

DÉBORA MACHADO CORRÊA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
CIANOBACTÉRIAS DA ANTÁRTICA MARÍTIMA E POTENCIAL PARA
BIODEGRADAÇÃO E BIOINDICAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS
POR HIDROCARBONETOS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C824c
2012

Corrêa, Débora Machado, 1982-

Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias da Antártica Marítima e potencial para biodegradação e bioindicação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos / Débora Machado Corrêa. – Viçosa, MG, 2012.

ix, 63f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-52

1. Cianobactérias. 2. Solos - Poluição - Antártida.
 3. Indicadores biológicos. 4. Biodegradação.
 5. Hidrocarbonetos. 6. Antártida. 7. Solos - Remediação.
 8. Comunidades vegetais. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22. ed. 579.39

DÉBORA MACHADO CORRÊA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
CIANOBACTÉRIAS DA ANTÁRTICA MARÍTIMA E POTENCIAL PARA
BIODEGRADAÇÃO E BIOINDICAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS
POR HIDROCARBONETOS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.**

APROVADA: 29 de fevereiro de 2012.

Míriam Abreu Albuquerque
(Coorientadora)

Antônio Galvão do Nascimento
(Coorientador)

Silvana de Queiroz Silva

Péricles Leonardo Fernandes

Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer
(Orientador)

Dedico este trabalho à Professora Rosane Maria de Aguiar Euclides (1955-2011), minha orientadora desde os primeiros passos no mundo acadêmico, que me abriu os olhos para a beleza das cianobactérias e para a importância de tantas outras questões relativas à vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo presente da vida e por me dar meios para alcançar meus objetivos.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de cursar meu Doutorado.

À Petrobrás, à CAPES/INCT da Criosfera e CAPES/REUNI pela concessão das bolsas de estudos.

Ao Programa Antártico Brasileiro, pela oportunidade de integrar três Operações Antárticas e de conhecer este continente fabuloso, que é a Antártica.

Aos meus pais e aos meus irmãos, que sempre me incentivaram a ir mais longe, a buscar novos desafios e que são minha referência na vida. Graças a vocês, sei a benção que é ter uma família unida, estável e agora mais feliz com a chegada de João Vítor.

Aos meus familiares que sempre me deram apoio, em especial à Tia Tel, Tia Eliana, Tia Helena, aos meus primos Marcus, Samuel, José Antônio e à cunhada Eni.

Aos amigos, Daniela e Nathália Von Rondon, Paula Werneck, Juliana Ribeiro, Rodrigo Amaral, Marco Antônio, Harley Oliveira e Márcio Medeiros, que mesmo depois de tanto tempo longe continuam queridos.

Às amigas com as quais dividi minha casa aqui em Viçosa, Karina Lucas, Olímpia Moura, Maggie Stevens, Sabrina Jales e Renata de Paula.

Aos amigos, Renan, Claudinéia, Alberto, Adriana, Ana Paula, Simone e Marcus, pessoas que foram meus companheiros, minha força, minha fonte de alegria durante os anos de doutorado.

Aos amigos da Unidade de Crescimento de Plantas, Robson, Mariana, Thaís, Rinamara, Aline, Samuel, Renato, Rogério Gomide e João Bosco.

Aos antárticos, Renato, Priscila, Marcel, Adriano, Ulysses, Prof. Elpídio, Prof. Batista, Everton, Guilherme, Lucas, Ivan e Thiago, que dividiram comigo experiências fabulosas. Aos alpinistas Baretta, Helena, Roberto e Olavo, pelo apoio e amizade.

A todos das Estações de Pesquisa Escudeiro (Chile), Jubany e Baía Esperanza (Argentina) pelo apoio e acolhimento durante o campo na Antártica.

Aos meus coorientadores, Profª. Míriam Albuquerque e Prof. Antônio Galvão, pela contribuição ao trabalho e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Schaefer pela orientação, compreensão, generosidade e fonte de um ideal a ser alcançado.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS GERAIS	5
CAPÍTULO I - Comunidade de cianobactérias de ambientes terrestres e de água doce da Antártica marítima	6
1 – Introdução	7
2 – Materiais e Métodos	9
2.1 - Áreas investigadas e amostragem	9
2.2 - Isolamento e caracterização morfológica	10
2.3 - Seleção de linhagens e caracterização molecular	10
3 – Resultados e Discussão	11
4 – Conclusões	19
CAPÍTULO II - Efeito de hidrocarbonetos aromáticos sobre o crescimento da cianobactéria antártica <i>Phormidium autumnale</i> UFV-ANT01	20
1 – Introdução	21
2 – Materiais e Métodos	23
2.1 - Reagentes químicos	23
2.2 – Material Biológico	23
2.3 – Condições	23
2.4 – Amostragem e avaliação de crescimento de cianobactérias	24
2.5 – Cálculo do valor inibitório de crescimento de cianobactérias expostas a hidrocarbonetos	24
3 – Resultados e Discussão	25
4 – Conclusões	29
Capítulo III - Interação entre cianobactérias antárticas e bactérias na	30

biodegradação de [¹⁴C]naftaleno

1 – Introdução	31
2 – Materiais e Métodos	33
2.1 - Reagentes químico	33
2.2 – Material Biológico	33
2.3 – Condições experimentais	34
2.4 – Coleta e detecção de ¹⁴CO₂ mineralizado	34
2.5 – Detecção de ¹⁴C incorporado à biomassa de cianobactérias	35
2.6 – Análise de dados	36
3 – Resultados e Discussão	36
3.1 – Experimento de degradação de [¹⁴C]naftaleno	36
3.2 – Fracionamento do ¹⁴C incorporado à biomassa	42
4 – Conclusões	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I – Registro Fotográfico de diferentes ambientes encontrados na Antártica Marítima	53
ANEXO II – Registro Fotográfico de Cianobactérias Antárticas	54
ANEXO III - Meios de Cultivo	56
ANEXO IV – Caracterização molecular de isolados de cianobactérias	59
ANEXO V - Aparato Respirométrico	62

RESUMO

CORRÊA, Débora Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias da Antártica Marítima e potencial para biodegradação e bioindicação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.** Orientador: Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer. Coorientadores: Míriam Abreu Albuquerque e Antônio Galvão do Nascimento.

A análise da comunidade de cianobactérias presentes em amostras de solos, lagos e canais de degelo de três áreas pertencentes ao domínio da Antártica Marítima revelou 37 taxa do Phylum Cyanophyta, com dominância da Ordem Oscillatoriales. Os organismos de maior distribuição nas amostras são pertencentes aos gêneros *Phormidium* spp., *Leptolyngbya* spp. e *Nostoc* spp.. Dezesete taxa foram isolados e mantidos em cultivo no Banco de Algas do Laboratório de Ficologia – DBV/UFV. Diante da preocupação com o impacto decorrente da contaminação do ambiente antártico com hidrocarbonetos derivados do petróleo sobre as comunidades microbianas, foi testado o efeito de três hidrocarbonetos aromáticos sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01. Parâmetros toxicológicos como NOEC, EC20 e EC50 foram estimados. A toxicidade observada sobre o crescimento da cianobactéria testada seguiu a ordem: benzo- α -pireno > antraceno > naftaleno. Concentrações de benzo- α -pireno quatrocentas e cinquenta vezes menores que as de naftaleno são suficientes para causar a mesma toxicidade sobre *Phormidium autumnale* UFV-ANT01. As populações desta cianobactéria podem ser uma ferramenta útil no biomonitoramento de áreas contaminadas com hidrocarbonetos. A biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos pode ser uma alternativa de baixo custo e ecologicamente viável nos ambientes antárticos. A habilidade de três isolados de cianobactérias em degradar [^{14}C]naftaleno, a 15°C, foi testada. As linhagens *Phormidium autumnale* UFV-ANT01, *Nostoc* sp. UFV-ANT23 e *Tolypothrix* sp. UFV-ANT22 foram testadas em culturas unialgais e em consórcio com bactérias heterotróficas, em comparação a um controle bacteriano e um controle abiótico. Após duzentas horas de exposição ao hidrocarboneto marcado, os tratamentos em consórcio se mostram mais efetivos na degradação do naftaleno que os tratamentos monoclonais e os controles. As taxas de mineralização cumulativas foram de 42%, 39% e 32% para os tratamentos *Nostoc* em consórcio, *Phormidium* em consórcio e *Tolypothrix* em consórcio, respectivamente, enquanto que o controle bacteriano degradou cerca de 11% do hidrocarboneto adicionado. Os

tratamentos monoclonais degradaram entre 2,6 e 4,2% do hidrocarboneto adicionado, sendo considerados menos eficazes que o controle bacteriano, mas não foram estatisticamente diferentes do controle abiótico (1,9%). A cinética de biodegradação observada foi similar à observada por outros autores para modelos expostos a baixas concentrações de hidrocarbonetos, nos quais o ataque microbiano ao contaminante se inicia logo após a aplicação dos tratamentos. As taxas de degradação observadas para os tratamentos em consórcio foram superiores à soma das taxas obtidas para os tratamentos unialgais e o controle bacteriano, sugerindo que as cianobactérias exerçam um papel importante no processo de biodegradação, disponibilizando nutrientes, oxigênio e imobilizando os reais biodegradadores.

ABSTRACT

CORRÊA, Débora Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from Maritime Antarctic and potential on hydrocarbon biodegradation and bioindication in contaminated environments.** Adviser: Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer. Co-advisers: Miriam Abreu Albuquerque and Antônio Galvão do Nascimento.

The analyses of cyanobacterial communities in soil, lakes and glacial streams samples of three areas within the Maritime Antarctic domain revealed 37 cyanobacterial taxa, with majority belonging to Oscillatoriales Order. The most widespread organisms belonged to genera *Phormidium* spp., *Leptolyngbya* spp. and *Nostoc* spp.. Seventeen strains were isolated and kept in culture into the Banco de Algas do Laboratório de Ficologia – DBV/UFV. Given the concern about the impact of the Antarctic environmental contamination with petroleum hydrocarbons on microbial communities, we tested the effect of three aromatic hydrocarbons on the growth of *Phormidium autumnale* UFV-ANT01. Toxicological data such as NOEC, EC20 and EC50 were estimated. The toxicity observed on the growth of cyanobacteria tested followed the order: α -benzo-pyrene > anthracene > naphthalene. Concentrations of benzo- α -pyrene four hundred and fifty times smaller than those of naphthalene are sufficient to cause the same toxicity on *Phormidium autumnale* UFV-ANT01. Populations of cyanobacteria can be a useful tool for the biomonitoring of areas contaminated with hydrocarbons. Bioremediation can be a low cost and ecologic alternative to solve hydrocarbon contamination problems in Antarctic soils. The ability of three cyanobacterial strains in degrading [¹⁴C]naphthalene was tested under 15°C. Cyanobacterial lineages *Phormidium autumnale* UFV-ANT01, *Nostoc* sp. UFV-ANT23 and *Tolypothrix* sp. UFV-ANT22 was selected due its important contribution to Antarctic microbial mats. Cyanobacteria was investigated in monoclonal cultures and in consortia with heterotrophic bacteria, in comparison with bacterial and abiotic controls. After 200 hours of exposure to labeled hydrocarbons, treatments corresponding to consortia proved to be more effective in [¹⁴C]naphthalene than the monoclonal treatments and controls. Cumulative mineralization rates were 42%, 39% and 32%, for *Nostoc* consortia, *Phormidium* consortia and *Tolypothrix* consortia respectively, while bacterial control mineralized 11% of the added hydrocarbon. Monoclonal treatments degraded 2,6 to 4,2% of naphthalene added and were considered less effective than

bacterial control, but did not differ from abiotic control (1,9%). Degradation kinetics was similar to those previously reported by other authors for low hydrocarbon concentrations models, in which microbial hydrocarbon attack begins shortly after the contaminant was added to treatments. The rates of hydrocarbon degradation observed to consortia treatments were superior to the sum of individual monoclonal ones and the bacterial control, indicating that cyanobacteria had played a important role in the biodegradation process, providing moisture, nutrients, oxygen and immobilizing the biodegraders microorganisms.

INTRODUÇÃO GERAL

A Antártica representa um ambiente de condições extremas e de isolamento geográfico para o desenvolvimento dos organismos. A Antártica marítima apresenta um regime climático muito mais ameno que o observado em sua porção continental, atingindo médias de temperaturas nos meses mais quentes do ano, entre 0 e 10°C (Setzer et al., 2004.)

Durante o verão (de dezembro a março) ocorre o degelo de grandes áreas, expondo florações rochosas e solos; estas áreas são colonizadas primariamente por diversas espécies de líquens, cianobactérias e microalgas que proporcionam condições favoráveis ao estabelecimento de briófitas e vegetais superiores e à formação de solo superficialmente. A água proveniente do degelo de glaciares, do *permafrost* e de bancos de neve abastece lagos, pequenos tanques e forma cachoeiras, cursos de água e canais de degelo menores que correm até chegarem ao mar. Este cenário apresenta microecótopos colonizados predominantemente por comunidades de cianobactérias, especializadas em tamanho grau, em termos de composição de espécies e estruturação da biocenose, que diferem substancialmente de comunidades observados em outras áreas do globo terrestre (Komárek, 1999).

O sucesso das cianobactérias nestes ambientes extremos é, geralmente, atribuído a sua tolerância à dessecação, a ciclos de congelamento e degelo, à radiação solar contínua e à radiação ultravioleta excessiva (Ehling-Schulz & Scherer, 1999).

Entre as estratégias fisiológicas que garantem a tolerância a tais adversidades podem ser destacadas a excreção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que estão envolvidos numa série de funções, incluindo tolerância à dessecação e ao congelamento, adesão a diferentes substratos, bem como motilidade (Phillipis & Vincenzini, 1998).

Dentre os mecanismos utilizados pelas cianobactérias para evitar ou atenuar os efeitos da radiação UV podemos destacar: a síntese de substâncias que absorvem a radiação UV (como sitoneminas e aminoácidos semelhantes a micosporinas) (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993); incremento das concentrações de carotenóides para diminuir danos causados por espécies reativas de oxigênio (Vincent & Quesada, 1994); e a modulação da quantidade de exposição a UV que atinge fisicamente na comunidade, alterando a posição dos organismos na coluna de água, ou desenvolvendo-se sob outros organismos (Donkor & Häder, 1995; Quesada *et al.*, 1999). Outras espécies de

cianobactérias possuem mecanismos de reparo que lhe permitem reconstruir moléculas como enzimas e DNA (Tang & Asato, 1978; O'Brien & Houghton, 1982; Liu & Yang, 2003).

Apesar da reconhecida contribuição destes microrganismos aos ecossistemas antárticos, pouco se conhece sobre sua comunidade de cianobactérias e os poucos trabalhos de florística existentes na literatura adotam sistemas de classificação diferentes (Komárek & Elster, 2008; Komárek & Komárek, 1999; Komárek, 1999; Pizarro *et al.*, 2002; Vinocour & Pizarro, 1994). É de fundamental importância conhecer a diversidade de cianobactérias, sua distribuição, evolução e suas relações na ciclagem de nutrientes nos ambientes antárticos, para isto uma abordagem polifásica, combinando aspectos moleculares e morfológicos deve ser empregada para análise de tais comunidades.

Mataloni *et al.* (2005) aponta as cianofíceas *Chamaesiphon subglobosus* e *Leptolyngbya* sp. como dominantes em comunidades epilíticas de dois ambientes lóticos da Península Antártica.

As Cyanophyta são apontadas como dominantes nas comunidades bentônicas de sete lagos de Victoria Land, sendo *Phormidium frigidum* e *Lyngbya martensiana* os taxa mais representativos, seguidos de vários representantes do Phylum Bacillariophyta. Neste ambiente *P. frigidum* foi capaz de crescer mesmo em condições de anaerobiose (Parker & Simmons, 1985).

Os ecossistemas antárticos são considerados os menos alterados do globo terrestre, porém a atividade humana (i.e., turismo, pesquisa, atividades militares) no continente tem se intensificado e causado impactos. As estações de pesquisa na Antártica, que demandam grandes quantidades de combustível fóssil para aquecimento e realização de atividades logísticas, constituem uma importante fonte de poluição orgânica para os solos da região, sendo a contaminação por hidrocarbonetos (HCs) causada devido a problemas durante seu transporte, uso e disposição final, além daquela gerada pela incineração de resíduos sólidos (Santos, 2004).

Regiões impactadas por derramamentos de petróleo e derivados, geralmente, sofrem alterações na estrutura de suas comunidades microbianas, sendo que espécies sensíveis a HCs são, muitas vezes, eliminadas e substituídas por outras tolerantes ou consumidoras de HCs (Gerdes, *et al.*, 2005).

Biofilmes compostos predominantemente por cianobactérias, em termos de biomassa, são frequentemente observados recolonizando áreas contaminadas por

hidrocarbonetos, indicando um possível papel destas comunidades na biodegradação deste poluente (Höpner *et al.*, 1996; Radwan *et al.*, 2001; Barth, 2003).

A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em formas menos tóxicas, as quais são então integradas aos ciclos biogeoquímicos naturais é chamada de biodegradação (Margesin & Schinner, 2001). Como a presença de hidrocarbonetos (HCs) na biosfera acompanha a história da vida, isto pode explicar por que muitos organismos têm adquirido vias para fazer uso destes compostos como substratos de crescimento (Widdel & Rabus, 2001).

A biorremediação é uma tecnologia não destrutiva, de grande efetividade, de baixo custo e, algumas vezes, operacionalmente favorável que visa acelerar o processo natural de biodegradação de contaminantes pela otimização dos fatores que limitam este fenômeno (Allard & Neilson, 1997). O uso de organismos capazes de degradar compostos como os HC, nos processos de biorremediação, é de extrema importância por se tratar de uma alternativa de baixo custo, de alta efetividade e de caráter menos invasivo, sob o ponto de vista ecológico (Allard & Neilson, 1997).

Grötzschel *et al.* (2002) demonstraram a degradação de quatro HCs por um biofilme composto por cianobactérias e bactérias heterotróficas. As técnicas moleculares empregadas pelos autores não demonstraram diferenças significativas na composição dos biofilmes, durante o período de exposição aos HCs.

Al-Awadhi *et al.* (2003) demonstraram a capacidade de biofilmes de cianobactérias em degradar HCs, sugerindo a aplicação de biofilmes artificiais de cianobactérias (produzidos em laboratório), como filtros, nos processos de remediação de rejeitos líquidos contaminados com compostos derivados de petróleo, antes dos mesmos serem liberados no ambiente. Nestes biofilmes artificiais, os autores destacam o papel das cianobactérias como colonizadoras primárias, aderindo-se eficientemente à superfície sólida artificial e imobilizando as bactérias biodegradadoras.

Sánchez *et al.* (2006) relataram a degradação de HCs alifáticos e aromáticos, num sistema do tipo cultura contínua, por um consórcio de cianobactérias e bactérias heterotróficas. Através das técnicas moléculares, demonstraram alterações na composição do biofilme, sendo que ao final do experimento não foram detectadas cianobactérias no sistema, indicando que estes organismos não foram capazes de utilizar os HCs como a única fonte de carbono.

Espécies de cianobactérias sensíveis a estes poluentes podem ser utilizadas como bioindicadoras da presença de HCs no ambiente (Al-Tukair, 2002). Os bioindicadores são organismos capazes de gerar respostas mensuráveis, chamadas de biomarcadores, que possam ser relacionadas a sua exposição à baixas concentrações de poluentes ambientais.

O enriquecimento do ambiente antártico com poluentes orgânicos, como os HCs, em decorrência da atividade humana, torna extremamente necessário o desenvolvimento de programas de biomonitoramento, que através da identificação de bioindicadores, nos permitam perceber rapidamente mudanças no meio causadas pelos HCs, prevenindo impactos de grandes dimensões ambientais e de técnicas efetivas de biorremediação, que possam atenuar os impactos causados ao ambiente por estes contaminantes.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram: 1) Gerar informação a respeito da diversidade de cianobactérias da Antártica Marítima, identificando e isolando espécies de cianobactérias utilizando critério taxonômico morfológico e molecular para linhagens selecionadas para os demais experimentos; 2) Avaliar o efeito de diferentes concentrações dos hidrocarbonetos naftaleno, antraceno e benzo- α -pireno sobre a produção de biomassa de cianobactérias selecionadas, buscando organismos com potencial para serem utilizados como bioindicadores de ambientes contaminados por estes hidrocarbonetos. 3) Avaliar a capacidade de degradação de naftaleno por isolados de cianobactérias e por cianobactérias em consórcios bacterianos.

CAPÍTULO I

Comunidade de cianobactérias de ambientes terrestres e de água doce da Antártica marítima.

1 – Introdução

As cianobactérias desempenham um importante papel na colonização e produção primária em áreas livres de gelo na Antártica, sendo apontadas como os organismos fotoautotróficos dominantes de ambientes terrestres e de água doce, que geralmente, se estruturam na forma de biofilmes que recobrem o substrato.

A Antártica Marítima apresenta ecossistemas terrestres ricos em cianobactérias, independentemente da disponibilidade de nutrientes limitantes para o desenvolvimento microbiano, como o nitrogênio, dada a capacidade deste grupo de realizar a fixação biológica do nitrogênio. Nesta região, as Cyanophyta representam um dos grupos de organismos que oferecem maior contribuição para a formação dos solos e a incorporação de carbono e nitrogênio nos ciclos biogeoquímicos.

Durante o verão, com o degelo, água carreando nutrientes escoam dos glaciares formando rios ou canais que, em seu trajeto vão se infiltrando, alimentam lagos, pequenos tanques e desembocam nas áreas mais baixas, alagando as planícies costeiras até atingir o mar. Neste contexto, observam-se diferentes ecótipos, com condições ecológicas variáveis de limitação para a biocenose, constituindo um interessante cenário para o estudo da estrutura da comunidade de cianobactérias da região. Komárek & Komárek (2009) consideram os biótipos da Antártica marítima singulares, sendo os biótipos ali encontrados especializados em tamanho grau aos microambientes que ocupam que diferem dos organismos encontrados em outras partes do globo terrestre, incluindo outras regiões da Antártica.

Em várias regiões da Antártica, biofilmes compostos predominantemente por cianobactérias da ordem Oscillatoriales ocorrem em lagos, canais de degelo, tanques temporários e em vales secos (Broady & Kibblewhite, 1991; Nadeau & Castenholz, 1999; Casamatta *et al.*, 2005).

Apesar de existirem trabalhos sobre as comunidades de cianobactérias de algumas áreas da Antártica marítima (Komárek & Komárek, 1999; Vinocur & Pizarro, 1995; Lucinska & Kyc, 1993; Mataloni *et al.*, 2005), não existe consenso sobre a porcentagem de espécies de cianobactérias endêmicas da região, sendo que, para alguns autores, estas comunidades são dominadas por espécies cosmopolitas, baseando-se sobretudo em critérios morfológicos. A grande eficiência de dispersão destes organismos e o fato de que as áreas livres de gelo são relativamente recentes, são outros argumentos que suportam o baixo índice de endemismo na região.

Os objetivos deste trabalho foram: identificar, em nível morfológico, as comunidades perifíticas, epilíticas e edáficas de cianobactérias que ocorrem em ambientes terrestres da Baía Esperança (Península Antártica), Cabo Lions Rump e Península Potter (Ilha Rei George) levando-se em conta os diferentes tipos de ecótopos observados na região; e também o isolamento e caracterização morfológica de cianobactérias para a criação de um banco de organismos que possam servir para o levantamento de novas informações de relevância para as comunidades destas áreas e que fornecessem inóculo para os experimentos realizados nos outros capítulos deste trabalho.

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Áreas investigadas e amostragem

As áreas amostradas enquadram-se no regime climático da antártica marítima, com médias de temperatura (-1,8° C), umidade relativa do ar e precipitação anuais mais altas que as observadas no interior do continente antártico. A Península Potter (62° 14'S, 58° 38'W) e o Cabo Lions Rump (62° 13'S, 58° 08'W) estão localizados na Ilha Rei George, Ilhas Shetland do Sul, e a Baía Esperança (63° 23'S, 56° 59'W) localiza-se na extremidade noroeste da Península Antártica. Estas regiões são caracterizadas pela presença de inúmeros lagos, tanques e canais de degelo que sustentam grandes comunidades de cianobactérias.

Este estudo foi realizado durante o período de verão dos anos de 2008 e 2009. Um total de 148 amostras compostas de biofilmes de cianobactérias foram coletadas a partir de: solos (S), lagos glaciais (L), lagos ou tanques entre morainas (M), canais de degelo (C), terrenos alagados (A) e paredes rochosas úmidas (R). O ANEXO I ilustra alguns dos ambientes amostrados. Estas amostras foram também classificadas como pristinas (*p*), quando coletadas próximas de glaciares, antropogênicas (*h*), quando coletadas próximas a estações de pesquisa, ou de influência animal (*a*), quando coletadas em ambientes próximos a pinguineiras, ninhais de outras aves e áreas visitadas por focas, lobos e elefantes marinhos.

2.2 - Análise das amostras ambientais

Amostras a fresco foram analisadas sob microscópio ótico, e as espécies observadas foram identificadas morfológicamente com base em literatura apropriada ao contexto do ambiente Antártico (Komárek, 2007; Komárek & Anagnostidis, 2005; Casamatta *et al.*, 2005; Mataloni & Komárek, 2004; Taton *et al.*, 2003; Broady & Kibblewithe, 1991). O registro fotográfico encontra-se no ANEXO II.

Para cada amostra analisada, foram feitas anotações de ocorrência dos taxa, uma estimativa visual da densidade de cada espécie na amostra e posteriormente, foi feito o cálculo da frequência relativa nas amostras avaliadas.

A frequência relativa (FR) de cada espécie foi estimada conforme Singh *et al.*, 2008:

FR = (número de amostras em que a espécie aparece x 100)/ número total de espécies .

2.3 – Isolamento e caracterização morfológica

As amostras foram congeladas a - 20° C e enviadas para o Laboratório de Ficologia (DBV/UFV), no Brasil, onde foram enriquecidas em meio AA4 (suplementados ou não com nitrogênio) (ANEXO III) e mantidas em câmaras de cultivo, sob condições fotoautotróficas, a 15±1 °C ou a 25±2°. Foram realizadas tentativas de isolamento para todos os morfotipos distinguíveis através de técnicas de diluição e micropipetagem (Aguiar, 2000), além de plaqueamento em meio sólido. Os seguintes caracteres morfológicos foram avaliados para os taxa isolados: largura/comprimento celular; largura/comprimento de heterócitos; formato do tricoma (reto, atenuado, curvo); caracterização da célula apical (formato, presença de caliptra ou espessamento da parede); presença de constrições celulares; e presença de bainha mucilaginosa.

2.4 – Seleção de linhagens e caracterização molecular

Dentre as cianobactérias isoladas, aquelas que apresentaram maior crescimento visual em meio líquido com e sem fontes de nitrogênio foram selecionadas para a condução dos experimentos de biodegradação e bioindicação, recebendo além da caracterização morfológica, caracterização molecular.

A região genômica escolhida para a caracterização molecular foi a do gene 16S rRNA. A extração do DNA genômico foi feita conforme Fiore *et al.* (2000). A amplificação por PCR do gene 16S rRNA (±1400pb) foi realizada utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5'-TAGTGTAACGACGGCCAGTAGAGTITGATCCTGGCTCA-3') e 1494R (5'-TAGCAGGAAACAGCTATGACCTACGGCTACCTTGTTACGA-3'), conforme descrito por Neilan *et al.* (1997). As condições de amplificação foram: 94°C, por 4 min; seguido de 30 ciclos, consistindo em 94°C por 20 s, 50°C por 30 s, e 72°C por 2 min. A determinação do tamanho dos produtos de PCR foi feita utilizando-se o padrão Low DNA Ladder Mass (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A clonagem dos fragmentos foi realizada com a ajuda do *kit* pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI,

EUA), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. A introdução do vetor nas células competentes de *E.coli* DH5 α foi feita por meio de choque térmico, conforme Sambrook *et al.* (1989). A reação de PCR de colônias contendo o fragmento do gene selecionado foi feita com os iniciadores CYA359 (5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3') e uma mistura equimolar dos iniciadores 781A (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3') e 781B (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'), nas condições descritas por Nübel *et al.* (1997). A extração do DNA plasmidial foi realizada por hidrólise alcalina, conforme Birnboim & Doly, 1979. A PCR para sequenciamento foi feita com o *kit* DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Foram utilizados 200 ng de DNA e quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores: M13 F/R, 1114 F/R, 357F/R e 704F/R. Após a reação, as amostras foram precipitadas conforme instruções do fabricante do *kit* acima mencionado e enviadas para sequenciamento no sequenciador capilar modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas a sequências depositadas no *GenBank* (NCBI) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para a construção da árvore filogenética, as sequências obtidas foram alinhadas com outras selecionadas a partir do *GenBank*, sendo os métodos de distância evolutiva *Neighbor-Joining* e *Maximum Likelihood* comparados para a obtenção da melhor topologia, utilizando-se o Software MEGA 3.1 (Tamura *et al.*, 2007).

3 – Resultados e Discussão

Durante a análise das amostras, 37 taxa foram reconhecidos; dados sobre a ocorrência, frequência relativa, dominância e habitat estão sumarizados na Tabela 1. A Ordem Oscillatoriales foi a de maior contribuição para a diversidade de espécies e dominante em termos de biomassa. Os organismos de maior distribuição nas amostras são pertencentes aos gêneros *Phormidium* spp., *Leptolyngbya* spp. e *Nostoc* spp.

O processo de isolamento resultou na obtenção de dezessete linhagens, cujas características morfológicas foram apresentadas na Tabela 2. Dentre estas, seis linhagens produziram biomassa considerada suficiente para a condução dos experimentos de biodegradação e bioindicação, sendo ainda caracterizadas molecularmente (sequências geradas disponíveis no ANEXO IV). As relações

evolutivas entre as linhagens selecionadas e outras linhagens antárticas ou provenientes de outras regiões são apresentadas na Figura 1.

Tabela 1: Biodiversidade de cianobactérias, frequência relativa e habitats de ocorrência nas diferentes áreas amostradas.

Taxa	Frequência Relativa ¹	Habitat	Classificação da amostra de origem ²	Local de ocorrência ³		
				PP	LR	BE
Ordem Chroococcales						
<i>Aphanocapsa</i> sp.1	19,4	Perifítico	C, L / p / o	+	+	+
<i>Aphanocapsa</i> sp.2	11,1	Perifítico	C,A / p / o	+		
<i>Chamaesiphon</i> sp.	5,6	Epifítico sobre outras cianobactérias	C,A / p / o	+	+	
<i>Chroococcus</i> sp.	11,1	Perifítico	C / p / o	+	+	
<i>Gloeocapsopsis aurea</i>	5,6	Perifítico	C / p / o	+	+	
Ordem Oscillatoriales						
<i>Blennothrix</i> sp.	5,6	Edáfico/Perifítico	S,C/ a / o	+		
<i>Geitlerinema</i> cf. <i>deflexum</i> (W. et G.S West) Anagnostidis 1989	6,9	Perifítico	S,C,A/ ah / o	+	+	
<i>Jaaginema</i> sp.	*	*	C,A / ah / *	+	+	
<i>Leptolyngbya</i> sp.1	16,6	Perifítico	C,A/ p / o	+	+	+
<i>Leptolyngbya</i> sp.2	66,7	Perifítico	C,A/ p / o	+	+	+
<i>Leptolyngbya</i> sp.3	*	*	L,M,A/ p / *	+	+	+
<i>Leptolyngbya</i> sp.4	130,6	Perifítico	L,C,A/ p / o	+	+	+
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>borchgrevinkii</i> Komárek 2005	63,9	Perifítico	C,A/ a / ●	+	+	
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>nigrecens</i> Komárek 2005	5,6	Perifítico	C/ p / o	+	+	
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>vincentii</i> Komárek 2005	100,0	Perifítico	L,M,A/ ahp / ●	+	+	+
<i>Phormidium</i> cf. <i>autumnale</i> Gomont ex Gomont 1892	116,6	Perifítico/Epilítico/Edáfico	L,S,C,A,R/ ahp / ●	+	+	+
<i>Phormidium</i> cf. <i>murrayi</i> Anagn. et Kom. 1988	8,33	Perifítico	C, D/ pa / ●		+	
<i>Phormidium</i> cf. <i>priestleyi</i> Anagn. et Kom. 1988	19,4	Perifítico	C,D,A/ pa / o	+	+	
<i>Phormidium</i> cf. <i>pseudopriestleyi</i> Anagn. et Kom. 1988	8,3	Perifítico	C,A/ a / o			
<i>Phormidium</i> sp.1	113,9	Perifítico	C,A / a / ●	+	+	
<i>Phormidium</i> sp. 2	11,1	Perifítico/Bentônico	L/ p / ●			+
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>mucicola</i>	30,5	Perifítico sobre <i>N. commune</i>	-	+	+	+
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>fracta</i> Carlson 1913	8,3	Perifítico	C, A/ p / o	+	+	
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>subproboscidea</i> W. et G.S West 1911	8,3	Perifítico/Edáfico	S,C/ a / o	+	+	
<i>Oscillatoria</i> sp.1	13,8	Perifítico	L,C,A/ ph / o	+	+	
<i>Oscillatoria</i> sp.2	11,1	Perifítico/Bentônico	L/ p / ●			+
<i>Schizothrix</i> sp.	25,0	Perifítico	D/ p / ●		+	
Ordem Nostocales						
<i>Anabaena</i> sp.	5,6	Ticoplanctônico (?)	L,C/ p / o		+	
<i>Hydrocoryne</i> sp.	41,6	Perifítico/Bentônico	L,C,A/ ph / o	+	+	+

<i>Nodularia</i> cf. <i>harveyana</i> Thuret ex Bornet et Flahault 1888	16,6	Perifítico/bentônico	L,A/ ps / ○		+	+
<i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bonet et Flahault 1888	30,5	Epilítico	C,A/ pah / ●	+	+	+
<i>Nostoc</i> sp.1	80,6	Perifítico	L,M,C,A/ pa / ○	+	+	+
<i>Nostoc</i> sp.2	19,4	Perifítico	C,A/ pa / ○	+	+	
<i>Nostoc</i> . sp.3	*	*	C,A/ PA/ *	+	+	
<i>Tolypothrix</i> sp.1	63,9	Perifítico/Bentônico	L,M,A/ ph / ●	+	+	+
<i>Tolypothrix</i> sp.2	*	*	L,M,A/ ph		+	
Ordem Stigonematales						
<i>Fischerella</i> sp.	11,1	Epifítico em musgos/epilítico	L,M,C/ ph/ ○	+		
Total				28	31	15

¹ Obtida pelo método proposto por Singh *et al.*, 2008

² Classificação da amostra de origem, letras maiúsculas indicam: terrenos alagados (**A**), canais de degelo (**C**), drenagens com correnteza (**D**), lagos glaciais (**L**), lagos ou tanques entre morainas (**M**), paredes rochosas úmidas (**R**) e solos (**S**); letras minúsculas indicam: influência animal (**a**), antropogênica (**h**) prístina (**p**), sprays salinos (**s**). Símbolos representam a densidade relativa, estimada visualmente: ○ = menos de 20% da biomassa; ● entre 20 e 50% da biomassa; ● = acima de 50% da biomassa.

³ Locais de ocorrência: Península Potter (**PP**), Lions Rump (**LR**) e Baía Esperança (**BE**).

* Detectado somente após enriquecimento das amostras

O número de espécies observadas neste estudo está abaixo do número de espécies observado por Komárek (1999) na Antártica marítima. Isto pode ser atribuído ao fato de que o presente trabalho não acompanha aspectos de sazonalidade e de flutuações populacionais dentro da comunidade de cianobactérias, representando somente um quadro avaliativo da estrutura destas comunidades observada na segunda fase do verão austral. Em contrapartida, outros autores, como Broady (1989), Luscinska & Kyc (1993) e Pizarro *et al.* (1996), observaram um número de espécies semelhante ao obtido para as amostras analisadas.

As amostras provenientes de canais de degelo e áreas alagadas são as que exibem o maior número de morfotipos distinguíveis por amostra analisada. O tipo de ambiente observado mais restritivo para o desenvolvimento de cianobactérias foram paredões de rochas úmidos, nos quais somente foi observada a ocorrência de *Phormidium autumnale*.

Para Komárek & Komárek (2003) os canais de degelo e os terrenos alagados da Antártica marítima são as que possibilitam maior diversidade de cianobactérias. No presente trabalho, vinte e nove taxa, correspondentes a mais de 80% das espécies listadas, ocorrem em pelo menos um destes ambientes. Esta diversidade pode ser explicada pelo constante aporte de nutrientes provenientes dos glaciares, que são carregados pela água de degelo durante os meses de verão.

Tabela 2: Caracterização morfológica das cianobactérias isoladas.

Nº	Taxa	Características Avaliadas						
	Ordem Oscillatoriales	Largura/ Comprimento celular	Largura/ Comprimento de heterócitos	Formato do tricoma	Caracterização da célula apical	Constrições celulares	Bainha mucilaginosa	Coloração
1	<i>Geitlerinema cf. deflexum</i> UFV-ANT07	1/ 2,3	-	Atenuado, levemente curvo	Inflada	Inconstrito	Inconspícua	Verde ciano
2	<i>Jaaginema</i> sp. UFV-ANT06	2,6/4,0	-	Atenuado	Arredondada	Levemente constrito	Inconspícua	Verde pálido
3	<i>Leptolyngbya</i> sp. UFV-ANT05	3,1/3,4	-	Não atenuado	Tende a cônica	Levemente constrito	Fina, firme	Verde ciano/ verde escuro
4	<i>Leptolyngbya</i> sp. UFV-ANT04	2,3/2,3	-	Levemente atenuado	Arredondada	Constrito	Pouco conspícua	Verde ciano
5	<i>Phormidium</i> sp. UFV-ANT03	3,1/1,7	-	Reto	Truncada	Inconstrito	Inconspícua	Verde oliva
6	<i>Phormidium autumnale</i> UFV-ANT01	4,7/3,2	-	Atenuado, levemente curvo	Capitada, caliptra presente	Inconstrito	Inconspícua	Verde oliva
7	<i>Phormidium autumnale</i> UFV-ANT02	5,4/2,3	-	Reto	Arredondada, espessada	Inconstrito	Inconspícua	Verde pálido

Nº	Ordem Nostocales	Largura/ Comprimento celular	Largura/ Comprimento de heterócitos	Formato do tricoma	Caracterização da célula apical	Constrições celulares	Bainha mucilaginosa	Coloração
8	<i>Hydrocoryne</i> sp. UFV-ANT31	4,1/3,0	4,9/5,9	Levemente atenuado	Cônica	Constrito	Fina, firme	Verde ciano
9	<i>Hydrocoryne</i> sp. UFV-ANT32	4,6/3,9	4,8/5,3	Levemente atenuado	Cônica	Constrito	Fina, firme	Verde ciano
10	<i>Nodularia</i> cf. <i>harveyana</i> UFV-ANT33	2,1/0,9	1,8/1,1	Levemente atenuado	Semi-lunada	Constrito	Fina, difluente	Verde ciano
11	<i>Nostoc commune</i> UFV-ANT20	3,3/2,1	3,8/3,2	Não atenuado	Redonda	Constrito	Grossa, firme. Envelope	Verde ciano / marrom
12	<i>Nostoc</i> sp. UFV-ANT23	3,0/2,5	3,1/3,0	Não atenuado	Redonda	Constrito	Grossa. Firme. Envelope	Verde ciano
13	<i>Nostoc</i> sp. UFV-ANT24	4,5/6,3	5,2/6,8	Não atenuado	Redonda	Constrito	Grossa, difluente	Verde ciano
14	<i>Nostoc</i> . sp. UFV-ANT24.B	4,8/5,2	5,5/5,8	Não atenuado	Redonda	Constrito	Grossa, firme	Verde ciano
15	<i>Tolypothrix</i> sp. UFV-ANT22	5,1/6,5	5,5/5,6	Não atenuado	Redonda	Constrito	Fina, firme	Verde ciano/ verde escuro
16	<i>Tolypothrix</i> sp. UFV-ANT25	5,6/5,9	5,3/6,4	Não atenuado	Redonda	Constrito	Fina, firme	Marrom/ negro
Nº	Ordem Stigonematales	Largura/ Comprimento celular	Largura/ Comprimento de heterócitos	Formato do tricoma	Caracterização da célula apical	Constrições celulares	Bainha mucilaginosa	Coloração
17	<i>Fischerella</i> sp. UFV-ANT40	5,4/5,6	5,4/6,4	Ramificações atenuadas	Redonda	Constrito	Inconspícua	Verde ciano

***Organismos em negrito foram selecionados para os experimentos de biodegradação e bioindicação.**

A maioria dos táxons identificados em nível específico, neste trabalho, possui distribuição geográfica ampla, não restrita à Antártica. Dados disponíveis na literatura sobre endemismo de Cyanophyta divergem bastante, variando entre 60% (Komárek, 1999) a menos de 10% (Luscinska & Kyc, 1993; Pizarro *et al.*, 1996). Comparar os dados obtidos com os apresentados por outros autores é um trabalho árduo, já que na pouca literatura existente sobre a região, sejam encontradas algumas listagens de espécies baseadas em chaves voltadas para morfotipos de climas temperados ou tropicais e às vezes, trabalhos com ênfase em caracterizações moleculares que deixam de fora aspectos morfológicos e ecológicos dos organismos estudados.

Utilizando-se a ferramenta BLAST, foi possível encontrar linhagens antárticas depositadas no *Genbank* que apresentaram alta similaridade às sequências geradas para as cianobactérias isoladas neste trabalho. O isolado *Nostoc* sp. UFV-ANT23 apresentou 99% de similaridade à linhagem *Nostoc* sp. ANT. L61.1; *Nostoc* sp. UFV-ANT24 apresentou 99% de similaridade a *Nostoc* sp. ANT. LPR.2.1.

As linhagens *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 e UFV-ANT02, provavelmente representam clones, embora apresentem características morfológicas levemente distintas em cultivo; uma similaridade de 99% para as linhagens foi obtida quando comparadas a *Phormidium autumnale* Arct-Ph5, de origem ártica (Svalbard) e similaridades entre 97 e 99% quando as sequências geradas foram comparadas a outras linhagens de origem antártica. As sequências aqui obtidas enquadram-se num clado consistente formado por linhagens, oriundas de regiões polares, de características morfológicas pertencentes ao grupo *Phormidium autumnale* sensu lato de Anagnostidis & Komárek (2005), assim como observado por outros autores (Comte *et al.*, 2007; Strunecky *et al.*, 2010).

Sequências depositadas no *GenBank* que apresentam similaridade alta com as linhagens *Tolypothrix* sp. UFV-ANT22 e UFV-ANT25 são afiliadas ao gênero *Anabaena*, contudo, sequências afiliadas ao gênero *Tolypothrix* apresentam distância evolutiva grande o suficiente para colocá-las como diferentes gêneros. Não existem sequências de linhagens antárticas disponíveis para o gênero, embora este apareça nas listagens de espécies da Antártica marítima (Komárek, 1999; Komárek & Elster, 2008). A morfologia mais próxima de *Tolypothrix* com sequência depositada no *GenBank*, que possui distribuição na Antártica, pertence ao gênero *Coleodesmium*, porém os

alinhamentos entre a sequência disponível para esta linhagem e as sequências obtidas neste trabalho, apresentaram baixas similaridades (<87%).

A maior parte dos dados moleculares existentes para cianobactérias cultiváveis de origem antártica apontam estes organismos como de distribuição ampla no globo terrestre, enquanto que os dados moleculares não dependentes de cultivo, disponíveis para cianobactérias da região, apontam índices de endemismo altos, evidenciando a limitação das técnicas moleculares dependentes de cultivo para acessar a diversidade de cianobactérias da antártica (Taton *et al.*, 2003).

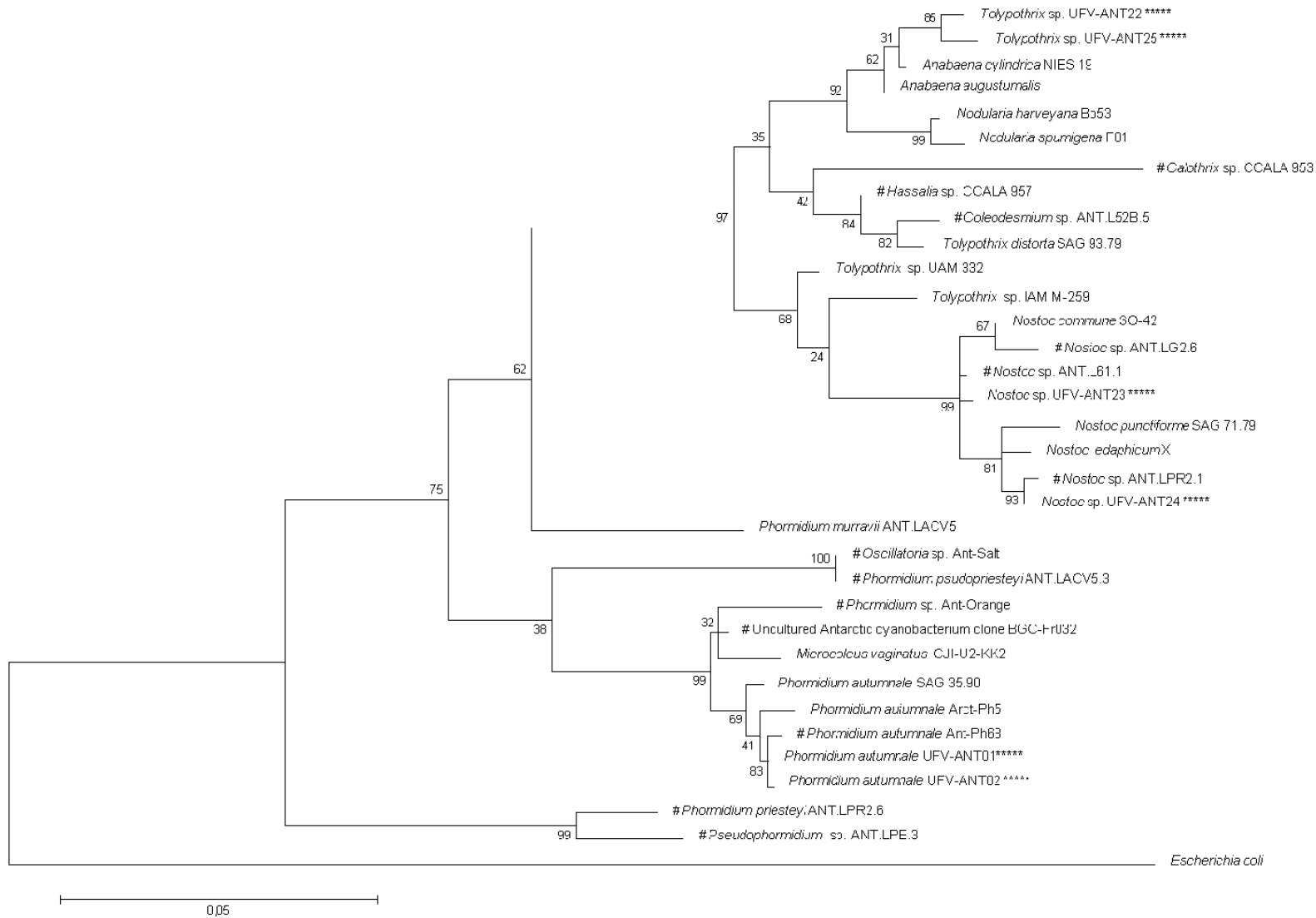


Figura 1: Árvore filogenética inferida a partir de seqüências do gene 16S rRNA pelo método de *maximum likelihood*. Valores de *bootstrap* são indicados nos nodos. As seqüências geradas neste estudo aparecem seguidas por *****. Seqüências de origem antártica são precedidas por #. A seqüência de *E. coli* foi utilizada como grupo externo. A distância evolutiva entre duas espécies pode ser obtida utilizando-se a escala (Barra= 0,05 mutações por posição).

4- Conclusões

Um predomínio de organismos pertencentes a Ordem Oscillatoriales foi observado nas amostras provenientes da Antártica Marítima. Habitats como canais de degelo e áreas alagadas, com maior disponibilidade de nutrientes carregados pela água apresentaram maior diversidade de organismos.

CAPÍTULO II

**Efeito de hidrocarbonetos aromáticos sobre o crescimento da
cianobactéria antártica *Phormidium autumnale* UFV-ANT01**

1 – Introdução

Embora o ambiente antártico tenha sido menos alterado pelo homem que o resto do globo terrestre, não podemos considerá-lo pristino. O crescimento das atividades de pesquisa, turismo e pesca na Antártica, que demandam o uso de combustíveis derivados do petróleo, tem contribuído significativamente para a contaminação do ambiente com hidrocarbonetos (Aislabie *et al.*, 1999).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) estão presentes no petróleo e em seus derivados e também podem ser formados no processo de combustão incompleta de combustíveis fósseis. Tais compostos raramente são encontrados como produto de vias biossintéticas e possuem alta persistência no ambiente (Martins *et al.*, 2004). Os PAHs são recalcitrantes no ambiente e, sob condições naturais, geralmente são resistentes ao ataque microbiano (Xu & Obbard, 2004).

Apesar de PAHs, como o naftaleno, terem sido enquadrados na lista prioritária de poluentes orgânicos, devido a sua natureza altamente tóxica (Eljarrat & Barceló, 2003), existem poucos trabalhos que investigam organismos que possam ser utilizados como bioindicadores de ambientes impactados por estes poluentes.

Um organismo com potencial para ser usado em processos de bioindicação deve apresentar atributos como: ser sensível a mudanças nas condições ambientais; possuir distribuição abundante e cosmopolita; ser fácil e rapidamente amostrado; e apresentar uma grande variedade de biomarcadores que possam ser quantitativamente mensuráveis (Steinman & McIntire, 1990). Biomarcadores são definidos como uma resposta biológica que pode ser relacionada à exposição, ou ao efeito tóxico, de um contaminante ambiental (Peakall & Shugart, 1998).

Apesar do termo biomarcador, geralmente, referir-se à respostas em níveis inferiores ao orgânico, num contexto mais amplo, pode também incluir respostas em todos os níveis de organização biológica, incluindo desde mudanças de padrões moleculares e bioquímicos, até alterações no comportamento e na estrutura de populações/comunidades (Wu *et al.*, 2005).

Informações disponíveis sobre os níveis de PAHs encontrados em ecossistemas antárticos demonstram que a contaminação com este tipo de poluente é localizada, geralmente limitando-se a áreas onde pequenos derramamentos de diesel ocorreram, e que amostras provenientes de áreas controle, geralmente apresentam níveis de hidrocarbonetos abaixo dos limites de detecção (Bargagli, 2005). Contudo, Mazzera *et*

al. (1999) observaram, no entorno da Estação americana de McMurdo, níveis de contaminantes como naftaleno, acenaftaleno, acenaftileno e fluoranteno na ordem de 27000 ± 2600 , 17800 ± 1270 , 15700 ± 6300 mg. Kg⁻¹ de solo (parte por milhão, ppm), respectivamente e que níveis de contaminação consideradas moderados não se restringiam às áreas de risco, como nas imediações de casas de máquinas e de tanques onde diesel era manipulado.

Embora as cianobactérias representem grande parte da produtividade primária de ambientes terrestres e de água doce na Antártica, pouco se sabe sobre o impacto que o *input* de hidrocarbonetos poderia causar sobre estas comunidades. Existem relatos de que a exposição aos HCs, leva ao decréscimo da diversidade de espécies de cianobactérias, sendo que as mais sensíveis sucumbem, dando lugar às espécies tolerantes (Kostel *et al.*, 1999).

Apesar de dados toxicológicos produzidos com base em organismos modelo como *Scenedesmus* sp. e *Daphnia* sp. serem de grande valor, não podem ser utilizados para estimar o efeito de poluentes sobre organismos antárticos. Este trabalho investiga os efeitos de três hidrocarbonetos aromáticos sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01, cianobactéria de ampla distribuição no ambiente antártico, contribuindo para estimar o efeito real de tais poluentes sobre a estrutura das comunidades antárticas.

2 – Materiais e Métodos

2.1 - Reagentes químicos

Todos os hidrocarbonetos testados apresentavam pureza superior a 98% e foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

2.2 – Material Biológico

Foi selecionada para o experimento a linhagem *Phormidium autumnale* UFF-ANT01, dada sua ampla distribuição e frequência relativa alta nas amostras de solo e canais de degelo analisadas. Este organismo foi mantido em meio AA4 líquido com fonte de nitrogênio combinada (ANEXO III), sob a temperatura de $15\pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoautotrófico no Laboratório de Ficologia DBV/UFV.

2.3 – Condições

O experimento foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade para 20 mL, aos quais foram adicionados 14 mL de meio AA4 líquido (suplementado com nitrato) e 1 mL do inóculo de cianobactérias. A concentração do inóculo inicial foi ajustada para 5×10^4 células/mL, em fase exponencial de crescimento.

Estes experimentos foram montados em quatro blocos, sendo o primeiro, o bloco controle (sem adição de hidrocarbonetos) e os três restantes apresentando concentrações gradativamente maiores de cada hidrocarboneto escolhido. Foram selecionados para os testes os seguintes hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: naftaleno, antraceno e benzo- α -pireno. Fatores como alta concentração no petróleo ou maior persistência no ambiente foram levados em consideração para esta escolha. As concentrações finais testadas para o naftaleno foram: 0, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/L}$. Para o antraceno foram: 0, 20, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$. Para o benzo- α -pireno foram: 0, 1, 2 e 5 $\mu\text{g/L}$. Os hidrocarbonetos foram adicionados diluídos em 100 μL metanol (concentração final de metanol 0,66% v/v). Aos tratamentos controle foram adicionados 100 μL de metanol livre de hidrocarbonetos para se excluir a hipótese de que as alterações observadas sobre o crescimento da cianobactéria fossem causadas pelo metanol.

Os tubos foram colocados em um suporte metálico e incubados em uma câmara de crescimento, sob condições fotoautotróficas de crescimento (intensidade luminosa de $66 \mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, regime de 16 horas de luz para 08 horas de escuro), à temperatura de $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Como a posição do tubo no suporte poderia deixá-lo exposto a diferentes intensidades luminosas, interferindo no crescimento das cianobactérias, adotou-se, dentro da câmara de crescimento, um sistema de rodízio de tubos de ensaio, de maneira que diariamente, a posição dos frascos era trocada no suporte para tubos, tornando a exposição luminosa mais homogênea entre os mesmos.

2.4 – Amostragem e avaliação de crescimento de cianobactérias

Durante o período de quinze dias, foram realizados seis pontos de amostragem: o primeiro foi realizado imediatamente após a aplicação de cada tratamento (tempo 0), e os outros pontos foram coletados em intervalos regulares de 72 horas. Em cada ponto de amostragem, três tubos foram aleatoriamente escolhidos, dentro de cada um dos blocos. Após a homogeneização do conteúdo de cada tubo, com a ajuda de um agitador mecânico (Potter S, B. Braun Biotech International, Alemanha), uma alíquota de 2 mL era recolhida e fixada em 2mL de formol (4%).

O monitoramento da produção de biomassa foi realizado no Laboratório de Ficologia DBV/UFV, através de contagens de células de cianobactérias, utilizando-se uma câmara do tipo Neubauer improved (Laboroptik, Alemanha), sob microscópio óptico BX41 (Olympus, EUA). Para cada ponto, convencionou-se a contagem de cinco lâminas, sendo contados os dois lóculos da câmara e rejeitando-se a contagem se a diferença entre os dois lóculos excedesse a 20%.

2.5 – Cálculo do valor inibitório de crescimento de cianobactérias expostas a hidrocarbonetos

A inibição do crescimento de cianobactérias foi obtida pela média de diminuição no número de células, após a exposição a cada hidrocarboneto, durante o período experimental, em comparação com o controle. A avaliação foi feita baseando-se na comparação das áreas abaixo das curvas de crescimento, conforme a metodologia descrita por Djomo *et al.* (2004). A área (A) delimitada pela curva foi calculada de acordo com a fórmula:

$$A = [(N_1 + N_0) \cdot t_1] / 2 + \{[(N_1 + N_2) - (2 \cdot N_0)] \cdot (t_2 - t_1)\} / 2 + \dots +$$

$$\dots + \{[(N_{n-1} + N_n) - (2 \cdot N_0)] \cdot (t_n - t_{n-1})\} / 2$$

Onde N_0 é o número de células por mL ao tempo t_0 (inóculo); N_1 é o número de células por mL no tempo t_1 , que é o tempo decorrente até a primeira contagem, após o início do experimento; e N_n é o número de células por mL no tempo t_n , que é o tempo decorrido entre a n ésima contagem e o início do experimento.

A inibição do crescimento celular (I_A) foi obtida através da equação:

$$I_A = [(A_c - A_t) \cdot 100] / A_c$$

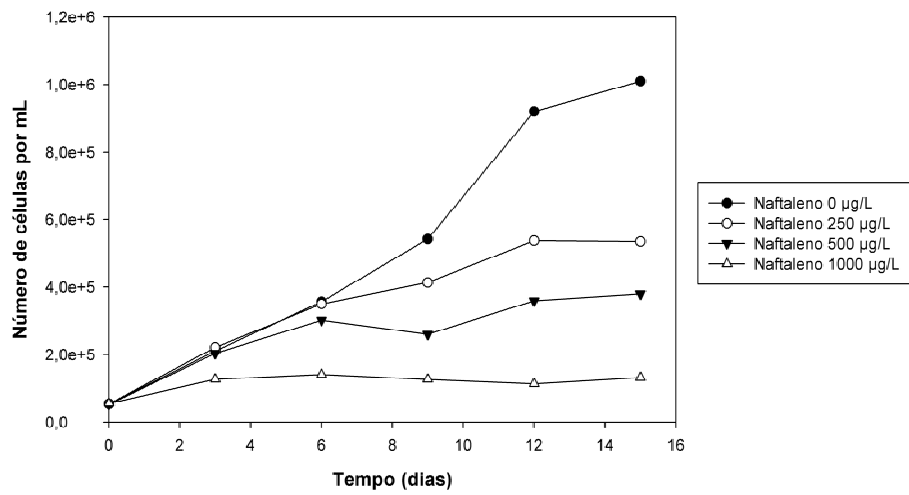
Onde A_c é a área abaixo da curva do tratamento controle, e A_t é a área abaixo da curva do tratamento (exposição ao poluente).

Os parâmetros toxicológicos 50% da concentração máxima efetiva (EC50), 20% da concentração máxima efetiva (EC20) e concentração máxima não efetiva (NOEC) foram estimados para cada hidrocarboneto testado, utilizando-se uma análise de regressão do tipo Probit (Probability Units). Adotou-se intervalo de confiança de 95%. EC50 e EC20 expressam as concentrações máximas de PAH capazes de causar um efeito inibitório sobre o crescimento do organismo testado na ordem de 50 e 20%, respectivamente, enquanto que NOEC representa a concentração máxima em que não se observa efeito inibitório sobre o crescimento, no intervalo de confiança adotado (95%).

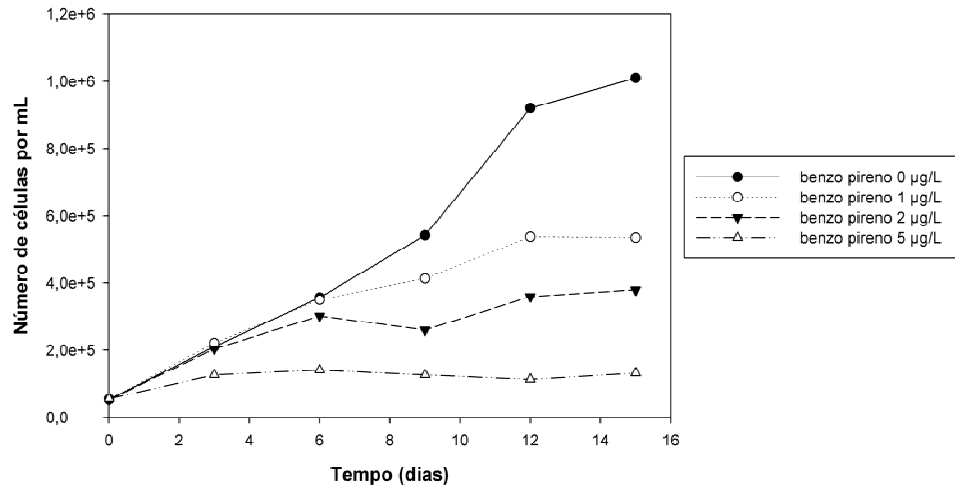
3 - Resultados e Discussão

O efeito dos hidrocarbonetos testados sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01, à temperatura de 15 ± 1 °C, durante quinze dias, encontra-se apresentado na Figura 1 A-C. A toxicidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos sobre *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 observada, seguiu a ordem: benzo- α -pireno > antraceno > naftaleno. Entre os hidrocarbonetos testados, o benzo- α -pireno foi o que mais afetou o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01, mesmo tendo sido testado em menores concentrações que os demais PHAs.

(A)



(B)



(C)

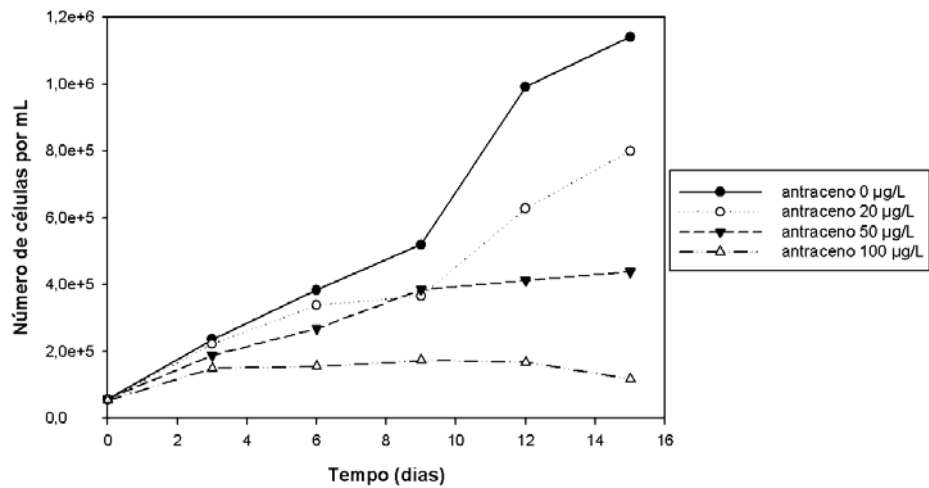


Figura 1: Curvas de crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT0 exposto a diferentes doses de naftaleno (A), benzo- α -pireno (B) e antraceno (C). Os pontos representam a média de triplicatas.

O menor valor de EC50 estimado foi obtido para o benzo- α -pireno, sendo a concentração necessária deste hidrocarboneto para causar tal inibição sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 foi quase quatrocentas e cinquenta vezes menor que a estimada para naftaleno (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros toxicológicos estimados para *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 exposto a diferentes hidrocarbonetos aromáticos.

PAH	Parâmetros toxicológicos			Equação de regressão no modelo Probit*		
	EC50	EC20	NOEC	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²
Naftaleno	758,5 μ g/L	251,2 μ g/L	83,2 μ g/L	-0,02	1,74	0,97
Antraceno	25,7 μ g/L	2,95 μ g/L	0,41 μ g/L	0,89	3,74	0,90
Benzo- α -pireno	1,7 μ g/L	0,95 μ g/L	0,15 μ g/L	4,18	3,55	0,97

* Equação de regressão no modelo Probit ($y = a + bx$), onde $y = \text{probit}(\% \text{ controle})$ e $x = \log_{10}[\text{concentração de PAH}]$

As diferenças de toxicidade observadas para os hidrocarbonetos testados podem ser atribuídas a propriedades físico-químicas intrínsecas de cada um dos compostos, como solubilidade, coeficiente de partição água-octanol (K_{ow}), volatilidade, persistência e toxicidade foto-induzida (Miller *et al.*, 1985; Gala & Giesy, 1992).

O efeito tóxico dos PHAs sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 aumentou para PHAs com maiores valores de K_{ow} . Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Djomo *et al.* (2004) e Hutchinson *et al.* (1979) que apresentaram evidências experimentais de que os valores de k_{ow} de PAHs são diretamente proporcionais ao seu efeito tóxico sobre a atividade fotossintética.

O efeito de hidrocarbonetos sobre o crescimento de cianobactérias é um assunto pouco explorado na literatura, alguns relatos demonstram efeitos inibitórios de hidrocarbonetos, sobretudo dos aromáticos, sobre o crescimento, fotossíntese e sobre as taxas fixação de nitrogênio de cianobactérias do gênero *Anabaena* sp. (Gaur & Singh, 1989; Bastian & Toetz, 1985).

Batterton *et al.* (1978) demonstraram que a exposição a óleos combustíveis e frações solúveis de petróleo têm efeito inibitório sobre as taxas de crescimento de *Agmenellum quadruplicatum*, sendo consideradas as frações mais ricas em PAHs mais tóxicas. Em contra partida, Al-Hasan *et al.* (1994) demonstraram que a exposição de

Phormidium corium e *Microcoleus chthonoplastes* a hidrocarbonetos alifáticos e a frações do petróleo tem efeito estimulatório sobre as taxas de crescimento destas cianobactérias, e que a razão entre o conteúdo de clorofila *a* e carotenóides não foi com isto afetada, indicando a ausência de estresse fotossintético.

Apesar de ser amplamente aceito pela literatura que os hidrocarbonetos, mesmo em pequenas quantidades, tenham um efeito inibitório sobre organismos fotossintéticos, a bioquímica da toxicidade dos mesmos é pouco conhecida. Sikkema *et al.* (1995) apresenta uma compilação de dados que demonstram que um dos principais sítios de toxicidade dos hidrocarbonetos seja a membrana citoplasmática. Os autores reúnem dados que demonstram que a bicamada lipídica perde sua integridade, tendo sua permeabilidade a íons aumentada quando exposta a hidrocarbonetos, perdendo assim, sua função seletiva. Há ainda evidências de que as proteínas de membrana sejam afetadas.

É importante destacar que em solução, a toxicidade de PAHs pouco solúveis, como os testados, é determinada pela quantidade do contaminante solubilizada, que pode ser menor que a concentração total do poluente adicionada ao tratamento (Leahy & Colwell, 1990). Dois fatores que podem interferir na biodisponibilidade dos hidrocarbonetos neste experimento devem ser levados em consideração ao analisarmos os resultados aqui apresentados: como a linhagem testada cresce melhor sem agitação, os tubos contendo os tratamentos não foram mantidos sob agitação constante, o que poderia diminuir a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos na fase aquosa; e para tentar aumentar a solubilidade dos HCs testados na fase aquosa, estes foram adicionados aos tratamentos dissolvidos em metanol, contudo a quantidade de hidrocarbonetos disponível nesta fase não foi mensurada. Desta maneira, o efeito observado sobre o crescimento de *Phormidium autumnale* UFV-ANT01 pode corresponder a doses menores que aquelas totais aplicadas a cada tratamento.

Apesar da área de solos afetados por hidrocarbonetos na Antártica não ser muito grande, sítios pontuais de contaminação podem ser detectados nas áreas do entorno de estações de pesquisa em funcionamento ou desativadas, por até 30 anos após a ocorrência de um derramamento (Aislabie *et al.*, 2004).

Embora Oliveira (2005) não tenha detectado concentrações de PAHs totais superiores a 1,19 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (parte por milhão, ppm) de solo seco, nos ambientes terrestres do entorno da Estação Antártica Comandante Ferraz, existem trabalhos que mostram que o *input* de HCs na área tem aumentado consideravelmente. Martins *et al.* (2000)

obteve concentrações de naftaleno de até 26,95 $\eta\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo seco, e de antraceno chegando a 20,5 $\eta\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo seco, analisando amostras de sedimento provenientes da Baía do Almirantado. Os autores, comparando os dados levantados para esta região com os obtidos em anos posteriores por outros pesquisadores, indicam um aumento nas concentrações de PAHs totais detectadas em sedimentos.

Isto indica que o crescimento da atividade de pesquisa na área, pode levar a alterações ambientais que comprometem as comunidades de organismos presentes nestas regiões. Considerando-se que concentrações de PAHs na ordem de parte por milhão (ppm) têm frequentemente sido relatadas em compartimentos ambientais da Antártica, e que as concentrações destes poluentes testadas no presente trabalho estão na mesma ordem de grandeza, podemos inferir que as concentrações de PAHs observadas na área são suficientes para causar efeitos deletérios sobre as populações de *Phormidium autumnale* UVF-ANT01, e conseqüentemente provocar um desequilíbrio nas comunidades microbianas que habitam tais ambientes.

A busca por bioindicadores de áreas impactadas com HCs e o estabelecimento de programas de biomonitoramento na região, tornam-se de grande importância para a preservação do ecossistema existente na Baía do Almirantado. Alterações na população de *Phormidium autumnale* UVF-ANT01, nos solos da região, podem atuar como biomarcadores que funcionam como um sinal de alerta para as mudanças nas concentrações de HCs nestes solos. Experimentos futuros com este isolado poderiam gerar parâmetros mais sensíveis que o crescimento celular, como por exemplo, marcadores moleculares para o biomonitoramento de áreas contaminadas.

4 – Conclusões

A cianobactéria *Phormidium autumnale* UVF-ANT01 exibiu alta sensibilidade às concentrações testadas de hidrocarbonetos, indicando que a crescente contaminação do ambiente antártico com estes poluentes pode ter um efeito deletério sobre a comunidade de cianobactérias da região. Fatores como uma ampla distribuição em amostras de solos da Antártica marítima, associados à sensibilidade a concentrações baixas de naftaleno, antraceno e benzo- α -pireno, fazem de *Phormidium autumnale* UVF-ANT01, um organismo com potencial para ser empregado em estudos de bioindicação de solos poluídos por HCs, na Antártica.

CAPÍTULO III

Interação entre cianobactérias antárticas e bactérias na biodegradação de [¹⁴C]naftaleno

1 – Introdução

A atividade científica, logística e o turismo na Antártica dependem, em grande parte, do petróleo para a geração de energia e transporte. Estima-se que aproximadamente 90 milhões de litros de combustível são gastos anualmente por estações de pesquisa na Antártica (Cripps & Shears, 1997).

Apesar da atividade antropogênica não ter introduzido os hidrocarbonetos (HCs) como uma nova classe de compostos no ambiente, esta elevou o seu acúmulo na biosfera, o que pode ser extremamente deletério para o ambiente no caso de um derramamento (Widdel & Rabus, 2001). Os HCs podem servir como substrato de crescimento para alguns organismos vivos, bem como podem ser tóxicos para outros (Gerdes, *et al.*, 2005).

Algumas cianobactérias exibem além do crescimento fotoautotrófico, crescimento autotrófico facultativo, sendo capazes de utilizar alguns compostos orgânicos, como uréia e aminoácidos, até mesmo em altas taxas (Montesinos *et al.*, 1997; Zubkov *et al.*, 2003). Existem estudos que demonstram a capacidade das cianobactérias em degradar pesticidas orgânicos como γ -hexaclorociclohexano, um organoclorado (Kuritz & Wolk, 1995).

Embora a utilização de bactérias heterotróficas na degradação de hidrocarbonetos em condições de laboratório seja eficaz, em condições de campo nem sempre se observa o mesmo efeito (Al-Awadhi *et al.*, 2003). A utilização de consórcios entre cianobactérias e bactérias poderia ser uma alternativa ecologicamente viável na biodegradação de hidrocarbonetos.

Abed (2010) demonstrou que a utilização de cianobactérias em consórcio com bactérias degradadoras de HCs pode substituir eficientemente o uso de fertilizantes orgânicos e inorgânicos, que geralmente aumentam os custos de processos de biorremediação.

O naftaleno, um hidrocarboneto aromático dicíclico, e seus derivativos metilados são considerados os compostos mais tóxicos da fração solúvel do petróleo (Anderson *et al.*, 1974). A exposição diária de ratos ao naftaleno por inalação provou ser claramente carcinogênica e causou decréscimo das concentrações sanguíneas de hemoglobina (NTP, 2000). Existem relatos de intoxicações letais por naftaleno em humanos, a maioria dos casos está associada ao desenvolvimento de anemia hemolítica (Santucci & Shah, 2000).

A baixa solubilidade em água e a alta adsorção dos PAHs, geralmente limitam muito a sua taxa de degradação, mas a produção de metabólitos tóxicos e de metabólitos com taxas quase nulas de degradação, a repressão metabólica, a disponibilidade de substratos preferenciais são fatores que também devem ser considerados quando se fala da persistência destes compostos no ambiente (Atlas, 1981).

A degradação bacteriana de compostos aromáticos normalmente inclui a formação de um diol, seguida da clivagem do anel, e da formação de um diácido como o ácido mucônico. Em contraste, a oxidação de compostos aromáticos em eucariotos leva a formação de um *trans*-diol (Cerniglia *et al.*, 1984).

Narro *et al.* (1980b) demonstraram a capacidade da cianobactéria *Oscillatoria* sp. JCM em oxidar o naftaleno a 1-naftol, primariamente pela oxidação do naftaleno a naftaleno 1,2-óxido, que sofre uma isomerização, por um mecanismo chamado substituição NIH, formando um ceto intermediário, que através de uma enolização forma o 1-naftol (via indireta), à semelhança de outros microrganismos como *Bacillus cereus* (Cerniglia *et al.*, 1984). Os autores não descartam a possibilidade de ocorrência de hidroxilação direta em taxas menores.

Neste trabalho testamos a capacidade de degradação de naftaleno por três linhagens de cianobactérias unialgais ou em consórcio com bactérias heterotróficas, sendo todos os organismos envolvidos isolados a partir de solos antárticos.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Reagentes

A solução metanólica de $[C^{14}]$ naftaleno-benzeno (uniformemente marcada), com atividade específica de $31,3 \text{ mCi.mmol}^{-1}$, o coquetel de contagem em cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

2.2 – Material Biológico

Foram selecionados para o experimento as linhagens de cianobactérias *Phormidium autumnale* UFV-ANT 01, *Tolypotrix* sp. UFV-ANT22, *Nostoc* sp. UFV-ANT23 de maior distribuição nas amostras de solo, canais e lagos de degelo analisadas. Estes organismos foram mantidos em meio líquido AA4 com ou sem fonte de nitrogênio combinada (ANEXO III), sob a temperatura de $15 \pm 1^\circ\text{C}$, sob regime fotoautotrófico no Laboratório de Ficologia DBV/UFV. As bactérias heterotróficas foram selecionadas de uma amostra de solo contaminada com diesel, proveniente da Antártica, que foi enriquecida em meio mínimo mineral (ANEXO III) suplementado com 2% v/v de diesel estéril, que serviu como única fonte de carbono para o crescimento microbiano. Os organismos foram incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação constante de 250 rpm. Foi obtida uma cultura mista, na qual todos os microrganismos capazes de crescer foram considerados potencialmente degradadores de hidrocarbonetos.

O inóculo de cianobactérias foi preparado concentrando-se cada cultura em fase exponencial de crescimento através de centrifugação (12000 rpm, durante dez minutos). O precipitado foi colocado sobre uma folha de papel filtro estéril, a fim de retirar o excesso de umidade. Posteriormente, o precipitado foi transferido para um tubo de centrífuga e pesado em balança analítica. O volume do tubo foi completado com meio AA4 líquido (sem fonte de nitrogênio), pH 7.1, para a obtenção de um inóculo inicial com concentração de 100 mg.mL^{-1} (matéria fresca).

O inóculo contendo bactérias heterotróficas foi preparado através de centrifugação das culturas, com três dias cultivo (12000 rpm, durante dez minutos) e ajuste para obtenção de um inóculo com concentração de 10 mg.mL^{-1} (matéria fresca).

2.3- Condições experimentais

Os experimentos de degradação foram conduzidos em Erlenmeyers com capacidade para 50 mL, aos quais foram adicionados 9 g de solo autoclavado (121°C, 40 min.). Cada um destes microcosmos recebeu 2,33 η Ci de [14 C]naftaleno e aleatoriamente foram separados em blocos para receber os tratamentos.

Os tratamentos, com três réplicas cada um, consistiram em um controle abiótico, um controle bacteriano e seis tratamentos bióticos, que continham culturas unialgais de cada das três cianobactérias selecionadas ou consórcios entre cada espécie de cianobactéria e bactérias heterotróficas, conforme sumarizado no Quadro 1. Os frascos contendo os tratamentos foram conectados a um sistema respirométrico (ANEXO III), e mantidos em uma câmara de crescimento tipo B.O.D. (Eletrolab, Brasil) com fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 de escuro, à temperatura de 15°C \pm 1, por um período de duzentas horas. A técnica utilizada pressupõe que o [14 C] naftaleno é mineralizado a 14 CO₂ quando biodegradado pelo inóculo testado e assim, a taxa de degradação do mesmo pode ser mensurada através da quantidade de 14 CO₂ liberada ao longo do período de incubação.

Após o período de duzentas horas, cada microcosmo recebeu uma dose adicional de 0.25 η Ci de [14 C]naftaleno e foi novamente conectado ao aparato respirométrico.

2.4 – Coleta e detecção de 14 CO₂ mineralizado

A cada ponto de amostragem, 1mL da solução contida no sistema de captura de 14 CO₂ de cada tratamento (cada sistema possuía 35 mL ao todo), previamente homogeneizada através de fluxos contínuos com micropipeta, foi recolhido e acomodado em um *vial* de contagem que era então, hermeticamente fechado. O volume do sistema de captura de 14 CO₂ era novamente completado para 35 mL (com solução de NaOH 0,7 M) e novamente ligado à sua respectiva amostra de solo no sistema respirométrico. A primeira amostragem foi realizada após 12 horas do início do experimento, as demais amostragens foram realizadas a cada 24 horas pelo período de duzentas horas. Após este período, com a adição de hidrocarboneto adicional, mais duas coletas foram realizadas nos tempos 212 e 260 horas.

Para a contagem das amostras radioativas, a cada amostra recolhida foram adicionados 5 mL do coquetel de cintilação líquida (Sigma High Performance LSC

Cocktail), as amostras foram vigorosamente agitadas e mantidas em descanso por pelo menos 24 horas antes de serem contadas. A contagem foi realizada em um contador de cintilação (LS 6800, Beckman, EUA), estabeleceu-se vinte minutos de contagem por amostra, repetindo-se a contagem caso o lúmen ultrapassasse 5%. Os resultados foram corrigidos para a eficiência de contagem e *background* do aparelho.

Quadro 1: Tratamentos realizados no experimento de degradação de [¹⁴C] naftaleno

Tratamento	Suspensões recebidas por cada tratamento				
	Suspensão de bactérias	Suspensão de <i>Phormidium autumnale</i> UFV-ANT01	Suspensão de <i>Tolypothrix</i> sp. UFV-ANT22	Suspensão de <i>Nostoc</i> sp. UFV-ANT23	Meio AA4 (sem fonte de N) estéril
Controle abiótico	-	-	-	-	2mL
Controle bacteriano	1mL	-	-	-	1mL
<i>Phormidium</i> unialgal	-	1mL	-	-	1mL
<i>Phormidium</i> consórcio	1mL	1mL	-	-	-
<i>Tolypotrix</i> unialgal	-	-	1mL	-	1mL
<i>Tolypotrix</i> consórcio	1mL	-	1mL	-	-
<i>Nostoc</i> unialgal	-	-	-	1mL	1mL
<i>Nostoc</i> consórcio	1mL	-	-	1mL	-

2.5 – Detecção de ¹⁴C incorporado à biomassa de cianobactérias

Como as cianobactérias são organismos fotoautotróficos, parte do ¹⁴CO₂ mineralizado pode ser consumido no processo fotossintético e incorporado na biomassa na forma de açúcares, proteínas, ácidos orgânicos e outros constituintes celulares. O conteúdo total de cada tratamento foi ressuspensionado em 20 mL de solução salina (NaCl 0,6%) mais Tween 20 (150mg.L⁻¹) e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, coletou-se 1mL do sobrenadante para a contagem da radiação no contador de cintilação, o restante foi desprezado. Este passo foi repetido por duas vezes. A biomassa foi então, separada do solo sendo ressuspensionada em 20 mL de solução de sacarose a 50% p/v e coletada do sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta. A biomassa foi transferida para um eppendorf de 2 mL ressuspensionada em água ultrapura e centrifugada a 13000 rpm por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado; repetiu-se o processo por duas vezes.

Para eliminar as bactérias heterotróficas que se aderiram à bainha mucilaginosa das cianobactérias, a camada de exopolissacarídeos (EPS) foi removida, conforme descrito por Fiore *et al.* (2000). Foi recolhido 1 mL do sobrenadante para contagem da radiação.

Para a determinação das concentrações de ^{14}C na biomassa utilizou-se a metodologia de fracionamento etanólico a quente, descrita por Davis *et al.* (1983), sendo obtidas uma fração solúvel e uma fração insolúvel da biomassa de cianobactérias. A fração solúvel representa açúcares simples, proteínas solúveis, pigmentos fotossintéticos e ácidos orgânicos. A fração insolúvel compreende a parede celular e açúcares insolúveis. A fração insolúvel foi ressuspensa em 500 μL de água ultrapura e uma alíquota de 250 μL foi acomodada em um *vial* de contagem. A fração solúvel foi seca em estufa a 50°C, até a redução do volume original para 1 mL, ressuspensa em 1,5 mL de água ultrapura, coletando-se 250 μL que foi transferido para um *vial* de contagem. A contagem de radioatividade foi realizada conforme anteriormente descrito no item 2.4.

2.6 – Análise de dados

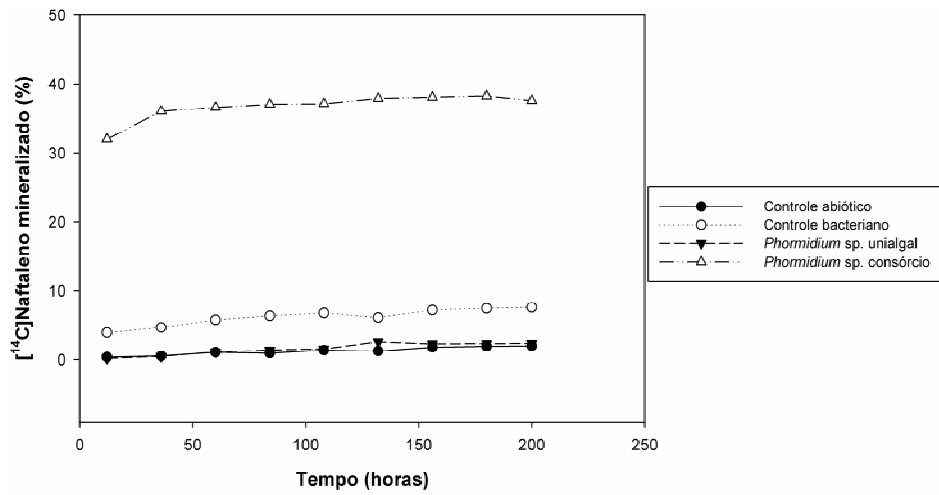
Os dados de degradação obtidos foram analisados através de regressão não-linear e análise de covariância. E para a análise dos dados de quantificação de ^{14}C na biomassa foram realizados testes de médias. Adotou-se nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com a ajuda do programa estatístico livre R.

3 – Resultados e Discussão

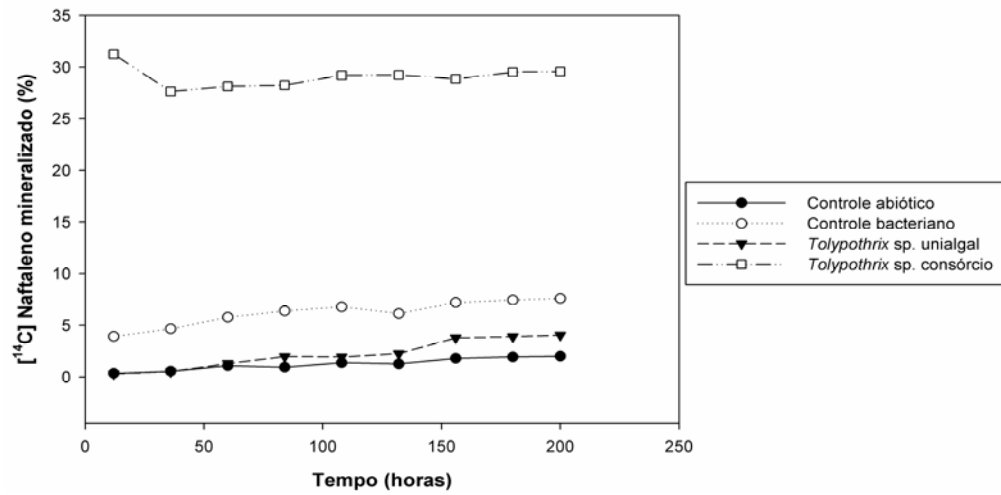
3.1 – Experimento de degradação de [^{14}C]naftaleno

O [^{14}C]naftaleno foi prontamente degradado pelo controle bacteriano e pelos tratamentos contendo consórcios entre as cianobactérias e bactérias heterotróficas sem uma fase de adaptação pronunciada, conforme apresentado na Figura 1.

(A)



(B)



(C)

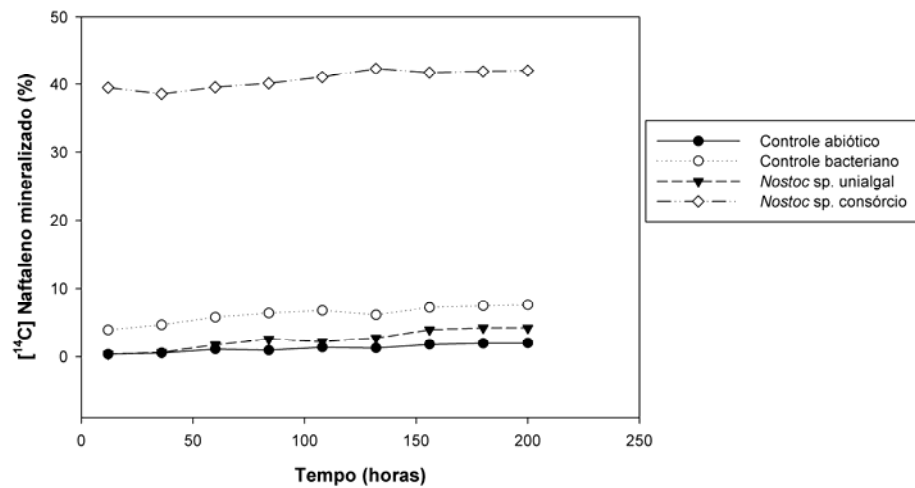


Figura 1 (A-C): Taxas cumulativas de degradação de $[^{14}\text{C}]$ naftaleno para os diferentes tratamentos testados durante o período de duzentas horas.

Os tratamentos *Phormidium* consórcio e *Nostoc* consórcio foram considerados os melhores tratamentos testados, resultando em taxas cumulativas de degradação de naftaleno na ordem de 39% e 42%, respectivamente, seguidos do tratamento *Tolypothrix* consórcio com taxa de degradação de 32% e pelo controle bacteriano com 11% de degradação ao fim de duzentas horas de experimento.

Os tratamentos unialgais de cianobactérias não diferiram estatisticamente do controle abiótico que apresentou taxa de mineralização de 1,9%, sendo esta taxa atribuída a perda por volatilização Figura 1. As taxas de degradação obtidas para os tratamentos *Phormidium* unialgal, *Tolypothrix* unialgal e *Nostoc* unialgal foram de 2,6%, 4% e 4,2%, respectivamente. Isto pode refletir a falta de habilidade dos organismos selecionados em aproveitar hidrocarbonetos como fonte de carbono, mesmo num microcosmo em que a concentração de CO₂ disponível para a via fotossintética é baixa, já que o ar bombeado para os erlenmeyers passam primeiro por unidades que retiram a maior parte do dióxido de carbono.

Os resultados aqui obtidos para as cianobactérias em consórcio com bactérias heterotróficas superam a soma das partes, ou seja, se somarmos os valores obtidos para o controle bacteriano com o de qualquer das culturas unialgais de cianobactérias, ainda assim obteríamos um valor menor que o observado para qualquer dos tratamentos em consórcio. Para Grötzschel *et al.*, 2002, a formação de consórcios microbianos possibilita que vários organismos adaptados a condições de crescimento diferenciadas estejam em proximidade (*e.g.*, regiões saturadas de O₂ em proximidade com regiões anóxicas), de maneira que poderiam atuar em sinergia na degradação de compostos derivados do petróleo.

Abed (2010) demonstrou que a utilização de cianobactérias em consórcio com bactérias degradadoras de HCs pode substituir eficientemente o uso de fertilizantes orgânicos e inorgânicos, que geralmente aumentam os custos de processos de biorremediação.

Os resultados aqui apresentados endossam o reconhecimento de que cianobactérias estão relacionados a processos de biodegradação e atenuação das concentrações de naftaleno, em condições experimentais. As cianobactérias parecem ter participação crucial para a efetividade do processo de degradação, seja de forma direta, oxidando/consumindo os HCs, ou indireta, impedindo que bactérias heterotróficas aderidas à bainha mucilaginosa fiquem dispersas, mantendo-as imobilizadas e colocando-as em contato prolongado com os HCs. Além disso, as cianobactérias suprem

tais bactérias com nutrientes, nitrogênio e oxigênio, necessários para a atividade de degradação (Abed *et al.*, 2002; Grötzschel *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2003; Abed & Köster, 2005; Chaillan *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006).

Os dados obtidos aqui, ainda indicam que cianobactérias que isoladamente são sensíveis a hidrocarbonetos, como demonstrado para *Phormidium autumnale* UFFV-ANT 01 no capítulo II, podem se beneficiar do consórcio; possivelmente as concentrações de HC que efetivamente penetram na célula da cianobactéria consorciada sejam atenuadas pelo consumo do poluente pelas bactérias que vivem aderidas a bainha mucilaginosa. Sofonova *et al.* (1999) demonstraram que a associação entre isolados axênicos de cianobactérias e bactérias alcanotróficas aumenta a tolerância de cianobactérias a concentrações de até 1% de HCs em meio de cultura. Os autores ainda demonstraram que o consórcio entre isolados de cianobactérias e bactérias alcanotróficas foi mais eficiente na degradação do petróleo que culturas puras das bactérias alcanotróficas.

Embora os tratamentos contendo cianobactérias em consórcio tenham se mostrado capazes de degradar o naftaleno, as cianobactérias em culturas monoclonais testadas neste trabalho, não foram capazes de degradá-lo, indicando que estas exercem somente um papel indireto na degradação de HCs. Alguns poucos relatos demonstraram um papel direto das cianobactérias na degradação de hidrocarbonetos (Raghukumar *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2009; Ibraheem, 2010).

O fato de que as cianobactérias testadas foram isoladas de solos que não apresentam histórico de contaminação com HCs, pode refletir a ausência de estratégias metabólicas que permitam, a estes organismos utilizarem o naftaleno como fonte de carbono para o crescimento. Aislabie *et al.* (2001) relataram que solos não contaminados por HCs da Ilha Ross, tipicamente exibem um número baixo, ou mesmo abaixo do limite de detecção, de microrganismos capazes de utilizar estes poluentes como fonte nutricional.

A rápida resposta dos microrganismos, observada neste trabalho, à exposição ao hidrocarboneto também vem de acordo com o encontrado na literatura para exposição a baixas concentrações de HCs. Existem evidências de que a cinética da biodegradação de hidrocarbonetos sob baixas concentrações, como as empregadas neste experimento, tende a apresentar fase de adaptação muito curta ou pouco evidente, sendo que muitas vezes, taxas de degradação elevadas podem ser observadas quase que imediatamente à aplicação dos tratamentos (Scow *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 2003).

Narro *et al.* (1992) demonstraram que culturas puras de *Anagmenellum quadruplicatum* PR6 são capazes de metabolizar 2,2 % do [C¹⁴] fenantreno (hidrocarboneto aromático tricíclico), adicionado ao meio líquido, sob condições fotoautotróficas e à temperatura de 30°C, num período de 12 horas.

Outros autores, porém, observaram cinéticas de degradação muito diferentes das obtidas no presente trabalho, com fases de adaptação mais acentuadas e curvas com um formato tipicamente em “S”. Heitkamp *et al.* (1987) relataram que a meia vida de degradação do [C¹⁴] naftaleno (tempo necessário para a mineralização de 50% do HAP adicionado) por amostras de sedimentos contendo bactérias heterotróficas foi de 4,4 semanas. Os autores observaram uma meia vida de degradação menor (2,4 semanas) para amostras provenientes de áreas com históricos de contaminação muito elevados. Wyndham & Costerton (1981) obtiveram uma taxa média de degradação de [C¹⁴] naftaleno igual a 77±7%, em oito semanas, para bactérias provenientes de sedimentos de uma região adjacente a um depósito natural de petróleo.

Após o período de 60 horas de experimento, um platô de degradação foi atingido em todos os tratamentos testados. Tanto Heitkamp *et al.* (1987), quanto Wyndham & Costerton (1981) obtiveram um platô de degradação, somente, por volta da oitava semana de exposição das amostras ao naftaleno. Isto nos leva a cogitar algumas hipóteses que justifiquem o alcance prematuro do platô de degradação: 1) o naftaleno marcado adicionado inicialmente tornou-se bioindisponível ao ataque microbiano; 2) o naftaleno ou um produto de sua degradação exibiu um efeito tóxico sobre os tratamentos; 3) houve depleção de naftaleno, já que o aparato respirométrico permite perdas de ¹⁴CO₂ que não são mensuradas; e 4) houve depleção de nutrientes necessários para que a maquinária enzimática dos organismos continuem degradando os hidrocarbonetos.

Para tentar eliminar algumas destas hipóteses, após o período de duzentas horas de incubação, nova alíquota de naftaleno marcado foi adicionada aos tratamentos. Uma cinética de degradação semelhante à descrita anteriormente foi observada para cada tratamento (Tabela 1). No tempo 212 horas de exposição (12 horas após a adição de mais naftaleno) registraram-se taxas de degradação proporcionais às obtidas por cada tratamento nas 12 horas iniciais do experimento, e no tempo de 260 horas, as taxas cumulativas obtidas não diferem substancialmente daquelas registradas no tempo de 60 horas, estacionando novamente.

Com isto, descartamos as hipóteses de efeito tóxico e de depleção de nutrientes, já que os tratamentos responderam positivamente à adição de mais hidrocarboneto. Como as taxas de degradação tenderam a estacionar novamente, as hipóteses de bioindisponibilidade do hidrocarboneto ao ataque microbiano e a de depleção de hidrocarboneto por perdas não mensuráveis ainda não puderam ser descartadas.

Tabela 1: Porcentagem de fração inicial de [C¹⁴] naftaleno mineralizada em comparação à fração mineralizada após a aplicação de naftaleno adicional.

Tratamento (% cumulativa de naftaleno degradado)	% [¹⁴ C]Naftaleno inicial		% [¹⁴ C]Naftaleno adicional	
	Hora 12	Hora 60	Hora 212	Hora 260
Controle abiótico (1,9%)	0,35	1,09	1,02	1,06
Controle bacteriano (11%)	7,6	10,9	5,2	4,9
<i>Phormidium</i> unialgal (2,6%)	0,62	1,1	1,0	1,2
<i>Tolypothrix</i> unialgal (4%)	0,32	1,3	0,9	1,1
<i>Nostoc</i> unialgal (4,2%)	0,36	1,7	1,3	1,3
<i>Phormidium</i> consórcio (39%)	31,9	36,7	22,5	25,3
<i>Tolypothrix</i> consórcio (32%)	31,2	28,1	25,7	26,5
<i>Nostoc</i> consórcio (42%)	39,4	39,5	29,3	32,6

A porcentagem de naftaleno perdida por volatilização no controle abiótico (1,9 %) está muito abaixo dos valores apresentados em experimentos similares. Heitkamp *et al.* (1987) relataram uma perda de 12 a 15% do naftaleno adicionado aos tratamentos por volatilização, durante as duas primeiras semanas de incubação. Este fato pode corroborar a hipótese de que os dados obtidos foram subestimados, em decorrência de perdas de ¹⁴CO₂ para o ambiente, dado o caráter rústico do aparato respirométrico utilizado na condução dos experimentos.

É importante ressaltar que os experimentos conduzidos no Laboratório de Ficologia do DBV/UFV foram realizados em uma temperatura de 15±1°C. Existem várias revisões disponíveis na literatura, que demonstram que o aumento da temperatura leva a um incremento das taxas de degradação de HCs, tipicamente em faixas de

temperatura de 30 a 40°C, acima das quais, a toxicidade aumenta em função da alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática (Atlas, 1981; Leahy & Colwell, 1990). Há evidências de que mesmo as populações microbianas indígenas de solos antárticos, respondem com maiores taxas de degradação em temperaturas próximas de 28°C (Ferguson *et al.*, 2003). Possivelmente, um aumento da temperatura de trabalho poderia resultar num incremento das taxas de degradação do naftaleno obtidas, seja pelo aumento do metabolismo microbiano ou por alterações na natureza física do HAP, que resultariam numa maior disponibilidade do mesmo para o consumo microbiano. Contudo, uma temperatura de trabalho mais alta não seria realista se imaginarmos um cenário de biorremediação em campo na Antártica.

3.2 – Fracionamento do ¹⁴C incorporado à biomassa

Cerca de 17% do hidrocarboneto marcado foi detectado na solução com detergente utilizada para reaver a biomassa. Provavelmente, esta porção de naftaleno encontrava-se adsorvida ao solo e à biomassa por interações fracas que foram quebradas pela ação surfactante do Tween 20[®].

Parte do carbono marcado inicialmente adicionado aos tratamentos pôde ser detectada na biomassa de cianobactérias. Houve diferença significativa entre as quantidades de carbono incorporadas pelos tratamentos unialgais e pelos tratamentos em consórcio, sendo as médias dos tratamentos em consórcio superiores para as duas frações mensuradas (Tabela 2). Esta diferença estatística exclui a possibilidade de que a detecção de ¹⁴C na biomassa seja decorrente de falhas metodológicas (por exemplo, que o ¹⁴C detectado estivesse adsorvido a parede celular e não incorporado na estrutura da mesma), já que as propriedades físico-químicas das paredes celulares das cianobactérias não são alteradas se estas estiverem em cultura unialgal ou em consórcio.

Esta diferença também não pode ser atribuída à quantidade de ¹⁴C incorporada à biomassa das bactérias aderidas à mucilagem das cianobactérias em consórcio, já que o EPS foi extraído previamente ao fracionamento celular, levando as bactérias a ele aderidas.

Tabela 2: Comparação entre médias de ^{14}C incorporado à biomassa de cianobactérias, expresso em porcentagem da quantidade inicial total de ^{14}C adicionado aos tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fração	Médias de ^{14}C detectado na biomassa (%)					
	<i>Phormidium</i> unialgal	<i>Tolypothrix</i> unialgal	<i>Nostoc</i> unialgal	<i>Phormidium</i> consórcio	<i>Tolypothrix</i> consórcio	<i>Nostoc</i> consórcio
Solúvel	2,1 <i>c</i>	1,5 <i>c</i>	2,4 <i>c</i>	12,0 <i>a</i>	6,5 <i>b</i>	10,7 <i>a</i>
Insolúvel	0,9 <i>c</i>	0,9 <i>c</i>	1,4 <i>c</i>	5,4 <i>a</i>	4,0 <i>ab</i>	3,5 <i>b</i>
Total	3,0	2,4	3,8	17,4	10,5	14,2

^{a,b,c} Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes, comparações feitas entre médias dos tratamentos para cada fração analisada.

Certamente, esta diferença não seja atribuída a uma maior habilidade das cianobactérias em consórcio de consumir diretamente o hidrocarboneto marcado, e sim seja resultado de um incremento na taxa fotossintética proporcionado pelo aumento da concentração de $^{14}\text{CO}_2$, proveniente da mineralização [^{14}C] naftaleno realizada pelas bactérias heterotróficas, dentro do microcosmo que inicialmente tem o CO_2 removido para garantir a eficiência da metodologia empregada. Assim, o $^{14}\text{CO}_2$ que fica disponível, é assimilado fotossinteticamente, sendo transformado primeiramente em açúcares e posteriormente pode ser incorporado em virtualmente todos os componentes celulares da cianobactéria.

Estes resultados ainda ressaltam outro papel importante de cianobactérias no processo de biorremediação, o consumo de hidrocarbonetos por bactérias heterotróficas é acompanhado do aumento da emissão de CO_2 para a atmosfera em virtude do aumento da taxa de respiração celular. A associação de um organismo degradador com um organismo que tem papel ecológico de produtor primário, poderia resultar numa menor emissão de CO_2 para a atmosfera e num aumento da incorporação de carbono “limpo” na matéria orgânica do solo. Se considerarmos um cenário em que litros de petróleo tenham sido derramados, as quantidades de CO_2 liberadas para atmosfera, caso empregássemos uma técnica de biodegradação *in situ* utilizando apenas bactérias heterotróficas, seriam consideráveis.

4 – Conclusão

Independentemente de uma participação direta das cianobactérias na degradação de HCs, os tratamentos contendo cianobactérias em consórcio foram capazes de degradar o naftaleno, sendo considerados mais eficazes que o controle bacteriano, o que indica que o emprego de consórcios na biodegradação de tais poluentes, possa ser mais vantajoso e ecologicamente desejável que o emprego somente de bactérias heterotróficas. Estudos complementares envolvendo as cianobactérias precisam ser implementados para o desenvolvimento de estratégias que as envolva na biorremediação *in situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, R. M. M.** (2010). Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **64**: 58-64.
- ABED, R. M. M. & KÖSTER, J.** (2005). The direct hole of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Degradation*. **55**: 29-37.
- ABED, R. M. M.; SAFI, N. M. D.; KÖSTER, J.; DE BEER, D.; EL-NAHHAL, Y.; RULLKÖTTER, J. & GARCIA-PICHEL, F.** (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (4): 1674-1683.
- AGUIAR, R.** (2000). **Systematics and ultrastructure of new and rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming lakes**. Ph.D. Dissertation (Botany) - Colorado State University, Colorado, E.U.A..
- AISLABIE, J. M.; BALKS, M. R.; FOGHT, J. & WATERHOUSE, E.J.** (2004). Hydrocarbon spills on antarctic soils: effects and management. *Environmental Science and Technology*. **38** (5): 1265-1274.
- AISLABIE, J.; FRASER, R.; DUNCAN, S. & FARRELL, R. L.** (2001). Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*. **24**: 308-313.
- AISLABIE, J. M.; BALKS, M. R.; ASTORI, N.; STEVENSON, G. & SYMONS, R.** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in fuel-oil contaminated soils, Antarctic. *Chemosphere*. **39** (13): 2201-2207.
- AL-AWADHI, H.; AL-HASAN, R. H.; SORKHOH, N. A.; SALAMAH, S. & RADWAN, S. S.** (2003). Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates. *International Biodeterioration & Degradation*. **51**: 181-185.
- AL-AWADHI, H.; AL-HASAN, R. H.; & RADWAN, S. S.** (2002). Comparison of the potential of coastal materials loaded with bacteria for bioremediating oily sea water in batch culture. *Microbiological Research*. **157**: 331-336.
- AL-HASAN, R. H.; SORKHOH, N. A.; AL-BADER, D. & RADWAN, S.S.** (1994). Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **41** (5): 615-619.
- ALLARD, A. S. & NEILSON, A. H.** (1997). Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & Degradation*. **39**: 253-285.
- ALLEN, M. M.** (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue green algae on plates. *J. Phycol.* **4**: 1-3.
- AL- THUKAIR, A. A.** (2002). Effect of oil pollution on euendolithic cyanobacteria of the Arabian Gulf. *Environmental Microbiology*. **4** (2): 125-129.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J.** (1999). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1- Introduction. *Algological Studies*. **38-39**: 291-302.

- ANDERSON, J. W.; NEFF, J. M.; COX, B. A.; TATEM, H. E. & HIGHTOWER, G. M.** (1974). Characteristics of dispersions and watersoluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology* (Berlin). **27**:75-88.
- ATLAS, R. M.** (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. **45**: 180-209.
- BARGAGLI, R.** (2005). Antarctic Ecosystems: Environmental contaminations, climate change, and human impact. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 395pp.
- BARTH, H.** (2003). The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal at the Saudi Arabian Gulf shores. *Marine Pollution Bulletin*. **46**: 1245-1252.
- BASTIAN, M. V. & TOETZ, D. W.** (1985). Effect of polynuclear hydrocarbons on algal nitrogen fixation (acetylene reduction) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **35** (1):258-265.
- BATTERTON, J. C.; WINTERS, K. & VAN BAALEN, C.** (1978). Sensitivity of three microalgae to crude oils and fuel oils. *Marine Environmental Research*. **1** (1): 31-41.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*. **7** (6): 1513-1523.
- BROADY, P. A.** (1996). Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiv. Conserv.* **5**: 1307-1336.
- BROADY, P. A.** (1989). BROADSCALE PATTERNS IN THE DISTRIBUTION OF AQUATIC AND TERRESTRIAL VEGETATION AT THREE ICE-FREE REGIONS ON ROSS ISLAND, ANTARCTICA. *Hydrobiologia*. **172** (1): 77-95.
- BROADY, P. A.** (1982). Taxonomy and ecology of algae in a freshwater stream in Taylor Valley, Victoria Land, Antarctica. *Archives in Hydrobiology*. **32**: 331-349.
- BROADY, P. A. & A. L. KIBBLEWHITE.** (1991). Morphological characterization of Oscillatoriales (cyanobacteria) from Ross Island and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science*. **3**: 35-45.
- CASAMATTA, D. A., JOHANSEN, J. R.; VIS, M. L. & BROADWATER, S. T.** (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. **41**: 421-438.
- CERNIGLIA, C. E.; FREEMAN, J. P. & EVANS, F. E.** (1984). Evidence for an arene oxide-NIH shift pathway in the transformation of naphthalene to 1-naphthol by *Bacillus cereus*. *Archives of Microbiology*. **138**:283-286.
- CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. & OUDOT, J.** (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. **155**: 587-595.
- COMTE, K.; SABACKA, M; CARRE-MLOUKA, A.; ELSTER, J. & KOMÁREK, J.** (2007) Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium* -like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiology Ecology*. **59**: 366-376.
- CRIPPS, G.C. & SHEARS, J.** (1997). The fate in the marine environment of a minor diesel fuel spill from an Antarctic research station. *Environmental Monitoring and Assessment*. **46**: 221-232.
- DJOMO, J. E.; DAUTA, A.; FERRIER, V.; NARBONNE, J. F.; MONKIEDJE, A.; NJINE, T.; GARRIGUES, P.** (2004). Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Research*. **38**: 1817-1821.

- DONKOR, V. A. & HÄDER, D. P.** (1995). Protective strategies for several cyanobacteria against solar radiation. *Journal of Plant Physiology*. **145**: 750-755.
- EHLING-SCHULZ, M. & SCHERER, S.** (1999). UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*. **34**: 329-338.
- ELJARRAT, E. & BARCELÓ, D.** (2003). Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **22** (10): 655-665.
- ELSTER, J. & KOMAREK, O.** (2003). Ecology of periphyton in a meltwater stream ecosystem in the maritime Antarctic. *Antarctic Science*. **15**(2): 189-201.
- FERNÁNDEZ-VALIENTE, E.; QUESADA, A.; HOWARD-WILLIAMS, C.; HAWES, I.** (2001). N₂-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microbial Ecology*. **42**(3): 338-349.
- FIGORE, M. F.; MOON, D. H.; TSAI, S. M.; LEE, H. & TREVORS, J. T.** (2000). Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *J. Microbiological Methods*. **39**: 159-169.
- FOGG, G. E.** (1952). The production of extracellular nitrogenous substances by blue – green algae. *Proc. R. Soc., ser. B*, **139**: 372-397.
- GALA, W. R. & GIESY, J. P.** (1992). Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **23** (3): 316-323.
- GARCIA-PICHEL, F. & CASTENHOLZ, R.W.** (1993) Occurrence of UV absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 163-169.
- GAUR, J. P. & SINGH, A. K.** (1989). Growth, photosynthesis and nitrogen fixation of *Anabaena doliolum* exposed to Assam crude extract. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **44** (3): 494-500.
- GERDES, B.; BRINKMEYER, R.; DIECKMANN, G. & HELMKE, E.** (2005). Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology*. **53**: 129-139.
- GRÖTZSCHEL, S.; KÖSTER, J.; ABED, R. M. M.; DE BEER, D.** (2002). Degradation of petroleum compounds immobilized on clay by a hypersaline mat. *Biodegradation*. **13**: 273-283.
- HEITKAMP, M. A.; FREEMAN, J. P. & CERNIGLIA, C. E.** (1987). Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. **53** (1): 129-136.
- HÖPNER, T.; YOUSEF, M.; BERTHE-CORTI, L.; FELZMANN, H.; STRUCK, H. & AL-THUKAIR, A.** (1996). **Cyanobacterial mats on oil-polluted sediments- start of a promising self-remediation process?** In: Krupp F, Abuzinada AH, Nader I (Eds) A Marine Wildlife Sanctuary for the Arabian Gulf. NCWCD, Riyadh and Senckenberg Research Institute, Frankfurt. 85-95.
- HUTCHINSON, T. C.; HELLEBUST, J. A.; MACKAY, D.; TAM, D. & KAUSS, P.** (1979). Relationship of hydrocarbon solubility to toxicity in algae, cellular membrane effects. In: Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington DC, p. 541-547.

- IBRAHEEM, I. B. M.** (2010). Biodegradability of hydrocarbons by cyanobacteria. *Journal of Phycology*. **46**: 818–824.
- ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; DEMARSAC, N. T. & HERDMAN, M.** (2000): Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology-SGM*. **146** (6): 1275-1286.
- KANALY, R.; BARTHA, R.; FOGEL, S. & FINDLAY, M.** (1997). Biodegradation of [¹⁴C] benzo[α]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (11): 4511–4515.
- KIRKWOOD, A.E.; NALEWAJKO, C. & FULTHORPE, R.R.** (2006). The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants. *Microbial Ecology*. **54**: 4-12.
- KOMÁREK, J.** (1999). Diversity of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) of King George Island, maritime Antarctica – a survey. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies* **94**: 181–193.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** (2005). Cyanoprokaryota – 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G. & SCHAGERL, M. (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Heidelberg: Elsevier/Spektrum. 759 pp.
- KOMÁREK, J. & ELSTER, J.** (2008). Ecological background of cyanobacterial assemblages of the northern part of James Ross Island, Antarctica. *Polish Polar Research*. **29** (1): 17–32.
- KOMÁREK, J. & KOMÁREK, O.** (2009). Specificity of cyanobacterial microflora in Antarctica. In: BARTÁK, M.; HÁJEK, J. & VÁCZI, P. (eds.), Structure and function of Antarctic terrestrial ecosystems, Brno October 22-23rd 2009, p. 23-28.
- KOMÁREK, J. & KOMÁREK, O.** (2003). Diversity of cyanobacteria in seepages of King George Island, maritime Antarctica. In: HUISKES, A.H.L. et al. (eds.) Antarctic Biology in a Global Context, Backhuys Publishers, Leiden, Proceedings VIIIth SCAR International Symposium 2001, Amsterdam. 244–250.
- KOMÁREK, O. & KOMÁREK, J.** (1999). Diversity of freshwater and terrestrial habitats and their oxyphototroph microflora in the Arctowski Station region, South Shetlands Islands. *Polish Polar Research*. **20**(3): 259-282.
- KOMÁREK, J.** (2007). Phenotype diversity of the cyanobacterial genus *Leptolyngbya* in maritime Antarctica. *Polish Polar Research*. **28**(3): 211-231.
- KOMÁREK, J.** (1999). Diversity of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) of King George Island, maritime Antarctica – a survey. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*. **94**: 181–193.
- KOSTEL, J. A.; WANG, H.; ST. AMAND, A. L. & GRAY, K. A.** (1999). 1. Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of pcb exposure in a periphytic biolayer. *Water Research*. **33** (18): 3735-3748.
- KUGRENS, P.; CLAY, B. & AGUIAR, R.** (2000). Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, Gen. Et. SP. NOV. (Chlorophyta, Characiosiphnaceae), an unusual coenocyte from Colorado. *Journal of Phycology*. **36**: 421-432.
- KUMAR, M. S. MURALITHARAN, G. & THAJUDDIN, N.** (2009). Screening of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letters*. **31** (12): 1863-1866.

- KURITZ, T. & WOLK, C. P.** (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (1): 234–238.
- LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R.** (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. **54** (3): 305-315.
- LIU, X. & YANG, J.** (2003). Split *dnaE* genes encoding multiple novel inteins in *Trichodesmium erythraeum*. *Journal of Biology Chemistry*. **278**: 26315-26318.
- LUSCINSKA, M. & KYC, A.** (1993). Algae inhabiting creeks in the region of "H. Arctowski" Polish Antarctic Station, King George Is., South Shetlands. *Polish Polar Research*, **14**, 393–405.
- MARGESIN, R. & SCHINNER, F.** (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiological Biotechnology*. **56**: 650–663.
- MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S. & MONTONE, R.C.** (2004). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*. **16** (2): 117-122.
- MATALONI, G.; VINOCUR, A. & PINTO, P. T.** (2005). Abiotic characterization and epilithic communities of a naturally enriched stream at Cierva Point, Antarctic Peninsula. *Antarctic Science*. **17** (2): 163–170.
- MATALONI, G. & KOMÁREK, J.** (2004). *Gloeocapsopsis aurea*, a new subaerophytic cyanobacterium from maritime Antarctica. *Polar Biology*. **27**(10): 623-628.
- MAZZERA, D.; HAYES, T.; LOWENTHAL, D. & ZIELINSKA, B.** (1999). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil at McMurdo station, Antarctica. *Science of the Total Environment*. **229**: 65–71.
- MILLER, M. M.; WASIK, S. P.; HUANG, G. L.; SHIU, Y. W. & MACKAY, D.** (1985). Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environmental Science and Technology*. **19** (6): 522–529.
- MONTESINOS, M. L.; HERRERO, A. & FLORES, E.** (1997). Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *Journal of Bacteriology*. **179**: 853–862.
- NADEAU, T. L. & CASTENHOLZ, R. W.** (1999). Characterization of psychrophilic oscillatorians (Cyanobacteria) from Antarctic melt-water ponds. *J. Phycology*. **36**: 914-923.
- NARRO, M. L.; CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1992 a). Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (4): 1351-1359.
- NARRO, M. L.; CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1992 b). Evidence for an NIH shift in oxidation of naphthalene by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (4): 1360-1363.
- NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DELDOT, T., BLACKALL, L. L., HAWKINS, P. R.; COX, P. T. & GOODMAN, A. E.** (1997): rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis* - *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47** (3): 693-697.
- NTP - Technical Reports: 500 N.** (2000). Toxicology and carcinogenesis studies of naftaleno - National Institute of Health Publication, No. 01-4434.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F. & MUYZER, G. (1997). PCR primers to amplify 16s rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (8): 3327–3332.

O'BRIEN, P. A. & HOUGHTON, J. A. (1982). Photoreactivation and excision repair on UV induced pyrimidine dimers in the unicellular cyanobacterium *Gleocapsa alpicola* (*Synechocystis* PCC 6803). *Photochemistry and Photobiology*. **35**: 359-364.

OLIVEIRA, L. M. de (2005). **Hidrocarbonetos de solos próximos à Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

OLSON, J. B.; STEPPE, T. F.; LITAKER, R. W.; PAERL, H. W. (1998). N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology*. **36**(3): 231-238.

PALENIK, B. & RASELKORN, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. *Nature*. **355** (6357): 265-267.

PARKER, B. C. & SIMMONS, G. M. Jr. (1985). Paucity of nutrient cycling and absence of food chains in the unique lakes of Southern Victoria Land. In SIEGFRIED, W. R., CONDY, P. R. & LAWS, R. M. (Eds.). **Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs**. Berlin: Springer. 237-244.

PEAKALL, D. B. & SHUGART, L. R. (1998). Biomarkers. In: Meyers, R.A. (Ed.). **Environmental Analysis and Remediation**. John Wiley & Sons, New York, pp. 732–755.

PHILLIPS, R. & VINCENZINI, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**: 151–175.

PIZARRO, H.; VINOCUR, A. & TELL, G. (2002). Periphyton on artificial substrata from three lakes of different trophic status at Hope Bay (Antarctica). *Polar Biology*. **25**: 169-179.

PIZARRO, H. & VINOCUR, A. (2000). Epilithic biomass in an outflow stream at Potter Peninsula, King George Is., Antarctica. *Polar Biology*. **23**: 851-857.

PIZARRO, H. IZAGUIRRE, I. & TELL, G. (1996). Epilithic algae from a freshwater stream at Hope Bay, Antarctica. *Antarctic Science*. **8** (2): 761-167.

QUESADA, A.; VINCENT, W. F. & LEAN, D. R. S. (1999). Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiology Ecology*. **28**: 315-323.

RADWAN, S. S.; AL-AAWADI, H.A. & KHANAFER, M. (2001). Effects of lipids on n-alkane attenuation in media supporting oil-utilizing microorganisms from the oily Arabian Gulf coasts. *FEMS Microbiology Letters*. **198**: 99-103.

RAGHUKUMAR, C.; VIPPARTY, V.; DAVID, J.J. & CHANDRAMOHAN, D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*. **57**:433–436.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. (1992). Zatoka Admiralicji, Antarktyka. *Institut Ekologii PAN, Dziekanów Lesny*. 287 pp.

SAFONOVA, E. T.; DMITRIEVA, I. A. & KVITKO, K. V. (1999). The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resources, Conservation and Recycling*. **27**:193–201.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (2nd ed.) N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.

SÁNCHEZ, O.; FERRERA, I.; VIGUÉS, N.; OTEYZA, T. G.; GRIMALT, J. & MAS, J. (2006). Role of cyanobacteria in oil biodegradation by microbial mats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **64**: 659-664.

SANTOS, I. R.; SCHAEFER, C. G. R.; SILVA-FILHO, E. V.; ALBUQUERQUE, M. A. & ALBUQUERQUE FILHO, M. R. (2004). Contaminantes antrópicos em ecossistemas antárticos: estado-de-arte. In SCHAEFER, C. G. R.; FRANCELINO, M. R.; SIMAS, F. N. B. & ALBUQUERQUE FILHO, M. R. (Ed.). *Ecossistemas Costeiros e Monitoramento Ambiental da Antártica Marítima*. Viçosa: NEPUT. 95-106.

SANTUCCI, K. & SHAH, B. (2000). Association of naphthalene with acute hemolytic anemia. *Academic Emergence Medicine*. **7**: 42-47.

SETZER, A. W.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCELINO, M. R.; SCHAEFER, C. G. R.; COSTA, L. M. & BREMER, U. F. (2004). Regime climático na Baía do Almirantado: Relações com o ecossistema terrestre. In SCHAEFER, C. G. R.; FRANCELINO, M. R.; SIMAS, F. N. B. & ALBUQUERQUE FILHO, M. R. (Ed.). *Ecossistemas Costeiros e Monitoramento Ambiental da Antártica Marítima*. Viçosa: NEPUT. 95-106.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M. & POOLMAN, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. **59** (2): 201-222.

SMITH, R. I. L. (1985). Nutrient cycling in relation to biological productivity in antarctic and sub-antarctic terrestrial and freshwater ecosystems. In SIEGFRIED, W. R., CONDY, P. R. & LAWS, R. M. (Eds.). *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*. Berlin: Springer. 138-155.

STEINMAN, A. D. & MCINTIRE, C. D. (1990) Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environmental Management*. **14**: 589-604.

STEWART, W. D. P. (1963). Liberation of extracellular nitrogen by two nitrogen fixing blue-green algae. *Nature*, **200** (4910): 1020-1021.

STRUNECKÝ, O.; ELSTER, J. & KOMÁREK, J. (2010). Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biology*. **33**:1419-1428.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**:1596-1599.

TANDEAU de MARSAC, N. & HOUMARD, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FMS Microbiology Reviews*. **104**: 119-190.

TANG, E. P. Y.; TREMBLAY, R. & VINCENT, W. F. (1997). Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperatures? *Journal of Phycology*. **33**: 171-181.

TANG, T. & ASATO, T. (1978). Ultraviolet light induction and photoreactivation of thymine dimers in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives in Microbiology*. **118**:193-197.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DE WIT, R. & WILMOTTE, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry

Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(9): 5157-5169.

WIDDEL, F. & RABUS, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. **12**: 259-276.

WYNDHAM, R. C. & COSTERTON, J. W. (1981). Heterotrophic potentials and hydrocarbon biodegradation potentials of sediment microorganisms within the Athabasca oil sands deposit. *Applied and Environmental Microbiology*. **41** (3): 783-790.

VEZINA, S. & VINCENT, W. F. (1997). Arctic cyanobacteria and limnological properties of their environment: Bylot Island, Northwest Territories, Canada (73 degrees N, 80 degrees W). *Polar Biology*. **17**: 523-53.

VINCENT, W.F. AND QUESADA, A. (1994) Ultraviolet radiation effects on cyanobacteria: implications for Antarctic microbial communities. *Antarctic Research Series*. **62**: 111-124.

VINOCUR, A. & PIZARRO, H. (1995). Periphyton flora of some lotic and lentic environments of Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biology*. **15**:401-414.

XU, R. & OBBARD, J. P. (2003). Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *Journal of Environmental Quality*. **32**:1234-1243.

ZEHR, J. P.; MELLON, M. T. & HIORNS, W. D. (1997). Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: Evolutionary implications and potential applications to natural assemblages - *Microbiology-UK*. **143** (4): 1443-1450.

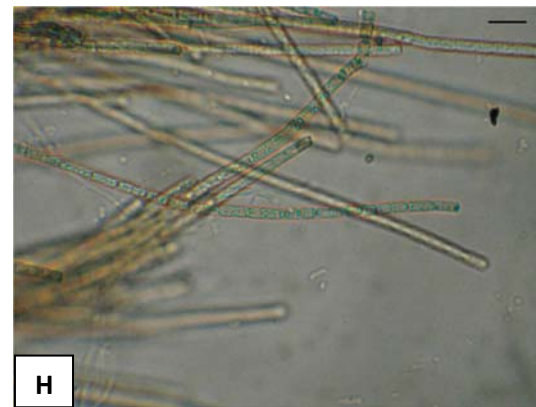
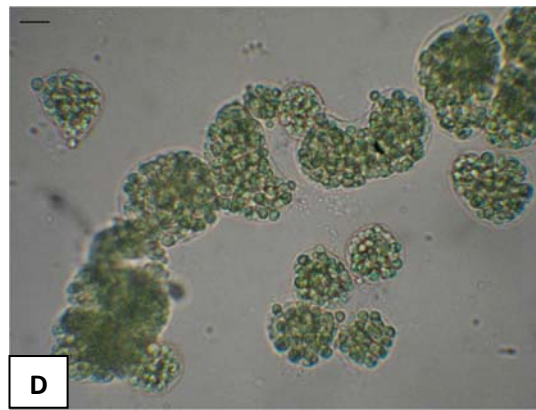
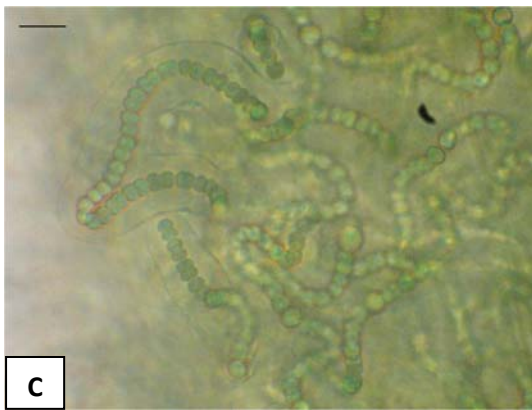
ZUBKOV, M. V.; FUCHS, B. M. ; TARRAN, G. A.; BURKILL, P. H. & AMANN, R. (2003). High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (2): 1299-1304.

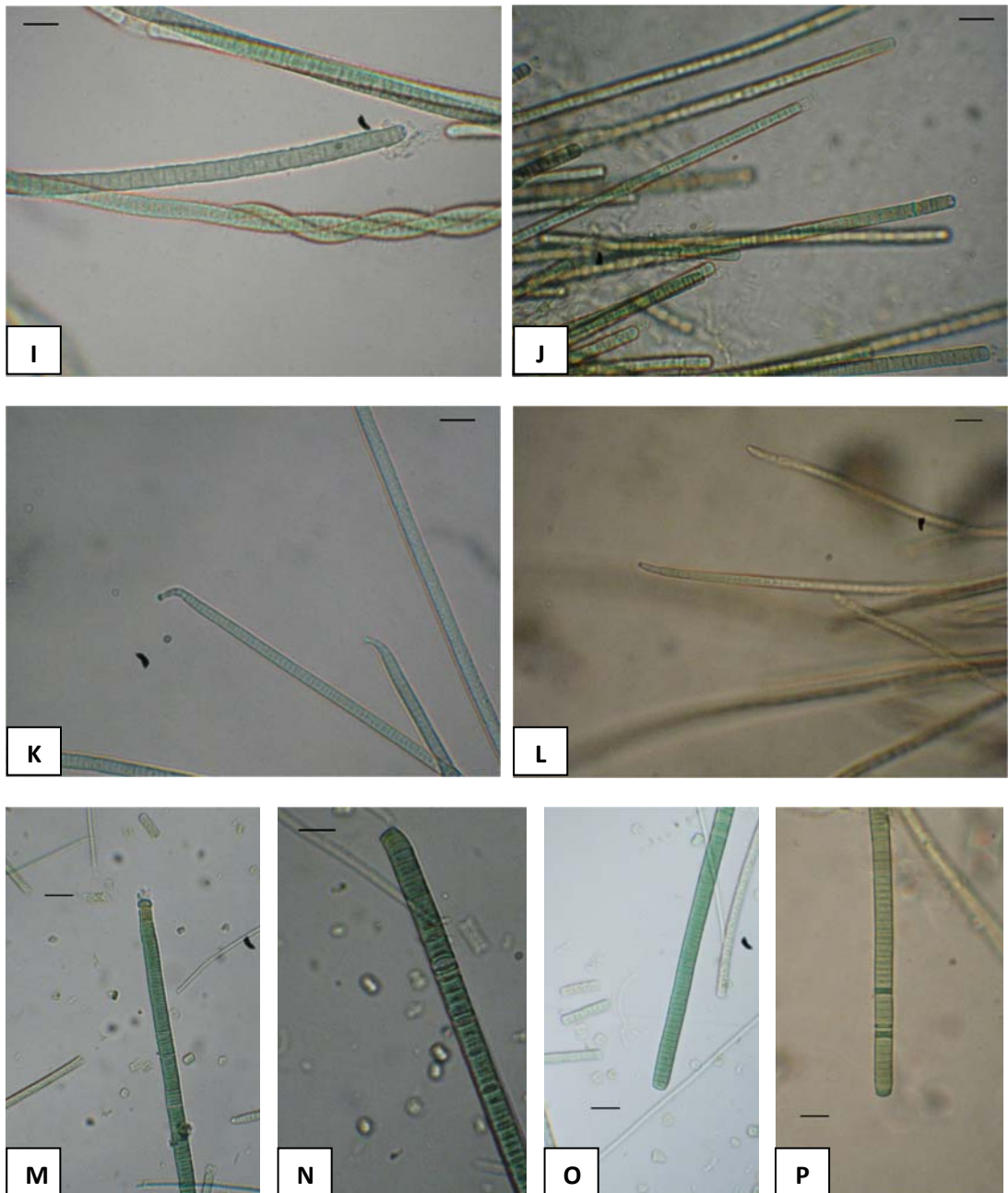
ANEXO I



Figura 1: Diferentes ambientes encontrados na Antártica Marítima: **A)** Tanques; **B)** Lagos glaciais; **C)** Lagos entre morainas; **D)** Canais de degelo formando cachoeiras; **E)** Canais de degelo cortando pingueira; **F)** Terrenos alagados.

ANEXO II





←

Figura 1: **A)** *Fischerella* sp. **B)** *Hydrocoryne* sp.; **C)** *Nostoc commune*; **D)** *Nostoc* sp. UFV-ANT23; **E-F)** *Tolypothrix* sp. UFV-ANT22; **G)** *Gloecapsopsis aurea*; **H)** *Leptolyngbya* sp.2; **I)** *Phormidium autumnale* ANT-UFV02; **J)** *Phormidium* sp.1; **K)** *Leptolyngbya* cf. *borchgrevinkii*; **L)** *Phormidium autumnale* ANT-UFV01; **M)** *Oscillatoria* sp.1 **N)** *Oscillatoria* cf. *subproboscidea*; **O)** *Oscillatoria* cf. *fracta*; **P)** *Phormidium* sp.2. Barra: 10 µm.

ANEXO III

Meios de Cultivo

1 – Composição do meio de cultura AA4

O meio utilizado neste trabalho para o cultivo de cianobactérias é uma adaptação do meio AA4 (Allen & Arnon, 1955), na qual as soluções Fe-EDTA e solução de micronutrientes são substituídas pelas soluções de Fe-EDTA e A5 do meio BG-11 (Allen & Arnon, 1968).

Solução A (- Pi)	
Componentes	Quantidade
NaCl	20 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	20 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	6 g
H ₂ O (deionizada)	Completar p/ 1,5 L

Solução B (+ Pi)	
Componentes	Quantidade
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	28 g
H ₂ O (deionizada)	Completar p/ 500 mL

Solução A5 (Micronutrientes)	
Componentes	Quantidade
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,222 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,079 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,05 g
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O ou MoO ₃ (85 %)	0,018 g
H ₂ O (deionizada)	Completar p/ 1 L

Solução Fe-EDTA	
Componentes	Quantidade
Na₂ EDTA	0,1 g
Citrato férrico de amônia	0,6 g
Ácido cítrico. H₂O	0,6 g
CaCl₂. 2 H₂O	3,6 g
H₂O (deionizada)	Completar p/ 1 L

Para preparar 1L de meio de cultura AA4 (modificado por Corrêa, 2007) devem ser utilizadas as seguintes alíquotas de cada solução estoque:

Solução Estoque	Quantidade
Solução A (- Fosfato)	25 mL
Solução B (+ Fosfato)	6,25 mL
Solução A5 (Micronutrientes)	1 mL
Solução Fe-EDTA	10 mL
H₂O (deionizada)	Completar p/ 1 L
Para meio AA4 suplementado com nitrato	
KNO₃	0,256 g. L⁻¹
NaNO₃	0,212 g. L⁻¹

Antes de autoclavado, o meio deve ter o pH ajustado para 7,2. O meio de cultura deve ser autoclavado à temperatura de 121°C, por vinte minutos. A solução B deve ser autoclavada separadamente dos demais componentes e, após a autoclavagem deve ser adicionada ao restante do meio, ainda quente, sob uma capela de fluxo laminar.

2 – Composição do meio mínimo mineral MMM

O meio mínimo mineral foi utilizado para o cultivo de bactérias heterotróficas, acrescido de 2% de diesel como única fonte de carbono. Apesar de não recomendado, o diesel foi adicionado ao meio antes da autoclavagem, de maneira que as frações mais voláteis podem ter sido perdidas durante o processo.

MMM: Meio mínimo mineral	
Componentes	Quantidade
K₂HPO₄ · 3H₂O	4,0 g
KH₂PO₄ · 3H₂O	1,0 g
NH₄NO₃	1,0 g
NaCl	1,0 g
MgSO₄ · 7 H₂O	0,25 g
Solução estoque de minerais	10 mL
H₂O (deionizada)	Completar p/ 1 L

Solução Estoque de Minerais	
Componentes	Quantidade
H₃BO₃	3,0 g
MnCl₂ · 4 H₂O	11,5 g
FeSO₄ · 7 H₂O	60,0 g
CoCl₂ · 6 H₂O	8,0 g
ZnSO₄ · 5 H₂O	7,0 g
CuCl₂ · 2 H₂O	3,0 g
Na₂ EDTA	50,0 g
H₂O (deionizada)	Completar p/ 100 mL

ANEXO IV

Sequências de nucleotídeos geradas neste trabalho

1- Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem *Phormidium autumnale* UFV- ANT01 (1413 pb) a partir deste trabalho:

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTAGCAATACTTAGTGGCGGACGGG
TGAGTAACGCGTGAGAATCTACCTTCAGGACGGAGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAACCCCGATG
TACCGAAAGGGCAAATATTTATAGCCTGAAGAAGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGAGAGGTAAA
AGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGAC
CGCGTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCCCTTTTCTCTGGGAAGAACGCAATGACGGTACCA
GAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGG
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACCCGGGGCTCAACCTC
GGAAAGGCAGTGGAAACTGAACAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTTTGCTGGACCATAACTGACTCAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACCGATGGATACTAG
GTGTTGTCTGTATCGACCCGGACAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAC
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGAAGGAGTGCCTTAGG
GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTGTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAACAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAAT
GGTAGGGACAAAGGGCAGCCAACCCGCGAGGGCGAGCTAATCCCGTAAACCCTGCCTCAGTTCAGATT
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAAT
CCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGAAGTTGGCCACGCCGAAGTCATTACTCT
AACCTTTCGAGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

2- Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem *Phormidium autumnale* UFV- ANT02 (1413 pb) a partir deste trabalho:

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTAGCAATACTTAGTGGCGGACGGG
TGAGTAACGCGTGAGAATCTACCTTCAGGACGGAGACAACGGTTGGAAACGACTGCTAACCCCGATG
TACCGAAAGGGCAAATATTTATAGCCTGAAGAAGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGAGAGGTAAA
AGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGAC
CGCGTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCCCTTTTCTCTGGGAAGAACGCAATGACGGTACCA
GAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGTGAAGCGTTATCCGG
AATGATTGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACCCGGGGCTCAACCTC
GGAAAGGCAGTGGAAACTGAACAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATACGTAGAGATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTTTGCTGGACCATAACTGACTCAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACCGATGGATACTAG
GTGTTGTCTGTATCGACCCGGACAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAC
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGAAGGAGTGCCTTAGG
GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTGTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAACAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAAT
GGTAGGGACAAAGGGCAGCCAACCCGCGAGGGCGAGCTAATCCCGTAAACCCTGCCTCAGTTCAGATT
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAAT
CCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGAAGTTGGCCACGCCGAAGTCATTACTCT
AACCTTTCGAGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

3 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem *Nostoc* sp. UFV- ANT24 (1415 pb) a partir deste trabalho:

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTTCGGACACAGTGGCGGACGGG
TGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG

TGCCCTTCGGGGTGAAAGATTAATTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAA
AGGCGCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA
CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACC
TGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG
GAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCAATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCT
CATAAGAGCAGTGGAACTACATAGCTAGGGTACGTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGTAACACTGACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAG
GCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCCG
GCAACGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GAATGATTGGGCGTAAAGCCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCTCTTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGG
GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTAACAAT
GCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCATGCGAATGCAAGCAAATCCCGTAAACCGGAGCTCAGTTCAGATC
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAAT
TCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACTCC
AACCTTTCGGGGGGGAGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

4 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem *Nostoc* sp. UFV- ANT24 (1415 pb) a partir deste trabalho:

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTTCGGGCACAGTGCCGGACGGG
TGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTCTGGGACAACCCTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATG
TGCCCTTCGGGGTGAAAGATTAATTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAA
AGGCGCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA
CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGACGGTACC
TGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG
GAATGATTGGGCGTAAAGCCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTCTTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGG
GATAAGAGCAGTGGAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGTAACACTGACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAG
GCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCCG
GCAACGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTCTTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGG
GAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTAACAAT
GCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCATGCGAGTGAAGCAAATCCCGTAAACCGGAGCTCAGTTCAGATC
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGTAGTAATTGCAGGTGAGCATACTGCAGTGAAT
TCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACTCC
AACCATTTCGGGAGGAGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

5 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem *Tolypothrix* sp. UFV- ANT22 (1411 pb) a partir deste trabalho:

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTTAGGGATTTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTACAGGTCCGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGA
TATGCCGAGAGGTGAAAGATTAATTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
GAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA
CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACC
TGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG
GAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGAGGTGGCGATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCATGCTCAACAT
GATAAGAGCAGTGGAACTACAGAGCTAGAGTGCCTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACTGTTGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAG
GCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAC
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCTTTTGAAGAGAGAGTGCCTTCGG
GGGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAC

CGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAAT
GCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATC
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAAT
TCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCGAAGTCATTACCC
AACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

**6 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA gerada para a linhagem
Tolypothrix sp. UFV- ANT25 (1415 pb) a partir deste trabalho:**

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTTAGGGATTTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACCGGTGAGAATCTGGCTTCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGA
TATGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
GAGCCTACCAAGGGCAGCAGTACGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATA
CCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGCTAAACCTCTTTTCTCAGGAAAGAAAAAATGACGGTACC
TGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG
GAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGAGGTGGCGATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCATGCTCAACAT
GATAAGAGCAGTGGAACCTACAAAGCTAGAGTGCCTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAG
GCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCAC
GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATCTTTTGAAGATGGGAGTGCCTTCGGG
AGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATG
CTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCG
CAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATT
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCGAAGTCATTACCCCA
ACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

ANEXO V

Aparato Respirométrico

1 – Caracterização do aparato

O experimento de degradação de $[C^{14}]$ naftaleno foi conduzido num sistema respirométrico, previamente descrito por Albuquerque (1995). O aparato consiste de: (1) uma fonte de ar comprimido; (2) um sistema de armadilhamento de CO_2 , que visa tornar o ar que entra no sistema livre de CO_2 , composto de uma garrafa de Dreschel contendo 500 g de *soda lime* e de (3) uma armadilha líquida (1 L de solução NaOH 5M), com algumas gotas de solução indicadora de pH (Tropeolin O a 0,1%); (4) Erlenmeyers contendo os tratamentos, que possuem uma entrada de ar (livre de CO_2) e uma saída de ar (por onde o $^{14}CO_2$ liberado pode escapar e ser capturado em (5); e (5) um sistema de captura de $^{14}CO_2$, composto por armadilhas (uma para cada amostra de solo) contendo 35 mL de solução de NaOH 0,7 M, as quais capturam o $^{14}CO_2$ mineralizado de cada amostra de solo. A Fig. 1 apresenta um esquema simplificado do aparato utilizado.

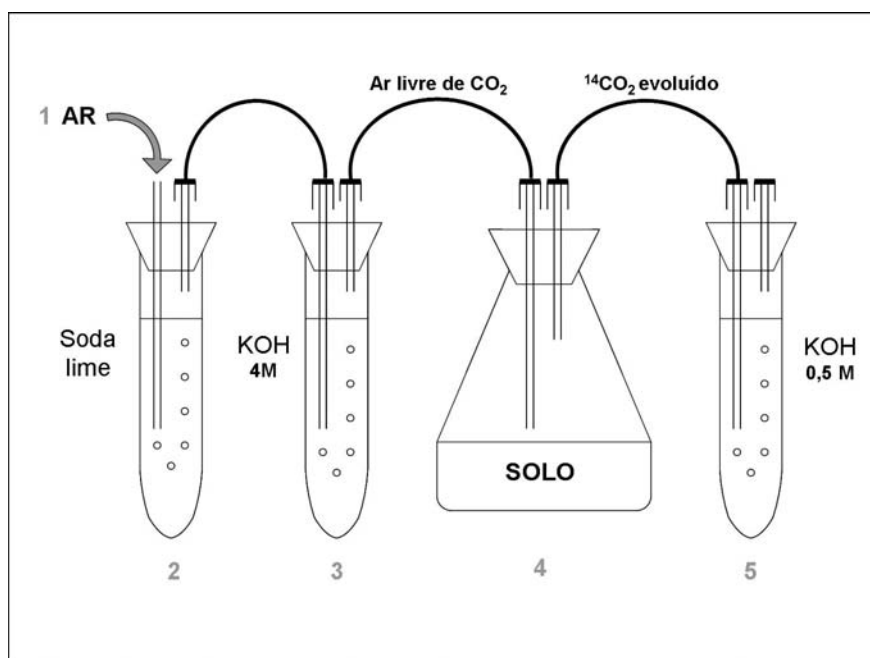


Figura 1: Esquema simplificado do aparato respirométrico.

2 – Solo utilizado como substrato de crescimento em experimentos de biodegradação

Foi utilizado nos experimentos de degradação, como substrato de crescimento para o biofilme de cianobactérias, o solo coletado próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), na Ilha Rei George, Antártica. O solo utilizado foi coletado à profundidade de 0-10 cm, e caracteriza-se por apresentar textura arenosa, baixa concentração de nitrogênio, alta concentração de fósforo e concentração natural de carbono orgânico total baixa. Um incidente durante a manipulação de diesel JP1, combustível comumente usado na geração de energia na EACF, levou à contaminação do solo no ponto amostrado, enriquecendo-o com carbono na forma de HCs. As concentrações máximas de naftaleno, encontradas na área amostrada, foram de 1,19 ng.g⁻¹ de solo seco (Oliveira, 2005).