espécies identificadas, mas nenhuma proveniente de ambientes com pH <3.

Ao observar a identificação obtida pelo marcador molecular 23S rDNA, verifica-se que neste marcador e para estes dois organismos também existem lacunas que devem ser preenchidas. Em ambos os isolados não se verificam organismos acidófilos identificados com este marcador. Relativamente às bactérias identificadas, existem organismos identificados com base no marcador molecular 23S rDNA, provenientes de outros estudos, com identidade máxima elevada. O clone 12403 apresentou 100% de identidade máxima com a bactéria *Variovorax paradoxus*, e os clones 132601 e 142601 tinham 99% de identidade máxima com as bactérias do género *Acidiphilium*.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa sp.*

1. Introdução

Em culturas, em que não há renovação do meio de cultura (sistema fechado), verifica-se que os organismos têm um comportamento de crescimento dividido por fases (figura 38). Inicialmente ocorre uma fase de adaptação (fase lag), em que os organismos se aclimatizam havendo ou não uma ligeira diminuição dos mesmos. Depois há uma fase de aceleração seguida de uma fase de crescimento exponencial onde há crescimento à taxa máxima. Na fase exponencial é possível calcular a taxa de crescimento (μ) da cultura através da equação 5, e o tempo de duplicação (t_d) através da equação 6.

$$\mu = \frac{\ln(N_t/N_0)}{(t_t - t_0)} \text{ (equação 5)}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (equação 6)}$$

Quando o meio de cultura começa a ficar saturado, quer de células, quer de metabolitos excretados por estas, ocorre uma fase de abrandamento e posteriormente uma fase estacionária onde a taxa de crescimento é igual à taxa de morte celular. Quando a cultura esgota as fontes de nutrientes ocorre morte celular.

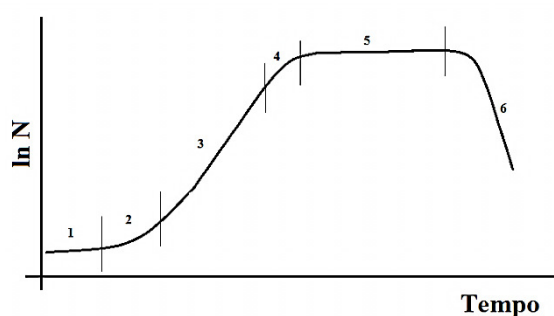


Figura 38 – Curva teórica de crescimento de uma cultura em sistema fechado. Legenda: 1-fase lag; 2-fase de aceleração; 3-fase exponencial; 4-fase de abrandamento; 5-fase estacionária e 6-morte celular.

Algumas características morfológicas são variáveis e dependentes das condições a que os organismos estão sujeitos, como é o caso da temperatura e da luz. Como os organismos fototróficos dependem da luz, para poderem proceder à fotossíntese, este é um parâmetro

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

muitas vezes usado como objeto de variação para estudos, tendo em vista a determinação da melhor intensidade luminosa assim como os ciclos luz:escuro a usar, se estes forem a melhor opção (Cuaresma *et al.*, 2011; Karsten e Holzinger, 2012). A fonte de azoto ou de carbono, presente no meio de cultura, influenciam o tipo de carotenoide produzido pela microalga como demonstram os artigos de Casal *et al.* (2011) e Cuaresma *et al.* (2011). A produção de carotenoides é um ponto de interesse biotecnológico que importa otimizar.

Os metais podem interferir na morfologia e na estrutura das células, alterando a forma, o volume, a presença ou ausência de parede celular ou mesmo mucilagem (Sabatini *et al.*, 2009). O cobre é um metal essencial para a fotossíntese, no entanto em concentrações elevadas é tóxico para a maioria das espécies de microalgas. A toxicidade impõe muitas vezes stress oxidativo nas células. Como já foi referido, os organismos de AMD convivem com estas condições, pelo que será de esperar que possuam mecanismos de resistência, quer a nível genético, quer a nível metabólico, que são importantes conhecer. O efeito tóxico advém da presença do catião livre (Cu^{2+}), que catalisa as reações de Fenton, ou seja, permite a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). O aumento de ROS gera um maior risco de danos nas membranas. Os cloroplastos são constituídos por membranas ricas em ácidos gordos poli-insaturados e são um alvo de peroxidação. Como consequência ocorre diminuição da quantidade de clorofila e pigmentos acessórios, aumento da peroxidação lipídica e diminuição da taxa de crescimento (Sabatini *et al.*, 2009).

Uma forma das células diminuírem a formação de ROS é controlarem o aporte de cobre. Estas podem complexar o metal com diferentes ligandos dentro ou fora da célula ou armazená-lo em vacúolos (Sabatini *et al.*, 2009).

A produção de enzimas como a catalase, glutathione peroxidase ou a superóxido dismutase permite à célula diminuir a quantidade de ROS. A produção de carotenoides e de glutathione na forma reduzida, entre outros compostos permitem às células reduzir a maior parte dos ROS (Sabatini *et al.*, 2009).

Como já foi referido, a presença de ROS leva à ocorrência de peroxidação lipídica. O nível de peroxidação lipídica pode ser determinado com o recurso a compostos que se formam na célula, como por exemplo, o malondialdeído (MDA). Este é um composto final que resulta de uma via secundária da oxidação de ácidos gordos poli-insaturados quer por auto-oxidação, quer por degradação enzimática. Na determinação do MDA, cada molécula reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um composto num tom rosa-

avermelhado que absorve no comprimento de onda de 532 nm (Hodges *et al.*, 1999, Sabatini *et al.* 2009). Quanto mais intensa for a cor, maior a quantidade de MDA e por isso maior o índice de peroxidação lipídica nas células. O método de determinação do MDA requer um fator de correção, pois compostos como as antocianinas e os hidratos de carbono interferem com as leituras a 532 nm provocando a sobrestimação do MDA. Estudos realizados por Hodges *et al.* (1999) e Taulavuori *et al.* (2001) comprovam esta sobrestimação. Os extratos são lidos a três comprimentos de onda, nomeadamente, 532 nm onde ocorre a absorção do complexo TBA-MDA, 440 nm onde ocorre absorção das substâncias que interferem com o valor real do MDA e 600 nm que permite a correção das leituras devido à turbidez. Para além destas correções, é necessário verificar a absorvência do extrato, a 532 nm, com TBA e sem TBA.

2. Objetivo

Neste capítulo pretendeu-se estudar a curva de crescimento de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.; avaliar os pigmentos produzidos durante a curva de crescimento e avaliar a resposta da microalga a situações de stress oxidativo.

De forma a cumprir os objetivos referidos, foram traçados os seguintes objetivos específicos: i) testar duas condições de luz, ii) testar diferentes valores de pH e iii) testar duas fontes de azoto. Além destes, e para testar o stress oxidativo, na célula, foram usadas duas concentrações de cobre de forma a verificar o nível de produção de compostos secundários de peroxidação lipídica, por acumulação de MDA nas células.

3. Metodologia

3.1. Curva de crescimento

3.1.1. Teste dos isolados obtidos

Os isolados obtidos (*Coccomyxa* sp. e *Chlamydomonas* sp.) foram testados durante três semanas, observando a sua tendência de crescimento em duas condições de luz.

Para cada cultura foram inoculados 6 frascos de cultura com um volume de 100 ml cada. Usou-se 5 ml de inóculo com 95 ml de meio MK. Os frascos de cultura, com tampas com filtro para permitir as trocas gasosas, foram colocados na posição horizontal para aumentar a superfície de contacto com o ar. Três frascos foram expostos a intensidade luminosa mais elevada ($95.79 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) e os outros três foram expostos a intensidade luminosa mais baixa ($48.97 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), com temperatura constante ($25\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$).

Foram recolhidos 300 μL de cada replicado das culturas e colocados numa placa de 96 poços, estéril e descartável (Sarstedt, Alemanha), para leitura a diferentes comprimentos de onda. Esta iniciou-se a 300 nm e terminou a 850 nm, com intervalos de 10 em 10 nm, de modo a ter os comprimentos de onda correspondentes aos pigmentos fotossintético e outros componentes que fossem de interesse. As leituras foram realizadas três vezes por semana.

3.1.2. Isolado de *Coccomyxa* sp.

3.1.2.1. Inóculo

A cultura de *Coccomyxa* sp. foi escolhida para realizar estudos fisiológicos de influência da luz, do pH e da fonte de azoto (nitrato ou ureia). Esta escolha foi proporcionada por um crescimento mais homogêneo e ausência de um ciclo de vida dimórfico.

Com o objetivo de seguir a curva de crescimento durante 30 dias, optou-se por aumentar o volume de inóculo para 150 ml por frasco de cultura. Assim, inocularam-se 24 frascos de cultura distribuídos de acordo com a tabela VIII. O meio MK foi preparado como descrito no anexo I, o pH foi acertado a 2.5 ± 0.5 para um dos meios e a 6.5 ± 0.5 para o outro meio. O meio MKU foi preparado de acordo com o anexo citado anteriormente, mas a fonte

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

de azoto foi alterada, ou seja, o nitrato de potássio foi substituído por ureia, na mesma concentração de azoto e o pH foi acertado a 7.0 ± 0.5 .

Tabela VIII – Número de frascos inoculados por cada meio de cultura a testar.

	Meio MK		Meio MKU
pH	2.5±0.5	6.5±0.5	7.0±0.5
Número de frascos de cultura	8	8	8

De forma a garantir um inóculo representativo procedeu-se a contagem celular, utilizando uma câmara de Neubauer, da cultura de *Coccomyxa* sp., no microscópio Leitz DMLB, referido anteriormente. Para que cada frasco de cultura tivesse um inóculo de 5×10^5 células.ml⁻¹ (López-Elías *et al.*, 2011), a cultura foi diluída 10 vezes, obtendo um volume de 400 ml para inocular os 24 frascos.

Para cada grupo de oito frascos foram necessários 1080 ml de meio de cultura e 120 ml de inóculo. De forma a distribuir uniformemente pelos oito frascos, optou-se por misturar tudo num erlenmeyer de 2000 ml, previamente estéril, e verter 150 ml em cada frasco de cultura.

Os frascos de cultura foram colocados na posição horizontal para permitir uma maior superfície de contacto com o ar. Como referido anteriormente, os frascos para a realização desta tarefa tinham tampas com filtro hidrofóbico, permitindo as trocas gasosas com o exterior, no entanto não permitiam a entrada de microrganismos pois apresentam um poro de 0.2 µm.

Durante os primeiros sete dias de crescimento, as culturas estiveram acondicionadas na intensidade luminosa mais baixa ($48.97 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$), de forma a aclimatarem-se às novas condições. Após os sete dias, cada grupo de oito frascos de cada tratamento foi dividido, ou seja, quatro ficaram a intensidade luminosa baixa ($48.97 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) e quatro ficaram a intensidade luminosa alta ($95.79 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$).

3.1.2.2. Contagem celular, pigmentos, pH e observação ao microscópio

As contagens celulares e a extração dos pigmentos foram feitas três vezes por semana, durante os 30 dias da curva de crescimento.

Em cada dia foram retirados 1.5 ml de cada replicado. Este volume foi usado para extrair pigmentos, para as contagens celulares e para medir o pH. A observação das células ao microscópio foi feita uma vez por semana, no microscópio Leitz DMLB referido precedentemente.

As contagens celulares foram feitas no microscópio de contraste de fase (Laborlux K - Leitz) com o recurso a uma câmara de Bürker. De cada replicado foram feitas duas contagens na câmara, com 6 campos cada (figura 39).

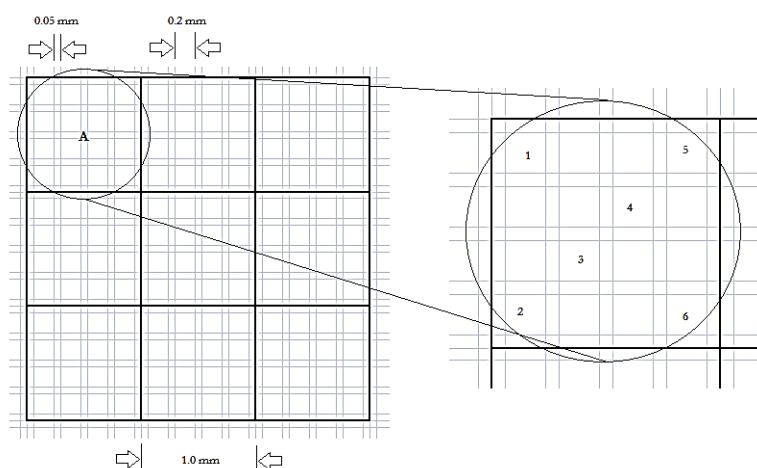


Figura 39 – Quadrícula da Câmara de Bürker com nove quadrados A, e cada um destes está dividido em 16 quadrados B. A contagem das células foi feita de acordo com o seguimento dos números de 1 a 6.

O número de células por mililitro foi calculado de acordo com a equação 7.

$$\text{número de células} = \frac{(n1+n2+n3+n4+n5+n6)}{l \times l \times h \times n^9 \text{ quadrados}} \times 1000 \text{ (equação 7)}$$

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

As variáveis n_1 até n_6 correspondem ao número de células de cada quadrado assinalado na figura 39, “l” é a largura do quadrado e “h” a profundidade; o “n° quadrados” refere-se ao número de quadrados contados e “1000” é o fator de conversão para mililitro.

Para a extração dos pigmentos usou-se 1.0 ml que foi dividido (500 μ l para cada tubo) e centrifugado durante 5 minutos a 10000xg. O meio foi descartado, juntou-se 500 μ l de DMSO a cada tubo, agitou-se no vortex e colocou-se na estufa a 65°C durante 10 minutos. Os tubos foram guardados a -20°C até à leitura. Os pigmentos foram lidos no leitor de placas (Biotek Synergy 4 microplate reader) numa amplitude de comprimentos de onda entre os 400 e os 700 nm de 2 em 2 nm. Durante a extração e determinação dos pigmentos tentou-se que não houvesse exposição à luz. Para determinar as quantidades de clorofila **a** (equação 8), clorofila **b** (equação 9) e carotenoides (equação 10) foram usadas as equações descritas por Wellburn em 1994 (Wellburn 1994).

$$clr\ a = (12.19 \times A_{664nm}) - (3.45 \times A_{648nm}) \text{ (equação 8)}$$

$$clr\ b = (21.99 \times A_{648nm}) - (5.32 \times A_{664nm}) \text{ (equação 9)}$$

$$carotenoides = \frac{(1000 \times A_{480\ nm}) - (2.14 \times clr\ a) - (70.16 \times clr\ b)}{220} \text{ (equação 10)}$$

3.2. Indução de stress oxidativo

3.2.1. Inóculo

Inoculou-se 24 frascos de cultura com volume final de 100 ml de cultura de *Coccomyxa* sp., para que o número de células fosse equivalente ao que existiria na fase do crescimento exponencial. Preparou-se doze frascos com meio MK pH 2.5 \pm 0.5 e doze frascos com meio MK pH 6.5 \pm 0.5. O procedimento da tarefa está descrito na figura 40 e foi realizado para ambos os meios referidos previamente.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

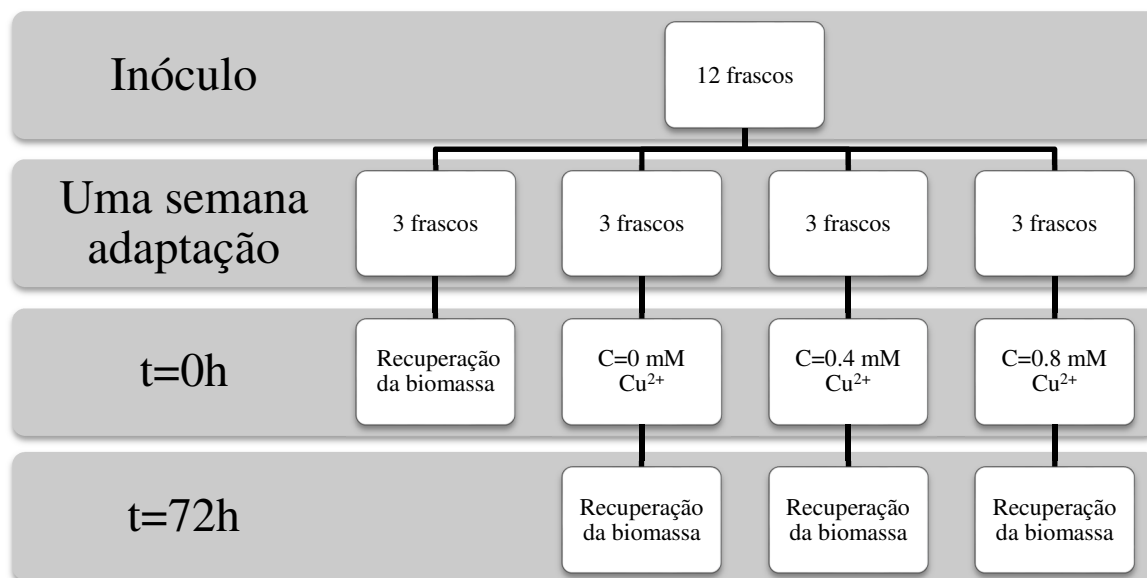


Figura 40 – Esquema do trabalho para determinar o parâmetro MDA que permite verificar o stress oxidativo provocado pelo sulfato de cobre.

A extração de pigmentos e a sua determinação foi feita como referido anteriormente, neste capítulo.

O volume de cada frasco de cultura foi recolhido em tubos Falcons de 50 ml. Os tubos foram centrifugados (Multifuge 3S-R Heraeus) a 6000xg, durante 20 minutos, com 10°C de temperatura, permitindo concentrar a biomassa. O meio de cultura foi descartado deixando apenas um pequeno volume (< 1.5 ml) no fundo juntamente com a biomassa. Para determinar o peso fresco das amostras pesaram-se tubos de 2.0 ml, um por cada frasco de cultura. A biomassa e o pequeno volume de meio que ficou no tubo Falcon foram transferidos, com o recurso a uma pipeta, para o tubo de 2.0 ml. Estes foram outra vez centrifugados (Centrifuge 5415 R) a 6000xg, durante 20 minutos, a 10°C. O meio de cultura foi descartado totalmente. Os tubos foram pesados novamente para determinar o peso fresco da biomassa e congelados a -20°C.

3.2.2. Determinação de MDA

A determinação do MDA permitiu perceber se as células estiveram sob stress oxidativo. O método usado foi o proposto por Hodges, DeLong, Forney, & Prange, 1999.

As 24 amostras foram descongeladas no escuro. Estas foram extraídas com etanol:água 80:20 (v:v), usando-se 1.5 ml. Agitou-se no vortex até não se verificar a presença de aglomerados e colocou-se em gelo. Depois de todas as amostras estarem tratadas foram de novo agitadas no vortex e centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos.

A determinação do teor de MDA foi feita com duas soluções. Solução A constituída por ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.65% (p/v) e hidroxitolueno butilato (BTH) 0.01% (p/v) e a solução B constituída por TCA 20% (p/v) e BTH 0.01% (p/v).

O esquema da figura 41 explica sucintamente o procedimento do extrato obtido e a adição das duas soluções para uma amostra, sendo repetido para todas as amostras de forma igual. O “tubo 1” e o “tubo 2” funcionaram como replicados e o “tubo 3” foi usado para fazer a correção do valor de MDA.

Tubo 1 Amostra 1	Tubo 2 Amostra 1	Tubo 3 Amostra 1
<ul style="list-style-type: none">• 300 µl de solução A• 300 µl de extrato	<ul style="list-style-type: none">• 300 µl de solução A• 300 µl de extrato	<ul style="list-style-type: none">• 300 µl de solução B• 300 µl de extrato

Figura 41 – Volumes de cada solução e de extrato para cada amostra a determinar o teor de MDA.

Os tubos foram agitados no vortex e colocados num banho térmico a 90°C durante 25 minutos (na hotte). Posteriormente foram arrefecidos em gelo durante 15 minutos, novamente agitados no vortex e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Foram recolhidos 200 µl de sobrenadante de cada tubo para leitura numa placa de 96 poços (Sarstedt, Alemanha). Os poços foram lidos a três comprimentos de onda (λ) diferentes, nomeadamente 440 nm, 532 nm e 600nm, no leitor de placas (Biotek Synergy 4 microplate reader), para depois se proceder aos cálculos.

3.2.3. Cálculos

O teor de MDA foi calculado utilizando as equações de Hodges *et al.*, 1999. Para determinar esta quantificação em nmol por grama de peso fresco a partir do valor de equivalente de MDA usou-se a equação 11.

$$\text{equivalentes de MDA (nmol. ml}^{-1}\text{)} = A - \frac{B}{157000} \times 10^6 \text{ (equação 11)}$$

O valor de A e B que figuram na equação anterior foram calculados de acordo com a equação 12 e 13.

$$A = (\text{Abs532}_{+TBA} - \text{Abs600}_{+TBA}) - (\text{Abs532}_{-TBA} - \text{Abs600}_{-TBA}) \text{ (equação 12)}$$

$$B = (\text{Abs440}_{+TBA} - \text{Abs600}_{+TBA}) \times 0.0571 \text{ (equação 13)}$$

Com todos os parâmetros encontrados, utilizou-se a equação 14 para calcular o valor de MDA por grama de peso fresco, como referido anteriormente. O volume presente na equação 14 corresponde ao volume de extração (Ve), em ml.

$$\text{equivalentes de MDA (nmol. g}^{-1}\text{p f)} = \text{equivalentes de MDA (nmol. ml}^{-1}\text{)} \times Ve \times \frac{1}{p f} \text{ (equação 14)}$$

4. Resultados

4.1. Curva de crescimento

4.1.1. Isolados obtidos

O primeiro experimento realizado para ver o desenvolvimento das curvas de crescimento, de dois isolados unialgais, teve a duração de três semanas. No final deste período, os triplicados, expostos a uma intensidade luminosa mais baixa, da cultura do género *Chlamydomonas* sp. evidenciavam uma maior quantidade de pigmentos fotossintéticos, contrariamente aos triplicados expostos à intensidade luminosa mais elevada (figura 42 A). Os triplicados da cultura do género *Coccomyxa* sp. não apresentavam uma evidência acentuada na diferença de cor da cultura (figura 42 B).

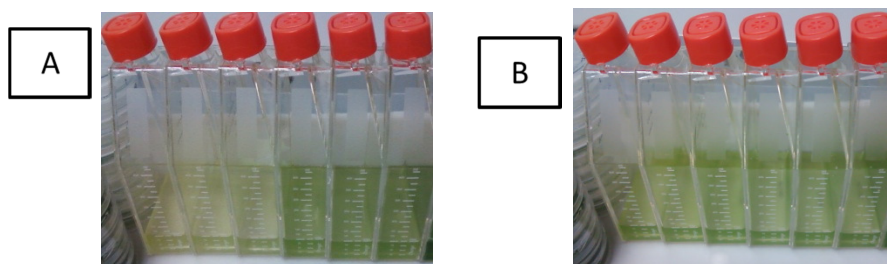


Figura 42 – Triplicados das culturas unialgais no final da curva de crescimento. **A.** Cultura de microalgas do género *Chlamydomonas* sp.; 3 primeiros replicados sujeitos a intensidade luminosa elevada, 3 últimos replicados expostos à intensidade luminosa mais baixa. **B.** Cultura de microalgas do género *Coccomyxa* sp., 3 primeiros replicados sujeitos a intensidade luminosa elevada, 3 últimos replicados expostos à intensidade luminosa mais baixa.

As curvas de crescimento das culturas permitiram perceber que a exposição à luz mais intensa não teve, aparentemente, o mesmo efeito nas duas culturas. A cultura de microalgas do género *Coccomyxa* sp. apresentou uma densidade ótica (DO), a 680 nm, maior para a curva exposta à intensidade luminosa mais elevada, do que para a curva onde a intensidade luminosa é mais baixa (figura 43 A).

Na cultura de microalgas do género *Chlamydomonas* sp. observou-se uma inversão das curvas de crescimento. Esta microalga apresenta uma DO, a 680 nm, mais elevada para a

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

curva que corresponde ao grupo de triplicados que estava exposto a uma intensidade luminosa mais baixa (figura 43 B).

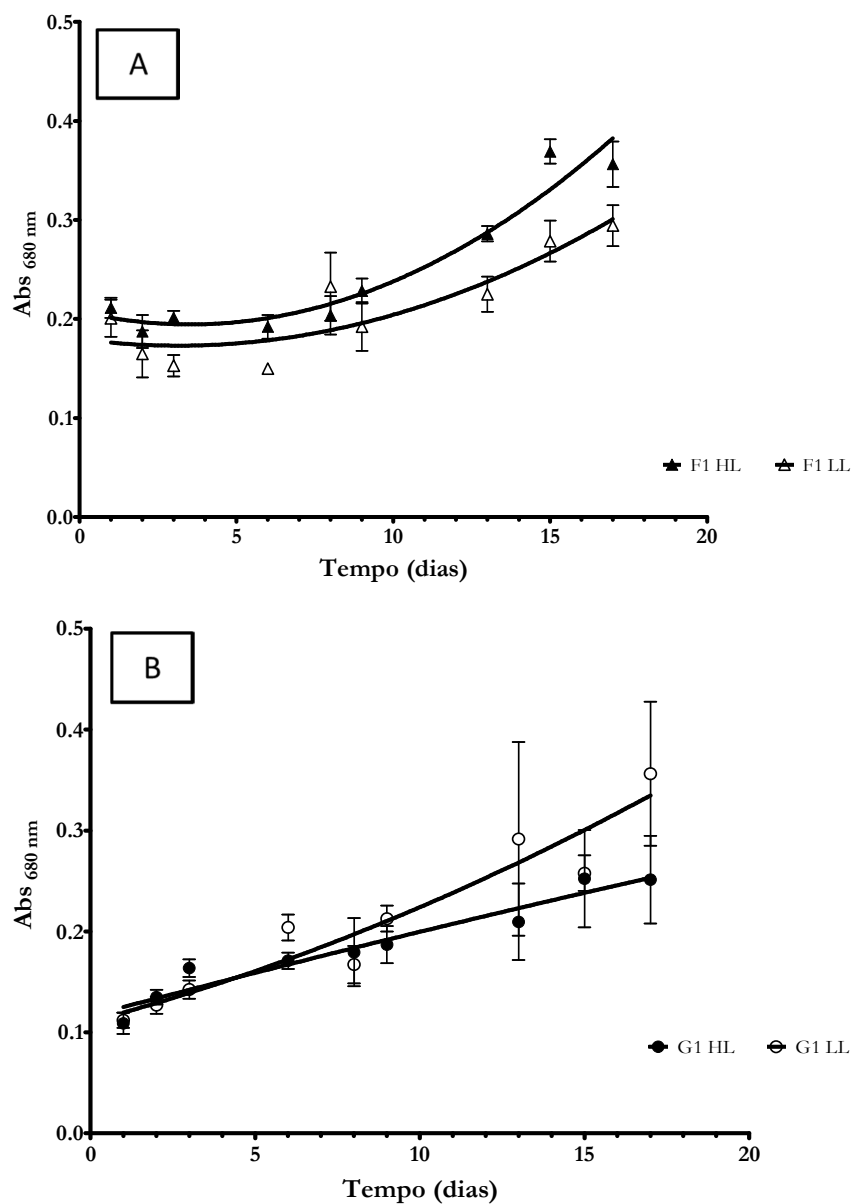


Figura 43 – Curvas de crescimento de isolados unialgais. **A.** ▲ Cultura *Coccomyxa* sp., intensidade luminosa alta; △ Cultura *Coccomyxa* sp., intensidade luminosa baixa; **B.** ● Cultura *Chlamydomonas* sp., intensidade luminosa alta; ○ Cultura *Chlamydomonas* sp., intensidade luminosa baixa.

4.2. Estudo fisiológico de um isolado de *Coccomyxa*.

4.2.1. Curva de crescimento

4.2.1.1. Biomassa

A curva de crescimento decorreu durante 30 dias e permitiu observar parâmetros fisiológicos das células quando se alterou a disponibilidade de luz, o pH e a fonte de azoto.

O aumento de biomassa foi verificado pela contagem celular. Verificou-se que a microalga *Coccomyxa* sp. manteve a tendência de aumentar a biomassa quando estava exposta a intensidades luminosas mais elevadas. A influência do pH no aumento da biomassa foi confirmada através do meio MK a pH 2.5 e a pH 6.5. Verificou-se neste parâmetro que as células dividiram-se mais, obtendo-se um número maior de células no meio MK pH 6.5 do que no meio MK pH 2.5.

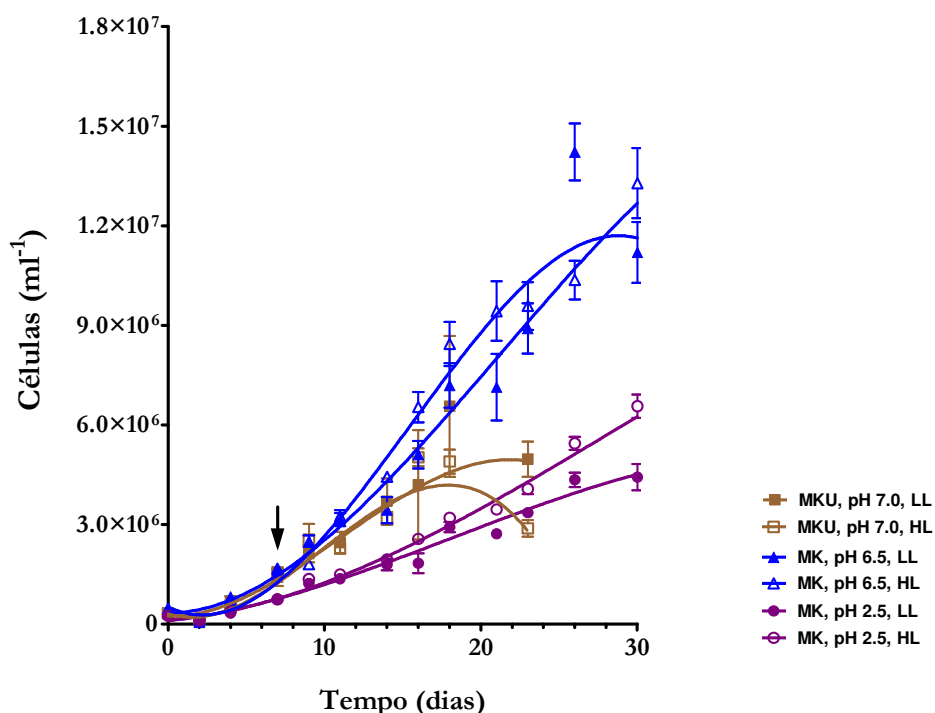


Figura 44 – Curvas de crescimento da microalga *Coccomyxa* sp. a diferentes condições de luz, pH e fonte azoto. ■ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; □ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta; ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta. A seta indica o dia em que as culturas foram separadas, ou seja, metade dos replicados ficaram a luz de intensidade baixa e a outra metade foi colocada a intensidade luminosa alta.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

Com base nas curvas de crescimento efetuou-se o cálculo da taxa de crescimento máxima através da equação 5 para cada tratamento entre o sétimo dia e o trigésimo dia. A taxa máxima de crescimento ocorre entre o sétimo e o nono dia para todos os tratamentos, com exceção do meio MK a pH 6.5 na intensidade luminosa mais elevada, que tem a taxa máxima de crescimento entre o nono e o décimo primeiro dia. O tempo de duplicação foi calculado com a equação 6 usando a taxa máxima de crescimento (tabela IX).

Tabela IX – Taxa de crescimento média, taxa máxima de crescimento e tempo de duplicação para a microalga *Coccomyxa* sp. nos diferentes tratamentos.

	MK pH 2.5		MK pH 6.5		MKU pH 7.0	
	LL	HL	LL	HL	LL	HL
Taxa de crescimento média (dia⁻¹)	0.061	0.075	0.071	0.095	0.061	0.009
Taxa máxima de crescimento (dia⁻¹)	0.347	0.432	0.316	0.425	0.298	0.351
Tempo de Duplicação (dia)	2.0	1.6	2.2	1.6	2.3	2.0

Observando as células ao microscópio foi possível verificar a presença de lípidos por reação com o corante azul do Nilo. Verificou-se a existência de células (figuras 45, 46 e 47) com estruturas lipídicas em todos os meios utilizados nesta parte do trabalho, no entanto, o meio MK pH 6.5 evidenciou um menor número de células com estas estruturas lipídicas (figura 47 C).

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

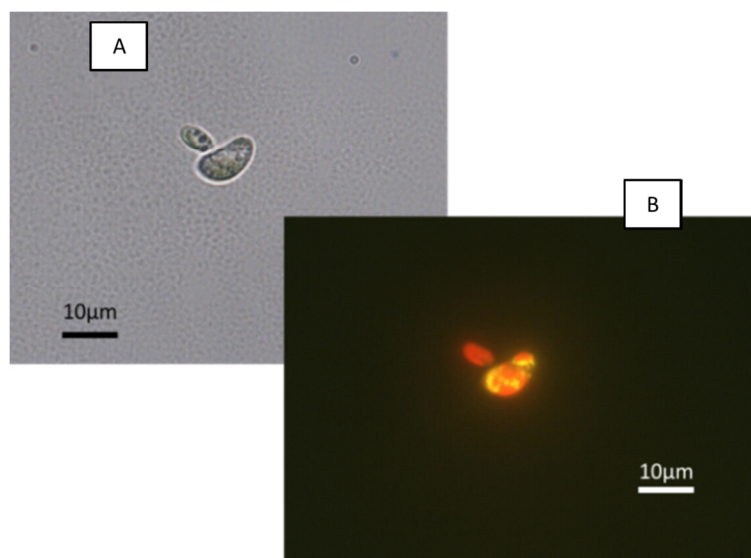


Figura 45 – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MK a pH 2,5. **A.** microscopia de campo claro, **B.** microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo.

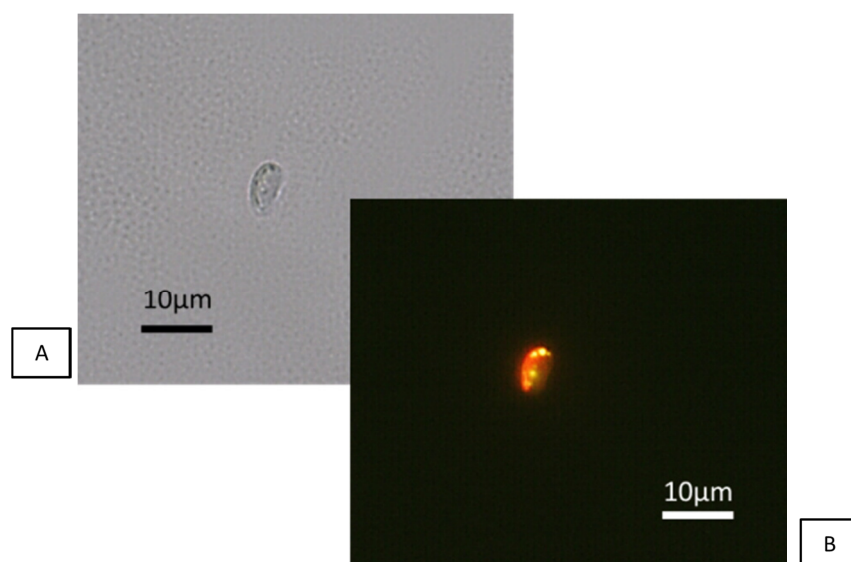


Figura 46 – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MKU a pH 7.0. **A.** microscopia de campo claro, **B.** microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

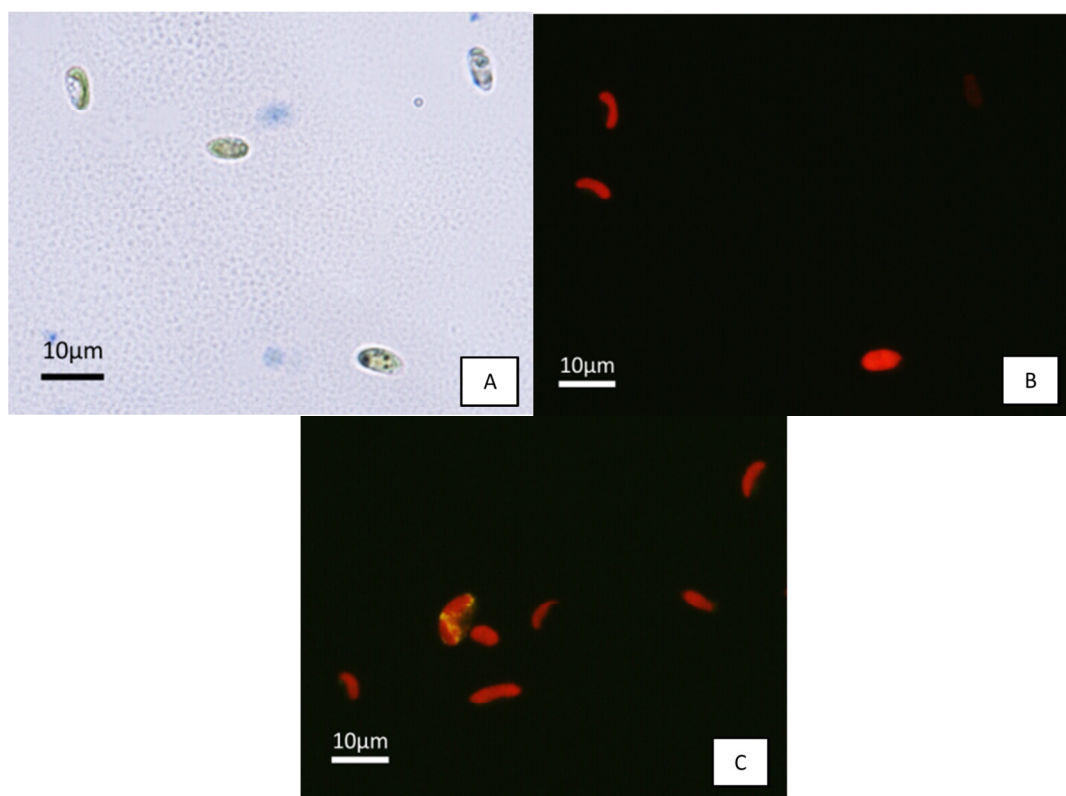


Figura 47 – Células de microalga *Coccomyxa* sp. em cultura em meio MK a pH 6.5. **A.** microscopia de campo claro. **B.** microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho. **C.** microscopia de epifluorescência com filtro azul, cloroplasto a vermelho e estruturas lipídicas a amarelo.

A cultura de *Coccomyxa* sp. com meio MKU pH 7.0 evidenciou células com uma forma mais redonda do que as que se observavam nos outros dois meios de cultura. As células foram medidas para verificar o volume celular (figura 48 A) e a relação entre o eixo maior e o eixo menor (figura 48 B).

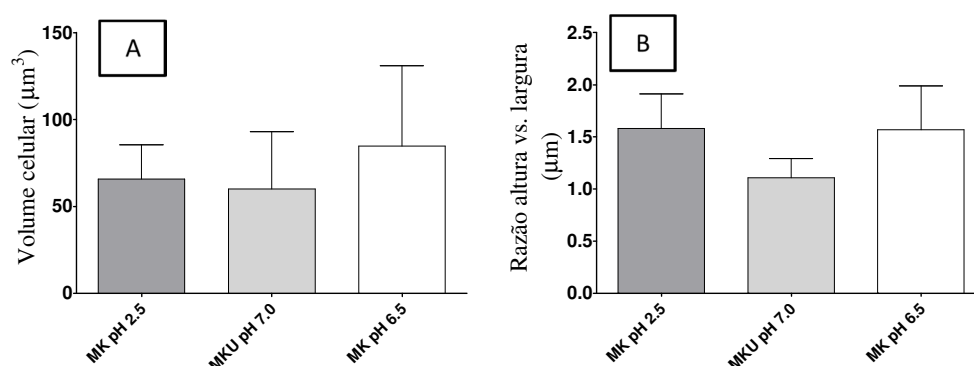


Figura 48 – Volume celular (A) e a razão entre a altura e a largura (B) das células de *Coccomyxa* sp. dos três meios de cultura para a intensidade luminosa baixa.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

Com o intuito de analisar a significância deste resultado foi aplicado um teste estatístico One-wayANOVA utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Utilizou-se um teste (teste de comparação múltiplo de Tukey) que permite comparar os diferentes tratamentos com um intervalo de confiança de 99%. O volume celular não apresenta diferença significativa nas médias e o teste aplicado para comparar os tratamentos (tabela X) também não retornou significância.

Tabela X – Teste de comparação múltiplo de Tukey para o volume celular, nos diferentes tratamentos para a intensidade luminosa baixa.

Teste comparativo	P < 0.01
MK pH 2.5 vs MKU pH 7.0	Não
MK pH 2.5 vs MK pH 6.5	Não
MKU pH 7.0 vs MK pH 6.5	Não

A diferença da média para a razão entre os eixos maior e menor das células é significativa, com $P < 0.001$. O teste de comparação aplicado aos diferentes tratamentos (tabela XI) mostrou que a cultura em meio MKU a pH 7.0 teve uma média significativamente diferente em relação às culturas em meio MK a pH 2.5 e 6.5. No entanto, as culturas em meio MK (pH 2.5 e 6.5) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela XI – Teste de comparação múltiplo de Tukey para a relação altura vs. altura, nos diferentes tratamentos para a intensidade luminosa baixa.

Teste comparativo	P < 0.01
MK pH 2.5 vs. MKU pH 7.0	Sim (***)
MK pH 2.5 vs. MK pH 6.5	Não
MKU pH 7.0 vs. MK pH 6.5	Sim (***)

Assim, o biovolume não apresentou alteração quando comparados os diferentes tratamentos para a intensidade luminosa baixa, mas o tamanho/forma das células foi alterado quando se comparou os diferentes tratamentos usados.

4.2.1.2. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram seguidos ao longo do tempo que decorreram as curvas de crescimento, três vezes por semana, em conjunto com as contagens celulares. A extração foi feita em DMSO e usou-se as equações descritas anteriormente para calcular as concentrações de clorofila *a* e *b*, e a concentração de carotenoides. Observou-se o aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos em geral, no entanto as culturas em meio MK a pH 2.5 (figura 49) e em meio MKU (figura 50) a pH 7.0 tiveram menor concentração de cada um dos pigmentos em relação às culturas em meio MK a pH 6.5 (figura 51). A variação da intensidade luminosa, dentro do mesmo meio de cultura, não pareceu ter uma influência grande na diferença da concentração de pigmentos, mas verificou-se que o aparecimento de concentrações mensuráveis de carotenoides ocorreu mais cedo no meio exposto à intensidade luminosa mais elevada.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

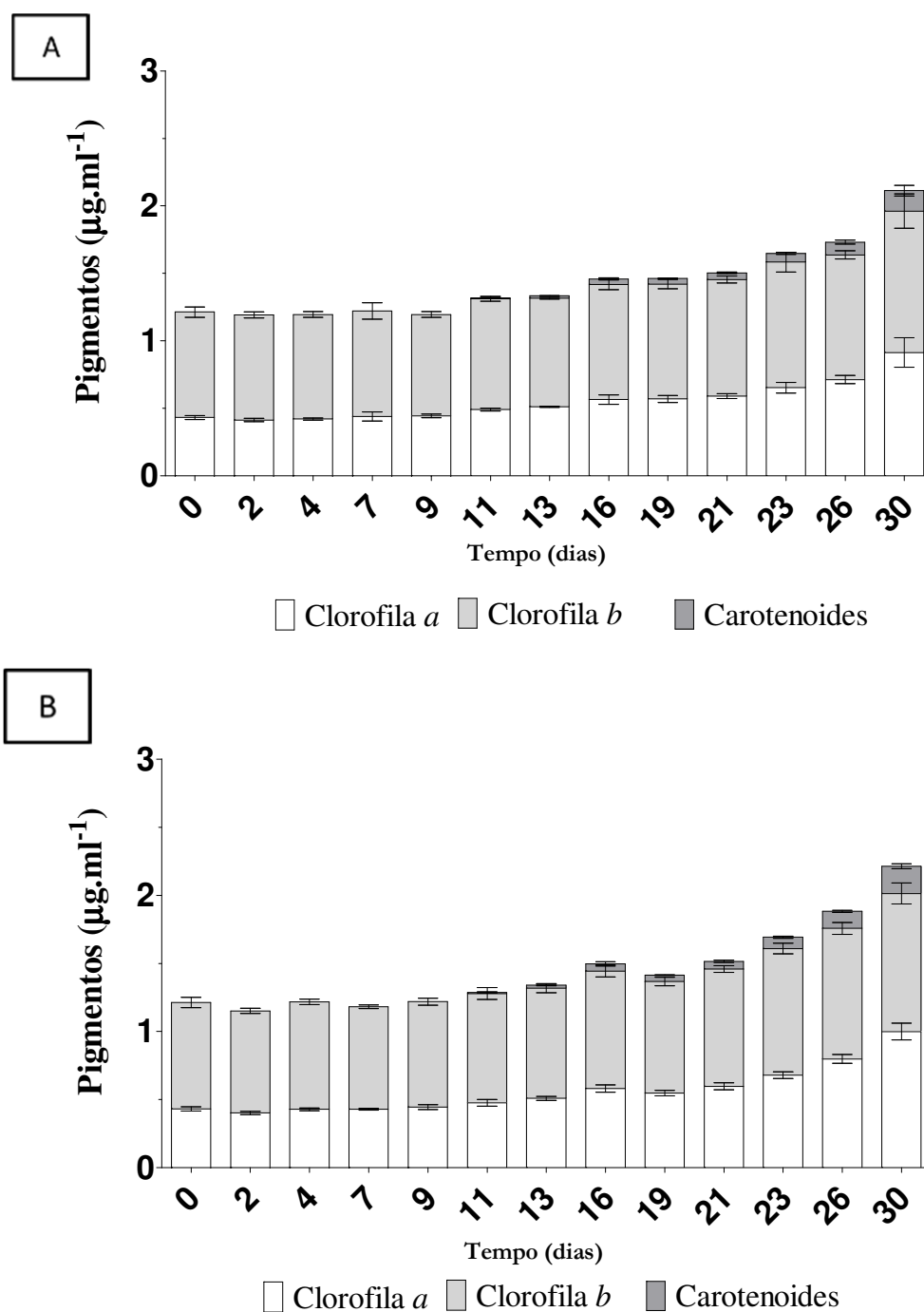


Figura 49 – Pigmentos fotossintéticos, extraídos com DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MK a pH 2.5. **A.** Intensidade luminosa baixa. **B.** Intensidade luminosa alta.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

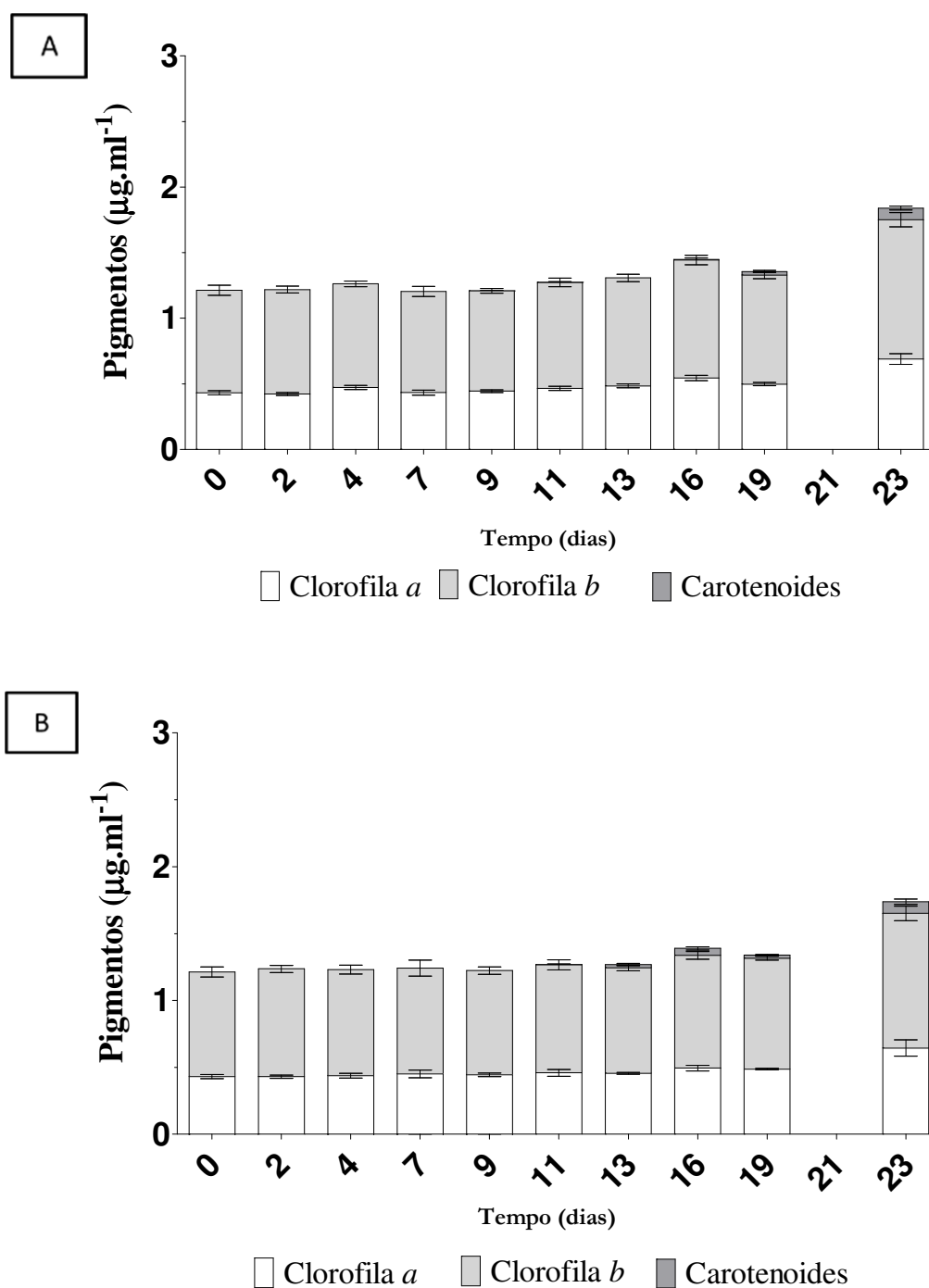


Figura 50 – Pigmentos fotossintéticos, extraídos em DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MKU a pH 7.0. **A.** Intensidade luminosa baixa. **B.** Intensidade luminosa alta.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

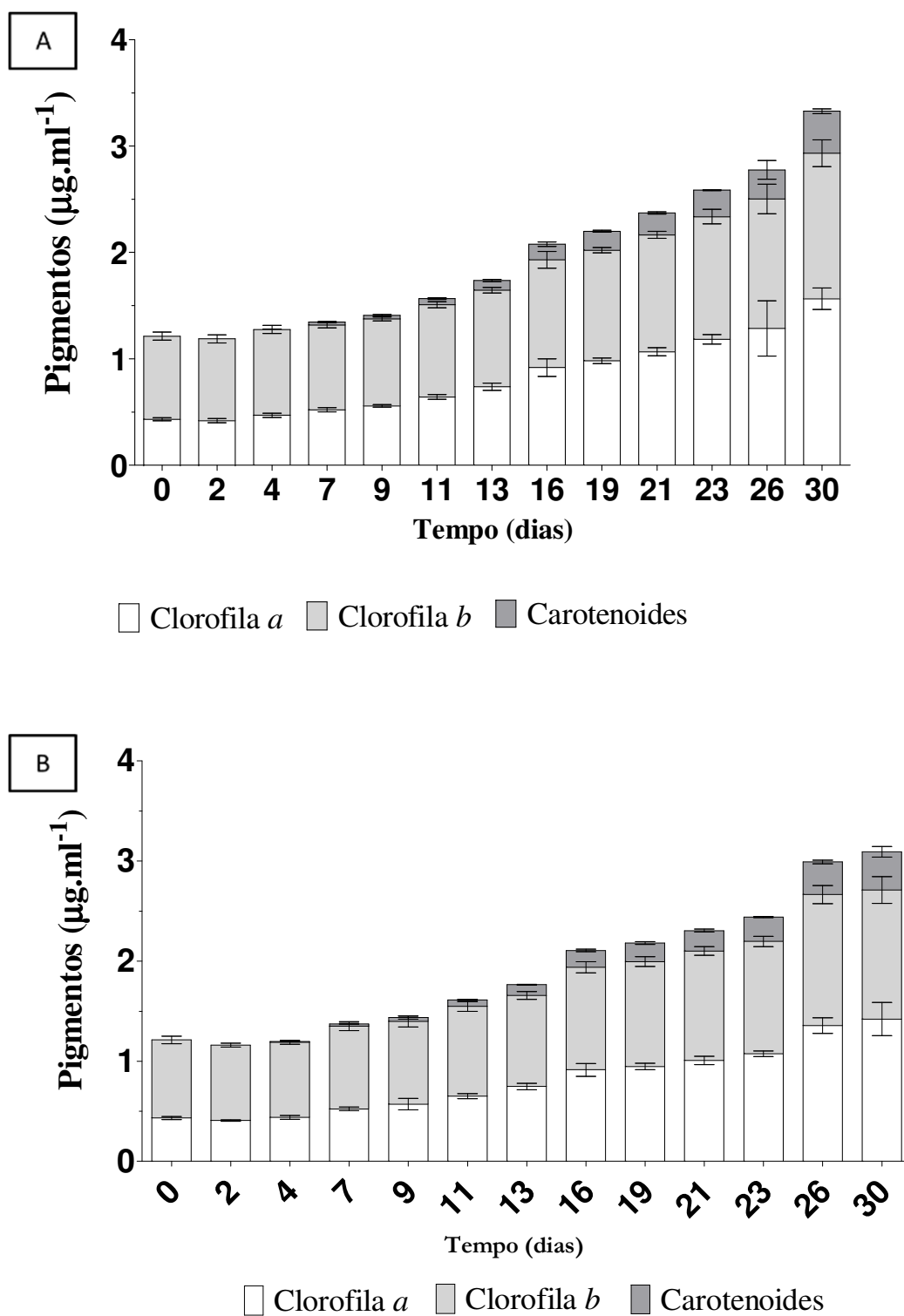


Figura 51 – Pigmentos fotossintéticos, extraídos em DMSO, de células de microalga *Coccomyxa* sp. cultivadas em meio MK a pH 6.5. **A.** Intensidade luminosa baixa. **B.** Intensidade luminosa alta.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

A razão entre as clorofilas (figura 52) permitiu verificar que há um aumento gradual da clorofila *a* em relação à clorofila *b*. No caso da cultura que estava em meio MK pH 6.5 verificou-se uma inversão da quantidade de clorofilas (*a* e *b*) a meio da curva de crescimento, e verificou-se ainda, para este meio de cultura, que a razão das clorofilas para a intensidade luminosa mais elevada ficou ligeiramente abaixo da razão das clorofilas para a intensidade luminosa mais baixa. No meio MK pH 2.5 não se verificou esta tendência no que diz respeito à intensidade luminosa.

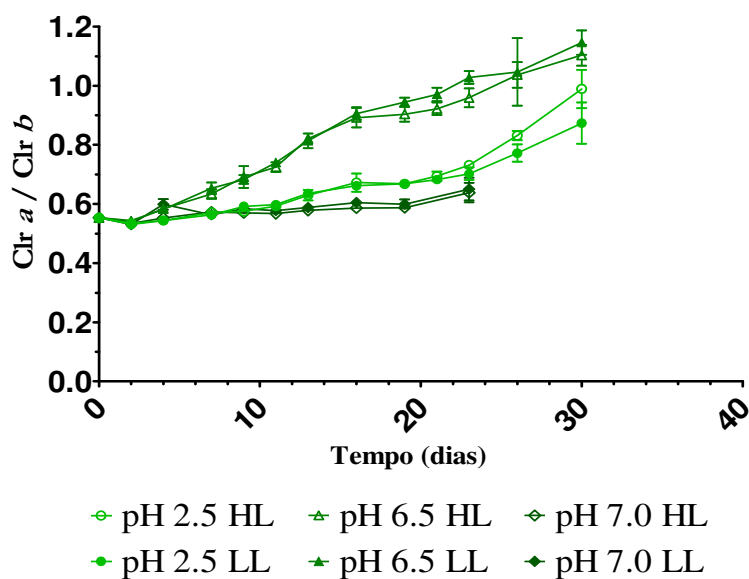


Figura 52 – Razão entre a clorofila *a* e a clorofila *b* para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta.

A clorofila total por célula (figura 53) diminuiu ao longo do tempo, acabando por estabilizar a diferentes níveis, consoante o meio e a intensidade luminosa. Relativamente aos carotenoides (figura 54) verificou-se um aumento destes por célula ao longo do tempo.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

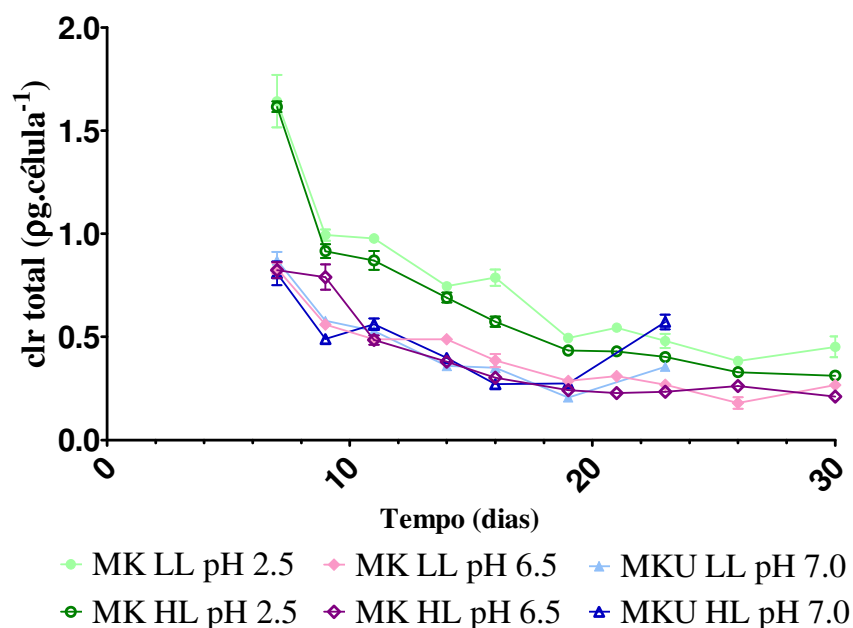


Figura 53 – Clorofila total por célula para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta.

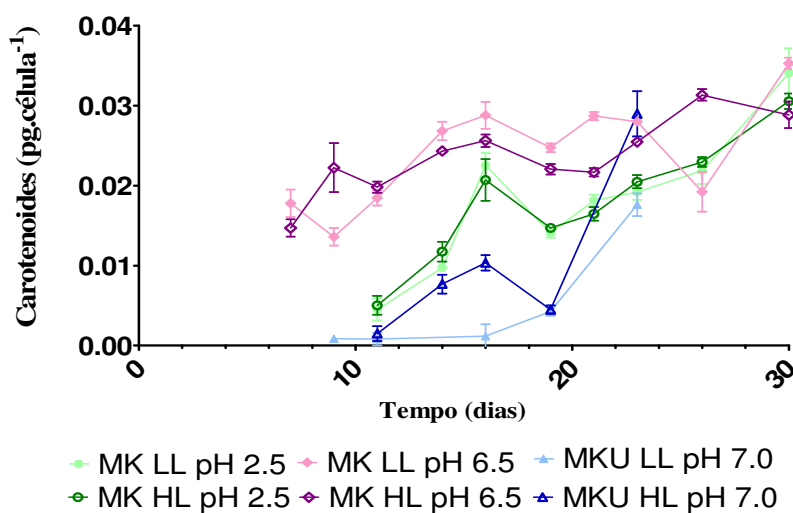


Figura 54 – Carotenoides por célula para cada meio e intensidades luminosas testadas. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta.

4.2.1.3. Variação do pH

O pH das culturas foi monitorizado ao longo do tempo verificando-se pequenas alterações do pH como indicado no gráfico da figura 55, no entanto apenas o ponto assinalado com *** sofreu uma alteração significativa no pH para intensidades luminosa diferentes.

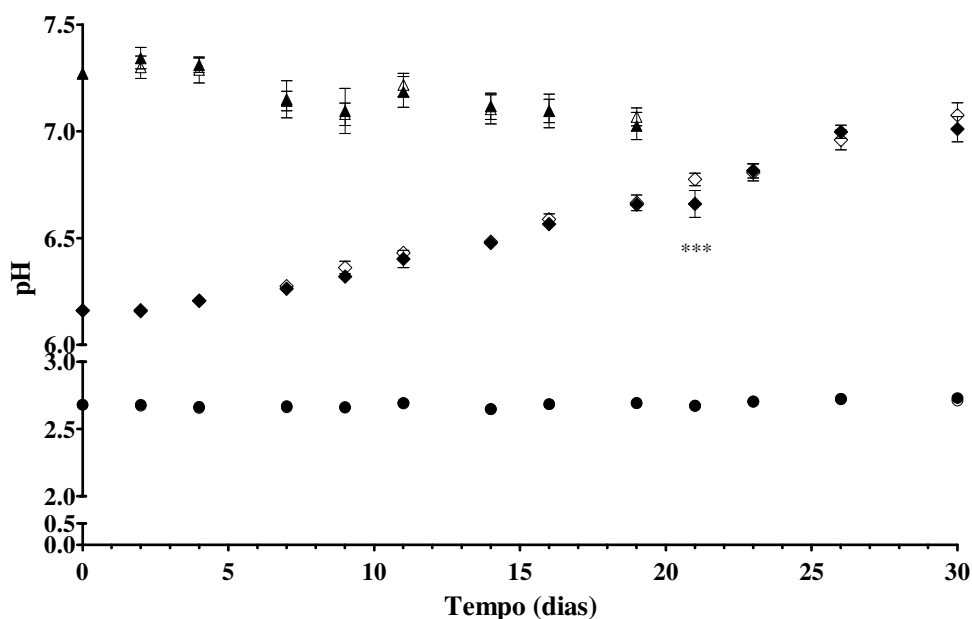


Figura 55 – Variação do pH ao longo da curva de crescimento para cada meio de cultura. ● Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa baixa; ○ Meio MK, pH 2.5 com intensidade luminosa alta; ▲ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa baixa; △ Meio MKU, pH 7.0 com intensidade luminosa alta; ◆ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa baixa; ◇ Meio MK, pH 6.5 com intensidade luminosa alta. *** P<0.001

4.2.2. Stress oxidativo

4.2.2.1. Biomassa e pigmentos

Após 72h, depois da adição do cobre às culturas, estas tinham aspetos diferentes, como se pode verificar na figura 56. Os replicados cultivados em meio MK a pH 2.5 apresentavam cor verde como nos replicados controlo, no entanto os replicados cultivados no meio MK a pH 6.5 apresentavam uma cor azul-esverdeada comparativamente aos replicados controlo.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

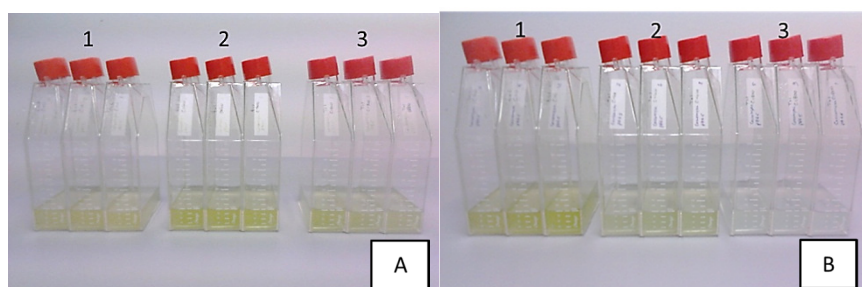


Figura 56 – Replicados para a determinação do MDA após as 72h. **A.** Meio MK a pH 2,5; **B.** Meio MK a pH 6,5. 1. Controlo, 2. C (Cu^{2+}) =0.4 mM, 3. C (Cu^{2+}) =0.8 mM;

A avaliação da biomassa através da contagem celular permitiu perceber se as células tinham mantido um crescimento dentro do esperado. As células em cultura com meio MK a pH 2.5 (figura 57 A) apresentavam aumento do número de células para qualquer das concentrações de Cu^{2+} adicionada, verificando-se um crescimento ligeiramente superior nos replicados com concentração de 0.4 mM de Cu^{2+} relativamente aos replicados do controlo. O crescimento nos replicados com concentração de 0.8 mM de Cu^{2+} não foi tão evidente como o respetivo controlo.

As células em cultura com meio MK a pH 6.5 (figura 57 B) apresentaram aumento do número de células apenas nos replicados do controlo; nos restantes replicados, para as diferentes concentrações de Cu^{2+} , não se verificou aumento do número de células, tendo-se mesmo registado um decréscimo nos replicados expostos a 0.8 mM de Cu^{2+} .

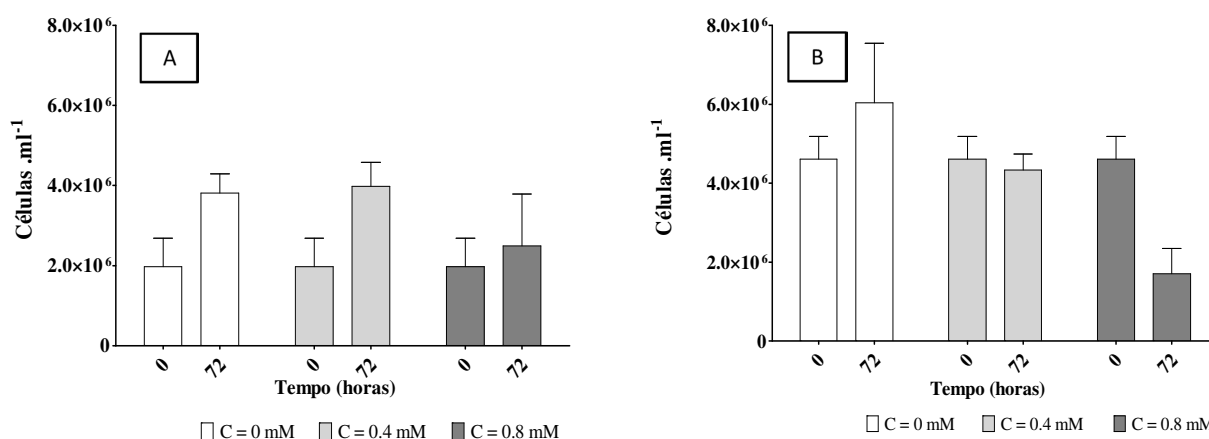


Figura 57 – Número de células no tempo zero e 72h depois de adicionar as concentrações de cobre em ambos os meios de cultura. **A.** Meio MK a pH 2.5; **B.** Meio MK a pH 6.5.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

Os pigmentos extraídos mostraram a acumulação de carotenoides em todos os replicados a pH 2.5. Os replicados a pH 6.5 apresentaram acumulação de carotenoides apenas nos controlos, como se pode observar nos gráficos da figura 58. Em relação às clorofilas, nota-se um decréscimo mais acentuado na clorofila a do que na clorofila b nas culturas a pH 6.5 expostas a cobre, enquanto nas culturas a pH 2.5 não se registaram efeitos significativos nas concentrações de ambas.

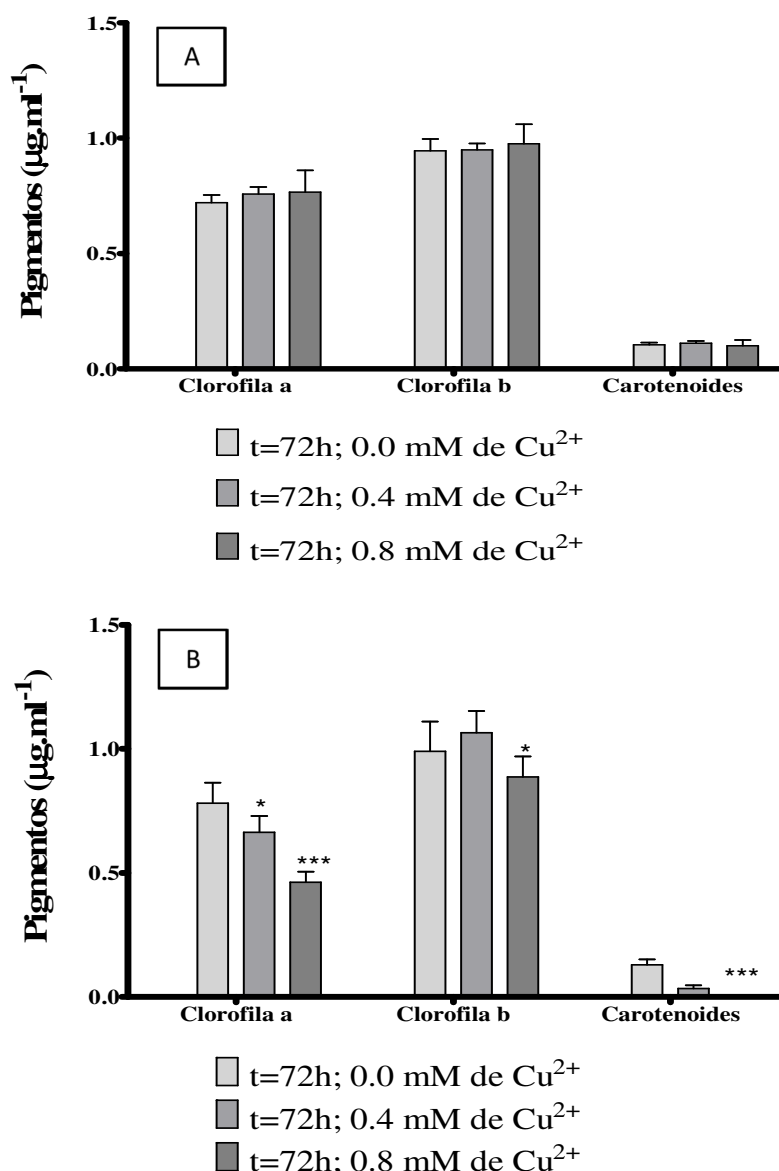


Figura 58 – Pigmentos extraídos para cada tratamento na indução de stress oxidativo com duas concentrações de Cobre. **A.** Culturas em meio MK a pH 2.5. **B.** Culturas em meio MK a pH 6.5. * P < 0.05; *** P < 0.001

4.2.2.2. Quantificação de MDA

Na determinação do MDA (figura 59) verificou-se que para a concentração de 0.4 mM de cobre, as células em cultura no meio MK a pH 2.5 apresentaram valores duas vezes menores que as células em cultura no meio MK a pH 6.5. Já nos replicados em que a concentração de cobre usada foi de 0.8 mM não houve diferenças significativas quer em relação às culturas a pH mais baixo quer em relação ao respetivo controlo.

Como se pode verificar, pelos gráficos presentes na figura 57, houve um decréscimo acentuado no número de células referentes ao meio de cultura MK a pH 6.5 para a concentração de 0.8 mM de cobre testada. Por esse motivo os valores de MDA foram também expressos em nmol por milhão de células para cada um dos meios de cultura usados (figura 60). Deste modo verifica-se que o cobre a pH 6.5 aumenta significativamente os níveis de MDA (cerca de 3 vezes). No entanto não se registam diferenças significativas devidas somente ao efeito do pH, como se pode ver comparando os controlos dos dois tipos de culturas.

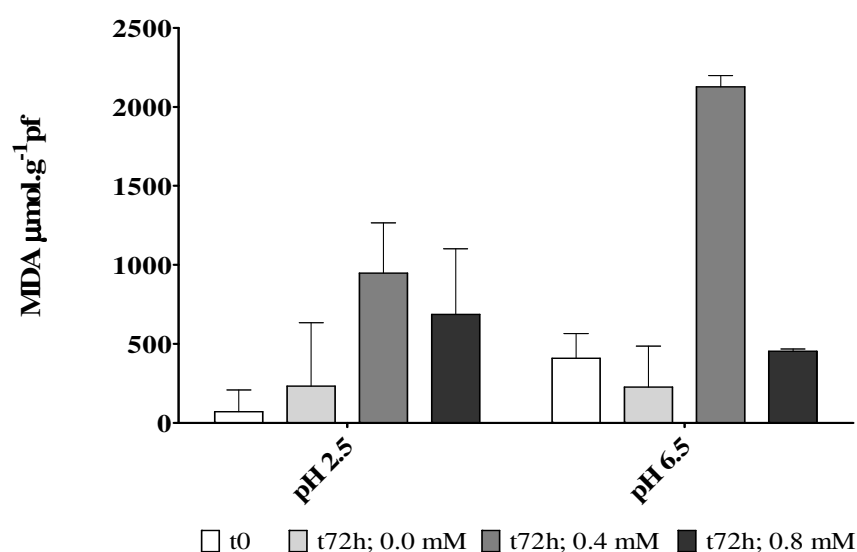


Figura 59 – Valores de MDA, resultantes do teste de duas concentrações de Cobre, após 72h.

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

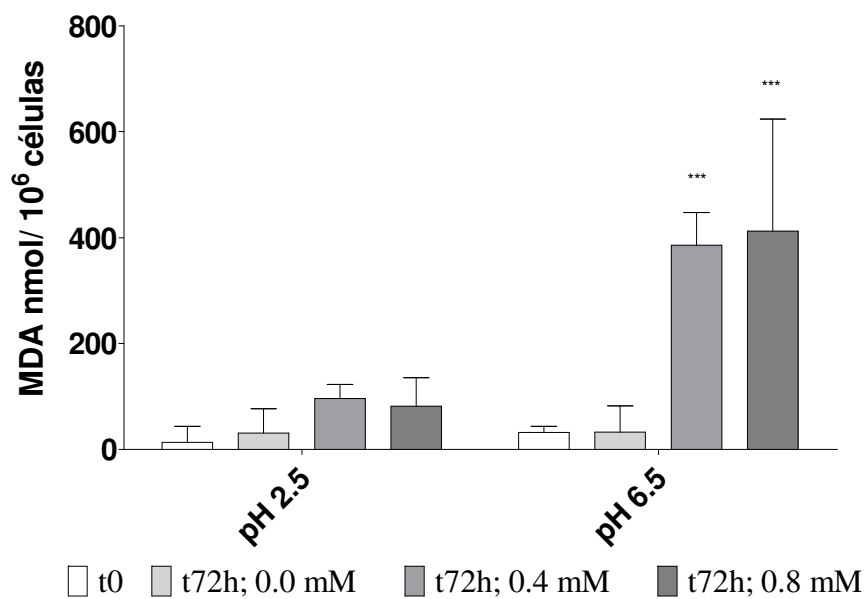


Figura 60 – Valores de MDA, em nmol por 10⁶ células, resultantes do teste de duas concentrações de Cobre, após 72h, em meio MK. *** P <0.001

5. Discussão

Nesta parte do trabalho pretendeu-se estudar um dos isolados obtidos no capítulo anterior. Pretendeu-se verificar como é que a microalga isolada reagiria a diferentes intensidades de luz, assim como a diferentes fontes de azoto e a diferentes valores de pH. Como foram isolados duas microalgas, optou-se por testar as duas durante algum tempo de forma a poder ver o comportamento em relação ao crescimento, tendo em vista escolher a que fosse mais eficiente no crescimento, e apresentasse menos entraves à conclusão do trabalho. A *Coccomyxa* sp. apresentou “vantagens” em relação a *Chlamydomonas* sp., por, aparentemente, não ter um ciclo de vida dimórfico e não apresentar movimento. A presença de uma estrutura que se identificou como fungo, na cultura de *Chlamydomonas* sp., a determinada altura da etapa de caracterização fisiológica, também foi um dos impedimentos à escolhas dos isolados de *Chlamydomonas* sp..

A curva de crescimento realizada, para os isolados de *Coccomyxa* sp., decorreu durante 30 dias com o objetivo de acompanhar todas as fases associadas ao desenvolvimento de microrganismos. A curva deveria ter sido acompanhada mais frequentemente. No entanto as curvas permitiram perceber que o crescimento da cultura a pH 2.5 apresenta um desenvolvimento mais lento do que a curva de crescimento da cultura a pH 6.5, e a pH 7.0, não permitindo observar a tendência da cultura de entrar em fase estacionária ou mesmo na fase de morte celular. Decorridos 16 dias a cultura em meio MKU a pH 7.0 entrou na fase de morte celular e a cultura em meio MK pH 6.5, exposta à intensidade luminosa mais elevada, mostrou uma tendência de abrandamento próximo do vigésimo dia.

As fontes de azoto testadas foram o nitrato e a ureia, e esperava-se que os replicados testados com o meio MKU a pH 7.0 se mantivessem, em termos de crescimento celular, próximos ou até ligeiramente superiores em relação aos replicados testados em meio MK a pH 6.5. Estudos de Casal *et al.* (2011), onde se testaram diferentes fontes de azoto, para o crescimento de um isolado do género *Coccomyxa*, mostraram ser a ureia melhor fonte de azoto do que o nitrato, a pH 2.5. No presente trabalho, o que se verificou foi um decréscimo rápido da cultura em meio MKU a pH 7.0 em relação à cultura em MK a pH 6.5, mesmo que durante os primeiros 16 dias, estas se tenham mantido quase equivalentes em termos de crescimento. Uma possível razão para explicar este decréscimo, antes do esperado, pode

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

dever-se à microbiota acompanhante, pois a cultura não estava axénica. A bactéria acompanhante, *Variovorax paradoxus*, metaboliza a ureia convertendo-a em amónia, sendo esta a forma do azoto que assimila. Esta bactéria foi usada em estudos com herbicidas (Sørensen *et al.*, 2008) onde se verifica a eficiência desta na metabolização de compostos com ureia. Uma vez que tanto a microalga como a bactéria utilizavam a mesma fonte de azoto, a disponibilidade em ureia pode ter sido comprometida e ser reduzida mais rapidamente fazendo com que a cultura entrasse em declínio.

A utilização de dois níveis de luz mostrou que esta microalga apresentou um número de células maior para a intensidade luminosa mais elevada ($95.79 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) que se usou, em ambos os pH usados. Mas se examinarmos relativamente à fonte de azoto, verificou-se que, a cultura em meio MKU não apresenta diferenças relativamente ao aumento celular nas duas condições de luz, além disto, esta cultura evidenciou um decréscimo celular mais acentuado nos replicados expostos à intensidade luminosa elevada, possivelmente pelas razões já apresentadas.

A taxa de crescimento média foi diferente para qualquer dos tratamentos nas duas intensidades luminosas testadas, sendo ligeiramente maior para a intensidade luminosa elevada, com exceção do meio de cultura MKU a pH 7.0. Dentro dos tratamentos verificou-se que a taxa máxima de crescimento ocorreu no meio MK a pH 2.5 na intensidade luminosa alta, com o valor 0.432 dia^{-1} , mas a cultura no meio MK a pH 6.5 também apresentou uma taxa máxima de crescimento muito semelhante para a mesma intensidade luminosa. Estas microalgas apresentam um tempo de duplicação de 1.6 dias para as culturas em meio MK a pH 2.5 e 6.5 na intensidade luminosa mais elevada. A cultura em meio MKU a pH 7.0 exposta à intensidade luminosa mais baixa apresenta o tempo de duplicação maior, com 2.3 dias.

Os pigmentos produzidos pelas células em cultura com meio MK a pH 2.5 mostraram um aumento ligeiro das clorofilas *a* e *b* ao longo do tempo, para ambos os tratamentos de luz. O aparecimento de carotenoides, no meio MK a pH 2.5, só se verificou a partir do décimo primeiro dia para a intensidade luminosa mais elevada e a partir do décimo terceiro dia para a intensidade luminosa mais baixa. Observou-se um aumento acentuado de pigmentos nas células em cultura no meio MK a pH 6.5, ao longo do tempo. Neste meio, verificou-se o aparecimento de carotenoides a partir do quarto dia para a intensidade luminosa mais elevada e a partir do sétimo dia para a intensidade luminosa mais baixa. A diferença que se verificou

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

entre os dias em que apareceram os carotenoides para a intensidade luminosa mais elevada e mais baixa era esperada. A exposição do aparelho fotossintético à intensidade luminosa mais elevada fez com que as células produzissem pigmentos acessórios, nomeadamente carotenoides. Este aspeto pode ser interessante a nível biotecnológico, pois os carotenoides apresentam propriedades antioxidantes.

A razão entre a clorofila *a* e a clorofila *b* foi crescente em qualquer dos tratamentos, verificando-se que, na cultura em meio MK pH 6.5, o aumento é mais marcado em relação às outras culturas.

A monitorização do pH das culturas, ao longo do tempo que decorreu a curva de crescimento, mostrou que o pH destas não se altera para as diferentes intensidades luminosas testadas. Apenas uma das monitorizações na cultura em meio MK a pH 6.5 apresentou um nível de significância elevado, com $P < 0.001$, no vigésimo primeiro dia. A cultura em meio MK pH 2.5 não apresentou alteração do pH ao longo do tempo, já a cultura em meio MK a pH 6.5 apresentou um ligeiro aumento do pH ao longo do tempo. A cultura em meio MKU a pH 7.0 apresentou um ligeiro decréscimo no pH ao longo do tempo.

O pH parece ter tido interferência na resposta de *Coccomyxa* sp. ao cobre. De facto, a pH 2.5 verificou-se um ligeiro decréscimo no crescimento a 0.8 mM de cobre, embora não significativo, enquanto que a pH 6.5 ao fim de 72h de exposição a 0.8 mM de cobre o decréscimo do número de células é bem evidente. Os valores de MDA para as duas concentrações de cobre testadas, na cultura em meio MK a pH 2.5, foram muito semelhantes, e maiores em relação aos valores de MDA dos replicados controlo. Na cultura em meio MK a pH 6.5 verificou-se um grande valor de MDA para os replicados onde se adicionou 0.4 mM de cobre relativamente aos replicados de controlo e aos replicados com a concentração 0.8 mM de cobre. A expressão dos valores de MDA por peso fresco mostrou grande variação quer entre culturas quer numa mesma cultura ao longo do tempo, mostrando não ser o mais adequado quando o número de células por ml varia grandemente. De facto, o peso fresco determinado não teve em conta as células mortas e em decomposição existentes no volume celular pesado, nem variações de potencial hídrico celular que podem ter variado grandemente entre culturas, afetando assim a determinação de MDA. Quando se calculou a concentração de MDA por milhão de células, um parâmetro mais próximo do estado de funcionamento de cada cultura, verificou-se um aumento significativo de MDA causado pelo cobre, quer a 0.4 mM quer a 0.8 mM, a pH 6.5. Na cultura em meio MK a pH 2.5 observou-se que os valores

IV. Caracterização fisiológica de um isolado unialgal de *Coccomyxa* sp.

de MDA por milhão de células foram idênticos para ambas as concentrações de cobre testadas, e que os replicados controlo não apresentaram valores expressivos por milhão de células. Uma vez que estas células provieram de um meio onde a quantidade de metais é elevada, os mecanismos existentes para reduzir o aporte de metais, que não sejam necessários à célula, estavam ativos e permitiram às células diminuir a peroxidação lipídica. Aparentemente, no entanto, a simultaneidade de pH 6.5 e concentrações de cobre de 0.4 e 0.8 mM induzem um cenário de stress oxidativo, tal como indicado pelos elevados níveis de MDA. Estes resultados estão de acordo com o facto de não se terem observado tantas estruturas lipídicas nas células desta cultura em relação às células da cultura em meio MK a pH 2.5.

O facto de esta microalga ter mecanismos de defesa adaptados ao pH original (pH<3) pode ter feito com que, quando exposta a um pH mais elevado não tivesse que gerir o pH interno com um controlo tão rigoroso, o que lhe terá permitido duplicar o número de células com maior facilidade em relação às culturas em meio MK a pH 2.5. No entanto, o pH neutro pode estar na origem de uma fonte de stress, pois a maquinaria da célula estava “adaptada” a um meio mais agressivo.

Com um interesse biotecnológico crescente na produção de carotenoides, devido ao seu potencial antioxidante, o meio de cultura testado a pH 6.5 é o que melhor evidenciou a acumulação de carotenoides com quantidades de biomassa maiores. No entanto estas parecem não conseguir reagir ao aumento de cobre, principalmente à concentração mais elevada que foi testada. De acordo com estudo de (Vaquero *et al.*, 2012) foi verificado que as concentrações de cobre até 0.4 mM são melhores para induzir stress em culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 2.5 permitindo o aumento da acumulação de carotenoides nas células. Esperava-se que na cultura a pH 6.5 se verificasse algo semelhante ou até mais evidente, pois com os resultados da curva de crescimento verificou-se que a acumulação de carotenoides ocorria mais cedo e de forma mais elevada do que nas células em cultura a pH 2.5.

V. Conclusão

A identificação de microrganismos presentes em amostras ambientais deve ser feita com base em várias técnicas permitindo, assim, obterem-se resultados fidedignos, de modo a que as bases de dados sejam mais completas na informação apresentada. Identificou-se morfológicamente quatro tipos de organismos, nomeadamente *Euglena*, *Coccomyxa*, *Chlamydomonas*, *Klebsormidium* e Diatomáceas, que representam 3 linhagens evolutivas distintas de eucariotas. Molecularmente, estes mesmos organismos foram detetados por ambos os marcadores moleculares usados, designadamente, 18S rDNA e 23S rDNA. Os investigadores que têm estudado os microrganismos fototróficos de Rio Tinto (Espanha) utilizaram um fragmento do gene 18S como marcador molecular, no entanto o gene *rbcL* é também usado para identificar molecularmente microalgas filamentosas, como é o caso de *Klebsormidium* isolado por Novis (2006). A utilização do marcador filogenético 23S rDNA (Sherwood e Presting 2007) está documentada em amostras ambientais sobretudo marinhas. Neste trabalho verificou-se que apresenta boa definição para a identificação específica com as sequências que obtivemos das amostras ambientais a pH < 3. A disponibilidade de sequências do marcador 23S rDNA, na base de dados do GenBank, é no entanto ainda relativamente baixa. Por outro lado, apesar de haver disponível no GenBank um número elevado de sequências do gene 18S, a maioria das que mostraram ter homologia com as obtidas neste trabalho pertence a organismos de ambientes extremos (sobretudo Rio Tinto) mas ainda não cultivados. Além da parte molecular carecer de uma boa documentação, esta deve ser associada a uma boa descrição morfológica. Futuros estudos não se podem ficar só pela identificação molecular, mas deverão caracterizar o(s) organismo(s) de modo a que seja possível perceber como se influenciam as espécies que vivem em consórcio num biofilme, e como tiram partido desta associação, principalmente em AMD.

Foi possível cultivar e isolar, em laboratório, espécies de dois géneros de microalgas, a saber *Chlamydomonas* e *Coccomyxa*, que foram mantidas em cultura. Apesar de serem microrganismos de meio ácido foram isolados com alguma facilidade, pois a utilização de um meio semissólido (com pouca quantidade de agar) permitiu manter a disponibilidade da água mas também imobilizar o organismo, importante principalmente no isolamento da microalga *Chlamydomonas* sp., possibilitando obter colónias que facilitam muito o processo de isolamento. A identificação molecular dos microrganismos isolados apresentou as mesmas

VI. Conclusão

limitações encontradas com os microrganismos recolhidos, nas amostras ambientais. A situação mais relevante ocorreu com os isolados de *Coccomyxa* sp., pois existia, apenas, uma sequência de um isolado do género *Coccomyxa*, na base de dados GenBank com 97% de identidade máxima, quando se efetuou o BLAST das sequências obtidas. Posteriormente foram adicionadas quatro novas sequências, porém também não eram de isolados provenientes de meios ácidos, no entanto consubstanciaram a classificação taxonómica dada ao isolado obtido neste trabalho.

A avaliação fisiológica do isolado unialgal de *Coccomyxa* sp. permitiu perceber que estes organismos desenvolveram mecanismos de adaptação para o meio em que se encontram ($\text{pH} < 3$), além de terem uma plasticidade fisiológica grande, pois quando colocadas em pH 6.5, estas microalgas apresentam uma taxa de crescimento média maior do que a obtida para as microalgas cultivadas a pH 2.5. É uma espécie que apresenta uma boa adaptabilidade em termos de manipulação laboratorial, pois apesar de não ter as melhores condições de cultura, visto que não foi adaptado um sistema de arejamento, nem de injeção de CO_2 e o crescimento da cultura só ter sido efetuado em sistema fechado (sem renovação do meio), esta apresentou uma taxa de crescimento aceitável, com um tempo de duplicação próximo dos 2 dias.

Aplicar a microalga *Coccomyxa* sp. a um sistema de cultura em larga escala para a obtenção de biomassa pode produzir bons resultados, principalmente no que se refere à acumulação de carotenoides. Este interesse biotecnológico pode ser ponderado com o uso do meio MK a pH 6.5 na intensidade luminosa elevada, conseguindo uma maior quantidade de biomassa, com uma taxa de crescimento média maior e produção de carotenoides mais cedo. A acumulação de carotenoides por parte das células de *Coccomyxa* sp., usando o meio MK a pH 2.5, pode ser outra forma de uso do potencial desta microalga.

Futuramente poder-se-á averiguar outros antioxidantes produzidos pelas células, em meio de cultura a pH 2.5, como resposta ao stress oxidativo, provocado por componentes do meio. Na cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 6.5 com uma concentração 0.4 mM de cobre verificou-se um valor elevado de MDA, mas não se comprovou acumulação de carotenoides, pelo método de determinação usado.

A acumulação de carotenoides é apenas um dos aspetos da resposta ao stress oxidativo. Uma vez que não se verificou mais acumulação de carotenoides a pH 2.5 mesmo quando a concentração de cobre no meio era elevada (0.8 mM) e por outro lado não foi encontrada evidência de peroxidação de lípidos (MDA) ou degradação de clorofila, será

VI. Conclusão

interessante averiguar qual o papel dos componentes antioxidantes enzimáticos neste organismo. Neste sentido, estudos futuros deverão incluir a determinação da atividade de enzimas como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, entre outras.

Uma perspectiva mais alargada de estudo dos mecanismos celulares que permitem a sobrevivência em meio ácido com altas concentrações de metais, deverá por sua vez recorrer à aplicação de técnicas de genómica funcional em organismos modelo recuperados destes ambientes extremos.

VI. Bibliografia

- Aguilera, Angeles, Erik Zettler, Felipe Gómez, Linda Amaral-Zettler, Nuria Rodríguez, and Ricardo Amil. "Distribution and seasonal variability in the benthic eukaryotic community of Río Tinto (SW, Spain), an acidic, high metal extreme environment." *Systematic and Applied Microbiology* 30 (2007): 531–546.
- Aguilera, Angeles, Felipe Gómez, Ricardo Amils, and Virginia Souza-Egipsy. "Development and Structure of Eukaryotic Biofilms in an Extreme Acidic Environment, Rio Tinto (SW, Spain)." *Microbial Ecology* 53 (2007): 294–305.
- Aguilera, Angeles, Linda Amaral-Zettler, Virginia Souza-Egipsy, Erik Ettl, and Ricardo Amils. "Eukaryotic Community Structure From Río Tinto (Sw, Spain), A Highly Acidic River." In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, by Joseph Seckbach, 467-485. Dordrecht: Springer, 2007.
- Akcil, Ata, and Soner Koldas. "Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies." *Journal of Cleaner Production* 14 (2006): 1139-1145.
- Baker, Brett J., et al. "Insights into the Diversity of Eukaryotes in Acid Mine Drainage Biofilm Communities." *Applied And Environmental Microbiology* 75 (2009): 2192–2199.
- Barsanti, Laura, and Paolo Gualtieri. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Broken Sound Parkway, Nova Iorque: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006.
- Barton, Larry L., and Diana E. Northup. *Microbial Ecology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- Beier, David R. "Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genotoc mapping." *Mammalian Genome* 4 (1993): 627-631.
- Bertozzini, Elena, Luca Galluzzi, Antonella Penna, and Mauro Magnani. "Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red." *Journal of Microbiological Methods* 87 (2011): 17–23.

VI. Bibliografia

- Bond, Philip L, Greg K Druschel, and Jillian F Banfield. "Comparison of Acid Mine Drainage Microbial Communities in Physically and Geochemically Distinct Ecosystems." *Applied And Environmental Microbiology* 66 (2000): 4962–4971.
- Brake, S S, H K Dannelly, and K A Connors. "Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality." *Environmental Geology* 40 (2001): 458-469.
- Brake, Sandra S, and Stephen T Hasiotis. "Eukaryote-Dominated Biofilms and Their Significance in Acidic Environments." *Geomicrobiology Journal* 27 (2010): 534-558.
- Bryan, Christopher G., Kevin B. Hallberg, and D. Barrie Johnson. "Mobilisation of metals in mineral tailings at the abandoned São Domingos copper mine (Portugal) by indigenous acidophilic bacteria." *Hydrometallurgy* 83 (2006): 184–194.
- Cárdenas, Juan Pablo, et al. "Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* 88 (2010): 605–620.
- Casal, Carlos, Maria Cuaresma, Jose M. Vega, and Carlos Vílchez. "Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea." *Marine Drugs* 9 (2011): 29-42.
- Cuaresma, María, Carlos Casal, Eduardo Forján, and Carlos Vílchez. "Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems." *Journal of industrial microbiology and biotechnology* 38 (2011): 167–177.
- Cuaresma, Maria, Inés Garbayo, José M. Vega, and Carlos Vílchez. "Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river." *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006): 158–162.

VI. Bibliografia

- Cuaresma, Maria, Marcel Janssen, Evert J. van der End, Carlos Vílchez, and René H. Wijffels. "Luminostat operation: A tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle?" *Bioresource Technology* 102 (2011): 7871–7878.
- Custódio, Jorge. *Os Primórdios da Mina - Estudo para servir de fundamento a uma reconstrução da arqueologia mineira da Serra de S. Domingos*. Vol. II, in *Mineração no Baixo Alentejo*, by Câmara Municipal de Castro Verde, 88 - 121. Castro Verde, 2002.
- Das, Bidus K, Arup Roy, Matthias Koschorreck, Santi M Mandal, Katrin Wendt-Potthoff, and Jayanta Bhattacharya. "Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization." *Water Research* 43 (2009): 883-894.
- Denicola, Dean M. "A review of diatoms found in highly acidic environments." *Hydrobiologia* 433 (2000): 111-122.
- Green, Beverley R. "Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes." *The Plant Journal* 66 (2011): 34–44.
- Gross, Wolfgang. "Ecophysiology of algae living in highly acidic environments." *Hydrobiologia* 433 (2000): 31-37.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Patent 41:95-98. 1999.
- Harris, Elizabeth H, John E Boynton, and Nicholas W Gillham. "Chloroplast Ribosomes and Protein Synthesis." *Microbiological Reviews*, 1994: 700-754.
- Heinhorst, Sabine, and Gordon C. Cannon. "DNA replication in chloroplasts." *Journal of Cell Science* 104 (1993): 1-9.

VI. Bibliografia

- Hodges, D. Mark, John M. DeLong, Charles F. Forney, and Robert K. Prange. "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds." *Planta* 207 (1999): 604 - 611.
- John, D M, B A Whitton, and A J Brook. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles - An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- Johnson, D B. "Acidophilic Microbial Communities: Candidates for Bioremediation of Acidic Mine Effluents." *International biodeterioration & biodegradation*, 1995: 41-58.
- Johnson, D B. "Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms." *FEMS Microbiology Ecology* 27 (1998): 307-317.
- Johnson, D B. "Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates." *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18 (2008): 1367-1373.
- Johnson, D B. "Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines." *Water, Air, and Soil Pollution* 3 (2003): 47-66.
- Johnson, D B, and K B Hallberg. "Acid mine drainage remediation options: a review." *Science of the total environment* 338 (2005): 3-14.
- Karsten, Ulf, and Andreas Holzinger. "Light, Temperature, and Desiccation Effects on Photosynthetic Activity, and Drought-Induced Ultrastructural Changes in the Green Alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a High Alpine Soil Crust." *Microbial Ecology* 63 (2012): 51-63.

VI. Bibliografia

- Klaveness, Dag, and Finn Løvholden. "Life in the Chemocline and Below?" In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, by J Seckbach, 59-78. Springer, 2007.
- Lewis, Louise A. "Independent Lineages of Green Eukaryotes from Arid Lands." In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, by J Seckbach, 569–582. Springer, 2007.
- Lopez-Bautista, Juan M., Fabio Rindi, and Dale Casamatta. "The Systematics Of Subaerial Algae." In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, by J. Seckbach, 599–617. Springer, 2007.
- López-Elías, José A., Edgard Esquer-Miranda, Marcel Martínez-Porchas, María C. Garza-Aguirre, Martha Rivas-Vega, and Nolberta Huerta-Aldaz. "The Effect of inoculation time and the inoculum concentration on the productive response of *Tetraselmis chuii* (Butcher, 1958) mass cultured in F/2 and 2-F media." *International Journal Archives of Biological Science* 63 (2011): 557-562.
- Muyzer, Gerard. "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." *Current Opinion in Microbiology* 2 (1999): 317-322.
- Muyzer, Gerard, and Kornelia Small. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (1998): 127–141.
- NCBI. n.d. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome.
- Novis, Phil M, and Jon S Harding. *Extreme acidophiles: Freshwater algae associated with acid mine drainage*. Vol. 11, in *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, by Joseph Seckbach, 445-463. Dordrecht: Springer, 2007.
- Novis, Philip M. "Taxonomy of Klebsormidium (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats." *Phycologia* 45 (2006): 293–301.
- Oarga, Andreea. "Life in extreme environments." *REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA* 9 (2009): s/n.

VI. Bibliografia

- Oliveira, J Tomás, and Victor Oliveira. *Síntese da Geologia da Faixa Piritosa em Portugal, e das Principais Mineralizações Associadas*. Vol. I, in *Mineração do Baixo Alentejo*, by Câmara Municipal de Castro Verde, 8-27. Castro Verde, 2002.
- Pei, Anna, et al. "Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes." *PLoS ONE* 4 (2009): e5437.
- Pérez-López, Rafael, et al. "Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the São Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt)." *Applied Geochemistry* 23 (2008): 3452–3463.
- Pérez-López, Rafael, Joaquín Delgado, José Miguel Nieto, and Belén Márquez-García. "Rare earth element geochemistry of sulphide weathering in the São Domingos mine area (Iberian Pyrite Belt): A proxy for fluid–rock interaction and ancient mining pollution." *Chemical Geology* 276 (2010): 29–40.
- Prescott, G W. *The Freshwater Algae*. 1964.
- Pröschold, Thomas, and Frederik Leliaert. "Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches." In *Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics*, by Juliet Brodie, & Jane Lewis, 123-154. EUA: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2007.
- Puerta, María V. S., and Patricia I. Leonardi. "Ciclo de vida, desarrollo y cariología de *Klebsormidium nitens* (Klebsormidiales, Charophyta)." *Darwiniana* 39 (2001): 223-230.
- Rasoul-Amini, Sara, Younes Ghasemi, Mohammad Hossein Morowvat, and Abdolali Mohagheghzadeh. "PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some natural isolated microalgae." *Food Chemistry* 116 (2009): 129–136.
- Rothschild, L. J., et al. "Life in extreme environments." *Nature* 409 (2001): 1092-1101.

VI. Bibliografía

- Sabatini, Sebastián E., Ángela B. Juárez, María R. Eppis, Laura Bianchi, Carlos M. Luquert, and María del Carmen Ríos Molina. "Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009): 1200–1206.
- Sherwood, Alison R., and Gernot G. Presting. "Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria." *Journal of Phycology* 43 (2007): 605-608.
- Sherwood, Alison R., Yvonne L. Chan, and Gernot G. Presting. "Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community." *Molecular Ecology Resources* 8 (2008): 1011–1014.
- Silva, Paul C. "Historical Review of Attempts to Decrease Subjectivity in Species Identification, with Particular Regard to Algae." *Protist* 159 (2008): 153—161.
- Sørensen, Sebastian R., Christian N. Albers, and Jens Aamand. "Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008): 2332–2340.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." *Molecular Biology and Evolution* (submitted), 2011.
- Taulavuori, E, EK Hellstrom, K Taulavuori, and K Laine. "Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation." *Journal of Experimental Botany* 52 (2001): 2375-2380.
- Tornos, Fernando. "Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: The Iberian Pyrite Belt." *Ore Geology Reviews* 28 (2006): 259–307.

VI. Bibliografia

- Vaquero, Isabel, M. Carmen Ruiz-Domínguez, Mayca Márquez, and Carlos Vílchez. "Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*." *Process Biochemistry*, 2012: doi:10.1016/j.procbio.2012.01.016.
- Warren, Alan, John G. Day, and Susan Brown. "Cultivation of Algae and Protozoa." In *Manual of Environmental Microbiology*, by Christian J Hurst, 61-69. 1997.
- Wellburn, Alan R. "The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution." *Journal of Plant Physiology* 144 (1994): 307 - 313.

Anexos

I. Meio K9 Modificado (Cuaresma, Garbayo, Vega e Vílchez, 2006)

O meio de cultura utilizado tem uma solução de elementos que foi preparada com antecedência, pois tinha que ficar durante 48h no escuro. A solução de elementos foi preparada como descrito no ponto 1, e o meio de cultura foi preparado de acordo com o descrito no ponto 2.

1. Solução de elementos

A solução de elementos compõe-se por micronutrientes essenciais. Esta solução foi realizada em duas partes. Primeiro adicionou-se 10 g de EDTA em 250 ml de água destilada com pH ligeiramente básico. A segunda solução continha os elementos, pela ordem apresentada na tabela seguinte, em 550 ml em água destilada, aquecida a 100°C.

Reagente		Quantidade (g)
Nome	Formula	
Ácido bórico	H ₃ Bo ₃	2,28
Sulfato de zinco pentahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,40
Cloreto de Manganês tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,02
Sulfato de ferro pentahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,00
Cloreto de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,32
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,32
Molibdato de amónio tetrahidratado	Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ .4H ₂ O	0,22

Após a adição dos elementos misturaram-se as duas soluções preparadas, obtendo uma cor verde, e voltou-se a aquecer até aos 100°C. Deixou-se arrefecer até aos 90°C – 80°C e acertou-se o pH a 6,8 com KOH (20%, p/v) sempre com a temperatura acima dos 70°C. O volume foi completado até aos 1000 ml.

2. Meio de Cultura

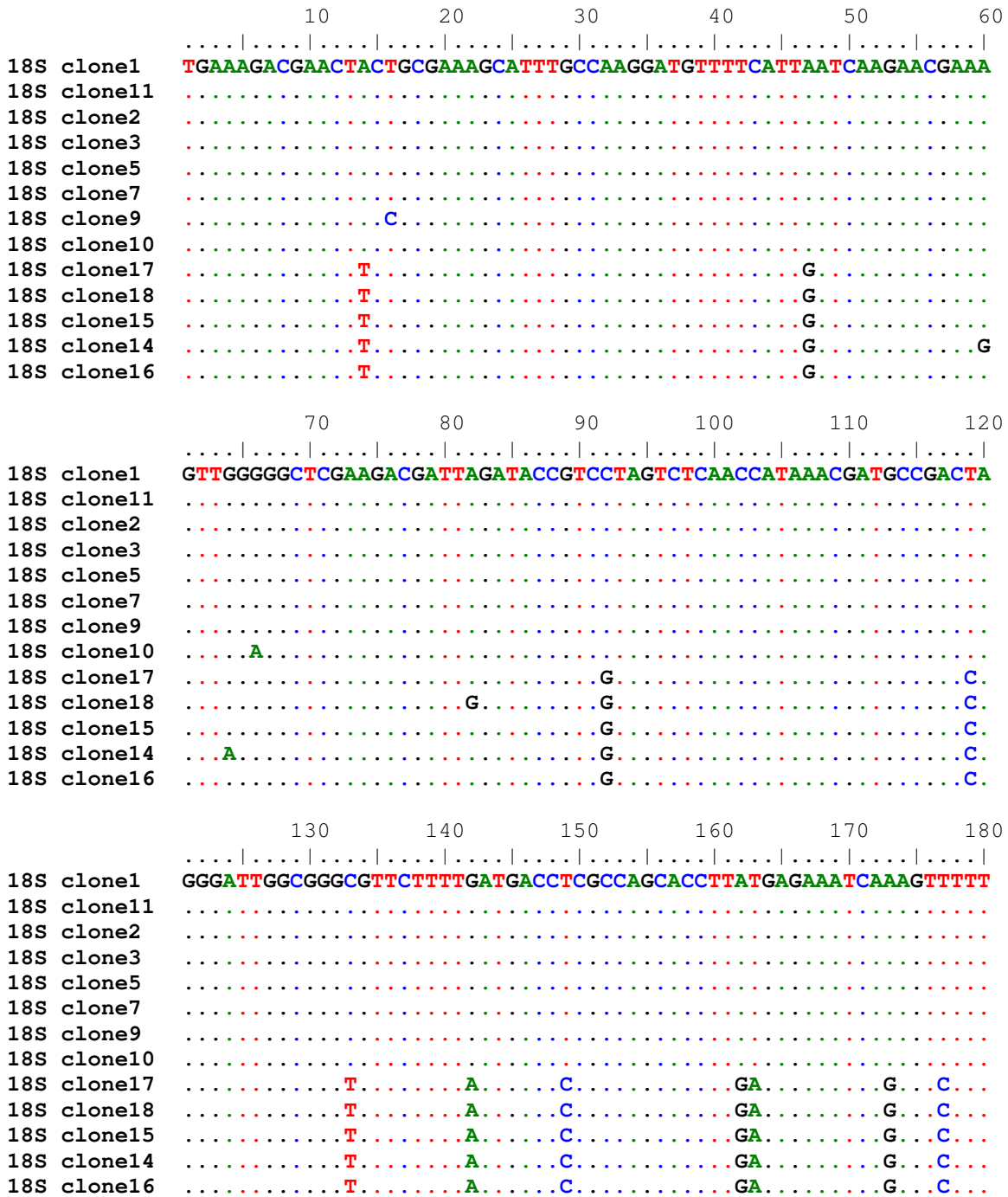
Para um volume de 1l de meio de cultura usou-se os reagentes presentes na tabela seguinte, pela ordem apresentada, num volume de 600 ml.

Reagente		Quantidade
Nome	Formula	
Sulfato de potássio	K_2SO_4	3,95 g
Cloreto de potássio	KCl	0,1 g
Fosfato dipotássio trihidratado	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,5 g
Cloreto de magnésio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,41 g
Nitrato de potássio	KNO_3	2,29 g
Cloreto de cálcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 g
Solução de elementos	-	5 ml

O pH foi ajustado a $2,5 \pm 0,5$ com ácido sulfúrico concentrado. O volume foi preenchido até aos 700 ml, e foi autoclavado durante 20min a $121^\circ C$.

Para uso do meio líquido, após o procedimento de autoclavagem adicionou-se 300 ml de água destilada estéril para completar um litro de meio. Para o meio sólido, adicionou-se 300 ml de Agar estéril 6%.

II. Alinhamento dos clones obtidos das culturas unialgais para o marcador 18S rDNA



Anexos

```

                190      200      210      220      230      240
18S clone1    GGGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACC
18S clone11   .....
18S clone2    .....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....
18S clone10   .....
18S clone17   .....
18S clone18   .....
18S clone15   .....
18S clone14   .....
18S clone16   .....

                250      260      270      280      290      300
18S clone1    ACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCAGAG
18S clone11   .....
18S clone2    .....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....
18S clone10   .....
18S clone17   .....
18S clone18   .....
18S clone15   .....
18S clone14   .....
18S clone16   .....

                310      320      330      340      350      360
18S clone1    CATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGC
18S clone11   .....
18S clone2    .....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....
18S clone10   .....
18S clone17   ..CGAG..T...A.....T.....T.G.....
18S clone18   ..CGAG..T...A.....T.....T.G.....
18S clone15   ..CGAG..T...A.....T.....T.G.....
18S clone14   ..CGAG..T...A.....T.....T.G.....
18S clone16   ..CGAG..T...A.....T.....T.G.....

```

Anexos

```

                370       380       390       400       410       420
18S clone1    CGTTCCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCC
18S clone11   .....
18S clone2    .....A.....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....
18S clone10   .....
18S clone17   .....
18S clone18   .....
18S clone15   .....
18S clone14   .....
18S clone16   .....

                430       440       450       460       470       480
18S clone1    TGCTAACTAGTCACGGTTGGTTTTACCAGCCGGCCGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGA
18S clone11   .....
18S clone2    .....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....T.....
18S clone10   .....
18S clone17   .....A.....T..CC...CTGG.TA..CTT.....T..T
18S clone18   .....A.....T..CC...CTGG.TA..CTT.....T..T
18S clone15   .....A.....T..CC...CTGG.TA..CT.....T..T
18S clone14   .....A.....T..CC...CTGG.TA..CTT.....T..T
18S clone16   .....A.....T..CC...CTGG.TA..CTT.....T..T

                490       500       510       520       530       540
18S clone1    CTAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCG
18S clone11   .....
18S clone2    .....
18S clone3    .....
18S clone5    .....
18S clone7    .....
18S clone9    .....
18S clone10   .....
18S clone17   T...G.....
18S clone18   T...G.....
18S clone15   T...G.....
18S clone14   T...G.....
18S clone16   T...G.....

```

Anexos

```

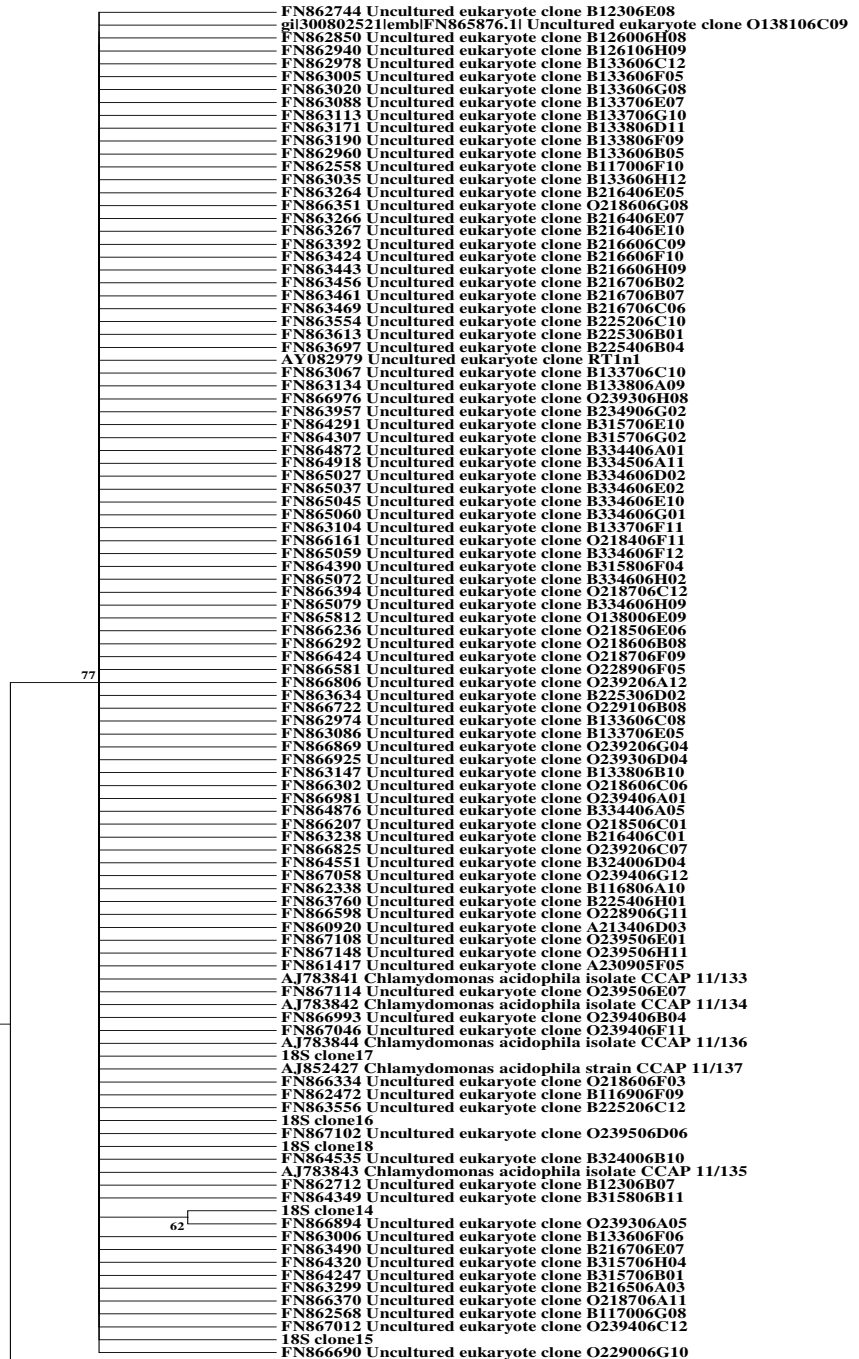
                    550      560      570      580      590      600
18S clone1  CACGCGCGCTACACTGATGCAATCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTAATC
18S clone11 .....
18S clone2  .....C.....
18S clone3  .....
18S clone5  .....
18S clone7  .....
18S clone9  .....
18S clone10 .....
18S clone17 .....T.....T.....C.T.....
18S clone18 .....T.....T.....C.T.....
18S clone15 .....T.....T.....C.T.....
18S clone14 .....T.....T.....C.T.....
18S clone16 .....T.....T.....C.T.....

                    610      620      630      640      650      660
18S clone1  TTTGAAACTGCATCGTGATGGGGTAGATTATTGCAATTATTAACTTCAACGAGGAATG
18S clone11 .....
18S clone2  .....
18S clone3  .....
18S clone5  .....
18S clone7  .....
18S clone9  .....
18S clone10 .....G..
18S clone17 .....G.....
18S clone18 .....G.....
18S clone15 .....G.....
18S clone14 .....G.....
18S clone16 .....G.....

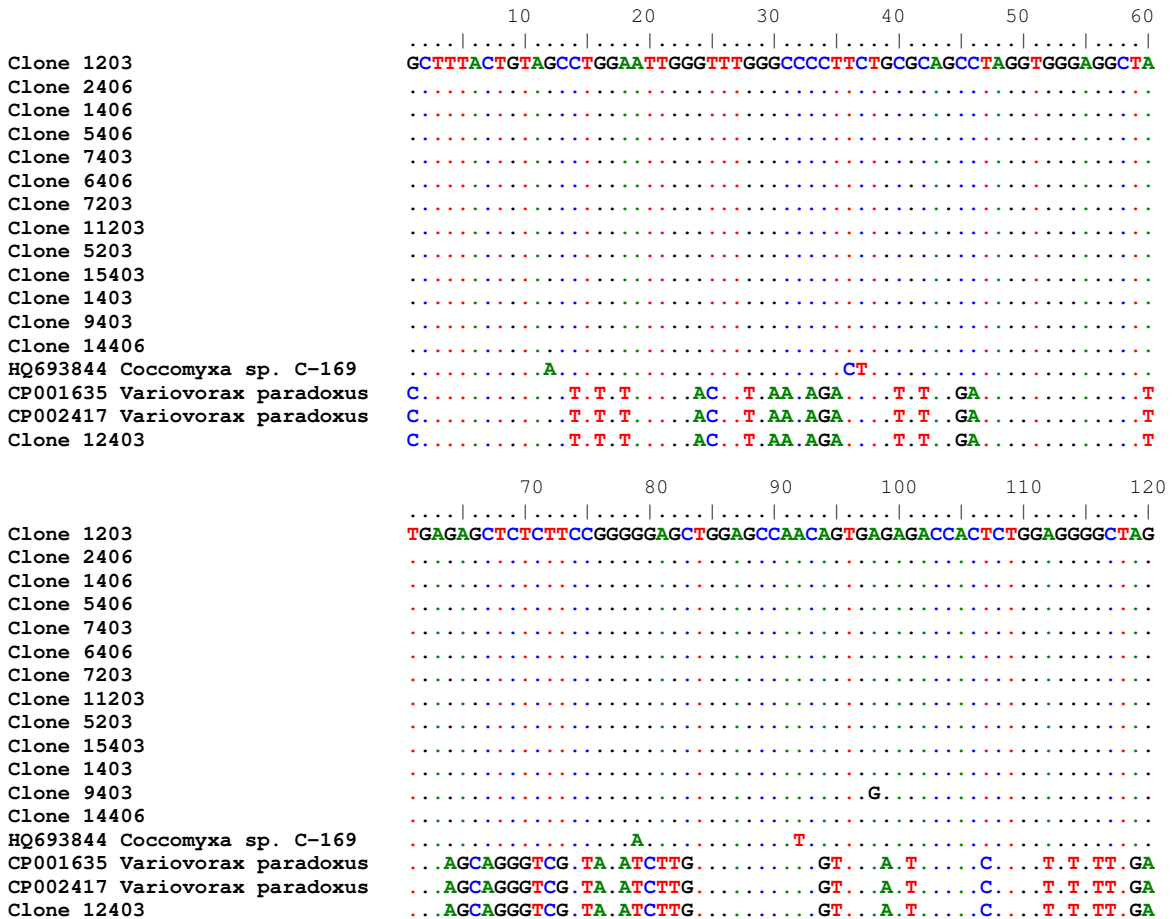
                    670      680
18S clone1  CCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCG
18S clone11 .....
18S clone2  .....
18S clone3  .....
18S clone5  .....
18S clone7  .....
18S clone9  .....
18S clone10 .....
18S clone17 .....
18S clone18 .....
18S clone15 .....
18S clone14 .....
18S clone16 .....

```

III. Ramo do dendrograma com os clones de *Chlamydomonas* e os clones não cultivados de Rio Tinto.



IV. Alinhamento obtido para os isolados da microalga do género *Coccomyxa* e para a bactéria acompanhante, com o marcador 23S rDNA



Anexos

	130	140	150	160	170	180
Clone 1203	AATCCTAATGGCGCTCCTTGAAGCAGGACGCTTGACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTGACTG					
Clone 2406A.....					
Clone 1406					
Clone 5406					
Clone 7403					
Clone 6406					
Clone 7203					
Clone 11203					
Clone 5203					
Clone 15403					
Clone 1403					
Clone 9403G.....					
Clone 14406					
HQ693844 <i>Coccomyxa</i> sp. C-169	...T...T...A...A.....					
CP001635 <i>Variovorax paradoxus</i>	GG.T...CCTA.G..A.T.T-.T..TCGGG...GCAT..A.....					
CP002417 <i>Variovorax paradoxus</i>	GG.T...CCTA.G..A.T.T-.T..TCGGG...GCAT..A.....					
Clone 12403	GG.T...CCTA.G..A.T.T-.T..TCGGG...GCAT..A.....					
	190	200	210	220	230	240
Clone 1203	GGGCGGTCACCTCCATAAAGGGTAACGGAGGTGTGCAAAGGTCCCCCTCAGGCTGGACGGAA					
Clone 2406					
Clone 1406					
Clone 5406G.....					
Clone 7403					
Clone 6406					
Clone 7203	...C.....					
Clone 11203G.....					
Clone 5203					
Clone 15403					
Clone 1403					
Clone 9403					
Clone 14406					
HQ693844 <i>Coccomyxa</i> sp. C-169A.....T.....					
CP001635 <i>Variovorax paradoxus</i>T...C...C.....A..T.G...A.G..AGTTAC..T...C					
CP002417 <i>Variovorax paradoxus</i>T...C...C.....A..T.G...A.G..AGTTAC..T...C					
Clone 12403T...C...C.....A..T.G...A.G..AGTTAC..T...C					
	250	260	270	280	290	300
Clone 1203	ATCAGCCGTAGAGTGTAAAGGCATAAGGGGGCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAG					
Clone 2406					
Clone 1406					
Clone 5406					
Clone 7403					
Clone 6406					
Clone 7203					
Clone 11203					
Clone 5203					
Clone 15403					
Clone 1403G.....					
Clone 9403					
Clone 14406					
HQ693844 <i>Coccomyxa</i> sp. C-169					
CP001635 <i>Variovorax paradoxus</i>	...GTGACG.T...C..T.....C.T...A...G...TG.....					
CP002417 <i>Variovorax paradoxus</i>	...GTGACG.T...C..T.....C.T...A...G...TG.....					
Clone 12403	...GTGACG.T...C..T.....C.T...A...G...TG.....					

Anexos

	310	320	330	340	350	360
Clone 1203	GGGCGAAAGCCGGCC	TTAGTGATCCGACGGT	GCCGAGT	GGAAGGGCCG	TCGCTCAACGGA	
Clone 2406
Clone 1406
Clone 5406
Clone 7403
Clone 6406
Clone 7203
Clone 11203
Clone 5203
Clone 15403
Clone 1403
Clone 9403
Clone 14406
HQ693844 <i>Coccomyxa</i> sp. C-169
CP001635 <i>Variovorax paradoxus</i>	AT.....	A.A.A.	GT..T.T.TA.	A.....
CP002417 <i>Variovorax paradoxus</i>	AT.....	A.A.A.	GT..T.T.TA.	A.....
Clone 12403	AT.....	A.A.A.	GT..T.T.TA.	A.....
Clone 1203	TAAAAGTTA				
Clone 2406				
Clone 1406				
Clone 5406				
Clone 7403				
Clone 6406				
Clone 7203				
Clone 11203				
Clone 5203				
Clone 15403				
Clone 1403				
Clone 9403				
Clone 14406				
HQ693844 <i>Coccomyxa</i> sp. C-169				
CP001635 <i>Variovorax paradoxus</i>G..				
CP002417 <i>Variovorax paradoxus</i>G..				
Clone 12403G..				

V. Alinhamento obtido para os isolados da microalga do género *Chlamydomonas* e para a bactéria acompanhante, com o marcador 23S rDNA

```

          10      20      30      40      50      60
Clone 132602  GCTTGACTGTATCCTGGAATTGGGTTTCGGGCTTTTCTTGCGCAGCCTAGGTGGGAGGCTA
Clone 52601  .....
Clone 72601  .....G.....
Clone 92601  .....
Clone 152601 .....
Clone 62602 .....
Clone 92602 .....
Clone 122602 .....
L43353 Chlamydomonas geitleri .....
Clone 132601 C...T...C.G.T.T.C.G...CA..A.AAGAG.GC..T.T..GA...C.....AT
Clone 142601 C...T...C.G.T.T.C.G...CA..A.AAGAG.GC..T.T..GA...C.....AT
AP012035 Acidiphilium multivor C...T...C.G.T.T.C.G...CA..A.AAGAG.GC..T.T..GA...C.....AT

          70      80      90      100     110     120
Clone 132602  TGATGATTTTCTTCCGGGAAAATTGGAGCCAACATTGAGAGACCCTCTGGAAGAGCTAG
Clone 52601  .....
Clone 72601  .....
Clone 92601  .....
Clone 152601 .....
Clone 62602 .....
Clone 92602 .....
Clone 122602 .....
L43353 Chlamydomonas geitleri ..A.G..CC.....GG...T...T.....
Clone 132601 ..AACCAGGGCG.TA.CTTTCGG.....C...A.T...G.C...CGC.CTT.T.
Clone 142601 ..AACCAGGGCG.TA.CTTTCGG.....C...A.T...G.C...CGC.CTT.T.
AP012035 Acidiphilium multivor ..AACCAGGGCG.TA.CTTTCGG.....C...A.T...G.C...CGC.CTT.T.

          130     140     150     160     170     180
Clone 132602  AATCCTAATGGTGATCTTTGAATCAAGACACTTGACAGTTTCAGGTGGGCAGTTTATCTG
Clone 52601  .....
Clone 72601  .....
Clone 92601  .....
Clone 152601 .....
Clone 62602 .....
Clone 92602 .....
Clone 122602 .....
L43353 Chlamydomonas geitleri .....
Clone 132601 .TGT...CC.C.GC.GG.T.TC.TG.T-.GG..CC.GCAT.....GA...
Clone 142601 .TGT...CC.C.GC.GG.T.TC.TG.T-.GG..CC.GCAT.....GA...
AP012035 Acidiphilium multivor .TGT...CC.C.GC.GG.T.TC.CG.T-.GG..CC.GCAT.....GA...

```


Anexos

```

                190      200      210      220      230      240
Clone 132602   GGGCGGATACCTCCTAAAGTGTAACGGAGGTGTGCAAAGGTTCTCTCAGTCTGGACGGAA
Clone 52601   .....
Clone 72601   .....
Clone 92601   .....
Clone 152601  .....
Clone 62602   .....
Clone 92602   .....
Clone 122602  .....
I43353 Chlamydomonas geitleri .....G.....C.....C.....
Clone 132601  .....TCG.....A.....C.C.G.T..GGG...AG.C.T..C
Clone 142601  .....TCG.....A.....C.C.G.T..GGG...AG.C.T..C
AP012035 Acidiphilium multivor .....TCG.....A.....C.C.G.T..GGG...AG.C.T..C

                250      260      270      280      290      300
Clone 132602   ATCAGACATTGAGTGCAAAGGCCAAAAGAGAGCTTGACTGTAAGACCAACAAGTCGAGCAG
Clone 52601   .....
Clone 72601   .....
Clone 92601   .....
Clone 152601  .....
Clone 62602   .....
Clone 92602   .....
Clone 122602  .....
I43353 Chlamydomonas geitleri .....G.CTG.....T..T..CCC.C.....CG..G.G..GC..
Clone 132601  .....G.CTG.....T..T..CCC.C.....CG..G.G..GC..
Clone 142601  .....G.CTG.....T..T..CCC.C.....CG..G.G..GC..
AP012035 Acidiphilium multivor .....G.CTG.....T..T..CCC.C.....CG..G.G..GC..

                310      320      330      340      350      360
Clone 132602   GGGCGAAAGCCGGCCTTAGTGATCCGACGGTGCCGTGTGGAAGGGCCCTCGCTCAACGGAA
Clone 52601   .....
Clone 72601   .....
Clone 92601   .....
Clone 152601  .....
Clone 62602   .....
Clone 92602   .....
Clone 122602  .....A.....
I43353 Chlamydomonas geitleri .....A.A.....T.....A.....GT..T.AC.....A.....
Clone 132601  .....A.A.....T.....A.....GT..T.AC.....A.....
Clone 142601  .....A.A.....T.....A.....GT..T.AC.....A.....
AP012035 Acidiphilium multivor .....A.A.....T.....A.....GT..T.AC.....A.....

                .....
Clone 132602   TAAAAGTTA
Clone 52601   .....
Clone 72601   .....
Clone 92601   .....
Clone 152601  .....
Clone 62602   .....
Clone 92602   .....
Clone 122602  .....
I43353 Chlamydomonas geitleri .....G..
Clone 132601  .....G..
Clone 142601  .....G..
AP012035 Acidiphilium multivor .....G..

```