

ELIANE APARECIDA DE SOUZA

**POTENCIAL DE CIANOBACTÉRIAS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE
ÁGUAS E SOLOS CONTAMINADOS POR ARSÊNIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

T

S729p
2007

Souza, Eliane Aparecida de, 1978-

Potencial de cianobactérias para a biorremediação de
águas e solos contaminados por arsênio / Eliane Apare-
cida de Souza. – Viçosa, MG, 2007.
xix, 51f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Rosane M. Aguiar Euclides.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-51.

1. Cianobactérias - Crescimento. 2. Cianobactérias -
Morfologia. 3. Biorremediação. 4. Arsênio - Absorção e
adsorção. 5. Arsênio - Toxicologia. 6. Água - Remoção
de arsênio. 7. Solo - Remoção de arsênio. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 577.62753

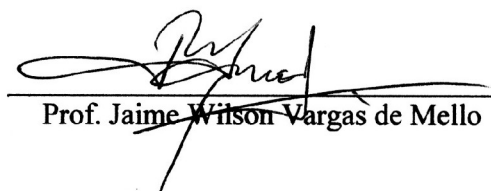
ELIANE APARECIDA DE SOUZA

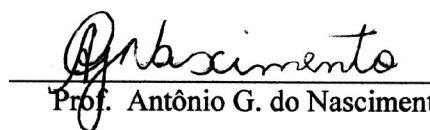
**POTENCIAL DE CIANOBACTÉRIAS PARA A BIORREMEDIÇÃO DE
ÁGUAS E SOLOS CONTAMINADOS POR ARSÊNIO**

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

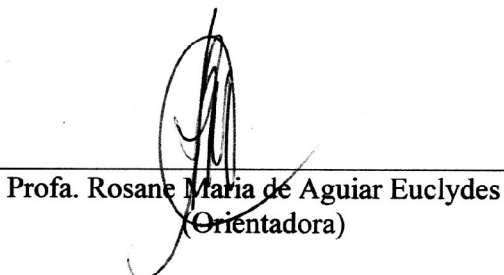
APROVADA: 20 de setembro de 2007.


Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Co-Orientador)


Prof. Jaime Wilson Vargas de Mello


Prof. Antônio G. do Nascimento


Prof. Rogério Ferreira Ribas


Prof. Rosane Maria de Aguiar Euclides
(Orientadora)

*“Foi lá (nas Ilhas Salomon) que me conscientizei
de que o grande lance não é chegar ao destino,
mas estar trabalhando para chegar lá.*

Chegar acaba com a graça, com a luta gostosa, com o sonho.

O bom é estar no campo jogando.

*É claro que ganhar é ótimo, mas quem realmente ama o que faz,
o fazer é o extremo do prazer.”*

Trecho de “Aventuras no Mar”, Hélio Setti Jr.

À minha orientadora Professora Dr. Rosane Aguiar.
Aquele que deveria ser simplesmente professora, foi mestre;
que, quando deveria ser só mestre, foi amiga e, em sua amizade,
me compreendeu e incentivou a seguir meu caminho.

Aos meus queridos pais Geraldo e Zilda, exemplos de vida e força, os quais
me possibilitaram a possibilidade da realização de um grande sonho.

Aos meus irmãos Elaine e Geraldo Magela, aos meus
sobrinhos João Eduardo, Luiz Henrique e Guilherme e aos meus
cunhados Carlos Eduardo e Eliene, meus
sempre torcedores.

Ao Cláudio, a alegria de hoje também é sua, pois seu
estímulo e carinho foram armas desta vitória.

Aos meus amigos Daniela, Welson, Emanuelle, Regina, Alan, Eduardo,
Adriana, Cláudio, Elisa, Débora e Maione – exemplos de parceria,
confiança, atenção, esmero, orientação e extrema dedicação
à parte experimental deste trabalho, sobretudo os interessantes
e importantes conselhos, discussões, correções
e direcionamentos intelectuais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, hoje mais do que nunca, compreendo a existência de uma força maior. Sei que essa força me ajudou a seguir por este caminho que chegou ao fim e sei que essa mesma força me fará seguir sempre em frente para qualquer outro caminho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado.

À Dra. Rosane M. Aguiar Euclides, pela orientação, pelas horas infindáveis de paciência e compreensão dedicadas, sempre no sentido de impulsionar o crescimento espiritual, pessoal, intelectual e profissional; permanece como referência, um exemplo de vitória, sabedoria e de vida para mim.

Aos meus co-orientadores Professores Dr. Juraci Alves de Oliveira e Dr. Paulo Roberto Cecon, pelas contribuições indispensáveis, pelo carinho e pela amizade.

Aos Professores Dr. Antônio G. do Nascimento, Dr. Jaime Wilson Vargas de Mello e Dr. Rogério F. Ribas, pela participação em minha Banca e pela valiosa e essencial contribuição.

À Escola Municipal Affonso Alves Pereira, especialmente ao Diretor Jorge Luiz Baêso e à Supervisora Pedagógica e estimada amiga Darlene Maria Alves de Oliveira, a quem agradeço eternamente pela confiança e compreensão.

Aos meus alunos, que sempre me respeitaram e acreditaram e colaboraram no meu trabalho.

Ao Professor Wagner Otoni, coordenador do curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, pelo incentivo e pela credibilidade.

A todos os professores do Departamento de Biologia Vegetal, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

Aos técnicos da Unidade de Crescimento de Plantas-UCP Rogério Gomide e João Bosco, pela disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho, em especial pela amizade.

Ao Ângelo e Ilza, funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela incansável atenção, paciência, apoio, carinho e alegria sempre... vocês foram realmente essenciais.

A todos os meus colegas da Pós-Graduação em Botânica e Fisiologia Vegetal, pelo incentivo e pela amizade.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial à Técnica Maria Mercês e aos funcionários Carlos Raimundo, Reginaldo e Oswaldo, pela colaboração e prestatividade.

A Alan, Daniela e Eduardo, pela grande paciência e disponibilidade em ensinar seus conhecimentos.

À aqueles que deveriam ser apenas colegas de laboratório, mas foram mais, e aos meus amigos inesquecíveis da UCP Elisa, Eduardo, Cláudio, Adriana, Débora, Alan, Rosiane, Maione, Kacilda, Karolina, Rogério Ribas, Viviane e Letícia, pela cumplicidade e pelo carinho.

Às minhas amigas e irmãs de república Thais, Daniela, Emanuelle, Regina, Lúcia, Wilka, Larisse, Nilza e Carol, pela amizade sincera, pelo conforto nos momentos difíceis e pela torcida.

Aos meus amigos conseguidos em Viçosa de todo canto deste Brasil: Elaine Cabrini, Larissa, Carlos, Wagner, Gracineide, Mariana, Mary, Marcos, Leandro, Aline, Ronisley, Ana Luiza, Breno, Werner, Valdir, Roni, Zanca, Kelly, Karina, Marina, Daiana, Josiane, Rafaela, Otávia, Francisleudo, Ana Maria, Lutécia, Simone, Luana, Mayra, Érica, Diogo, Bruno, Marcelo, Jaqueline, Virgínia, Lívia e Flávia, pelos inesquecíveis momentos que vivemos juntos; saudades sempre!

Ao meu grande amigo José Elias, pelo incentivo e apoio.

Ao meu amigo de todas as horas Vicente, a quem carinhosamente chamo de “meu motorista”, pela presteza.

Ao Leandro Goulart, por toda a sua alegria, paciência e carinho.

À Elaine Baêso, pela amizade e ajuda sempre.

Aos meus familiares, por terem, de alguma forma, torcido por mim.

À Companhia Brasileira de Alumínio – Votorantim, pela oportunidade de trabalho, em especial à Equipe de Meio Ambiente da qual faço parte.

Às cianobactérias, objeto de estudo deste trabalho, pela sua existência, paixão que me permitiu uma grande realização.

BIOGRAFIA

ELIANE APARECIDA DE SOUZA, filha de Geraldo de Souza e Zilda das Graças Sinigalha e Souza, nasceu em Miraí, Minas Gerais, em 14 de agosto de 1978.

Em 2001, recebeu o título de Licenciada em Biologia pela Universidade Estadual de Minas Gerais – Campus de Carangola.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em setembro de 2007.

“Não escolhi ser uma pessoa comum. É meu direito ser diferente, ser singular, incomum, desenvolver os talentos que Deus me deu. Não desejo ser um cidadão pacato modesto, dependendo sempre de alguém. Quero correr o risco calculado, sonhar e construir, falhar e suceder. Recuso trocar o incentivo por doação. Prefiro as intemperanças à vida garantida. Não troco minha dignidade por ajuda de outros. Não me acovardo e nem me curvo ante ameaças. Minha herança é ficar: firme, altivo e sem medo; pensar e agir por conta própria e, aproveitando os benefícios da minha criatividade, encarar arrojadamente o mundo e dizer: ISTO É O QUE EU SOU.”

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos	6
2. METODOLOGIA	7
2.1. Local de coleta e amostragem	7
2.2. Enriquecimento e cultivo das amostras	7
2.3. Isolamento e identificação.....	9
2.4. Seleção de espécies	9
2.5. Curva de crescimento das espécies em presença de arsênio	11
2.6. Acúmulo de arsênio.....	12
2.7. Determinação da concentração de proteína, tíóis não protéicos e conteúdo de clorofila <i>a</i>	13
2.7.1. Extração e quantificação de proteínas totais	13
2.7.2. Extração e quantificação da concentração de tíóis não protéicos....	14
2.7.3 Determinação do teor de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>).....	15

	Página
2.8. Caracterização morfológica e registro fotográfico	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Isolamento e identificação	17
3.2. Seleção das espécies e análise do crescimento.....	22
3.3. Análise de crescimento em presença de arsênio.....	25
3.4. Acúmulo de arsênio nas espécies de cianobactérias	27
3.5. Concentração de proteínas totais	28
3.6. Concentração de tióis totais não protéicos	29
3.7. Conteúdo de clorofila <i>a</i>	30
3.8. Caracterização morfológica das células de cianobactérias expostas ao arsênio	31
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Composição do meio de cultivo BG-11 com ou sem fontes de nitrogênio (N).....	8
2. Valores médios do tempo de geração (TG) das cianobactérias isoladas.....	23
3. Valores médios do crescimento máximo das cianobactérias isoladas.....	23
4. Equações de regressão ajustadas das variáveis célula (CÊL) e turbidez (TÛRB), em função da concentração de As em <i>Nostoc piscinale</i> e <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , seguida do coeficiente de determinação (R^2)	26

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Ilustração dos taxa isolados de águas e solos contaminados com arsênio: A)- <i>Nostoc piscinale</i> ; B)- <i>Nostoc planctonicum</i> ; C)- <i>Nostoc</i> sp; D)- <i>Calothrix marchica</i> ; e E)- <i>Geitlerinema unigranulatum</i> . Célula vegetativa (Cv); acineto (A); heterócito terminal e intercalar (H); e grânulos (Gr)	18
2A. Fotomicrografia (ML) de <i>Nostoc piscinale</i> . Célula vegetativa (Cv); e heterócito terminal e intercalar (H)	19
2B. Fotomicrografia (ML) de <i>Nostoc piscinale</i> exposta à tinta-nanquim. Observar detalhe do espessamento da bainha mucilaginosa (Bm) e a forma globosa das células vegetativas (Cv)	19
2C . Fotomicrografia (ML) de filamentos de <i>Nostoc planctonicum</i> . Célula vegetativa (Cv) e heterócito intercalar (H).....	20
2D. Fotomicrografia (ML) de <i>Nostoc</i> sp. Detalhes dos filamentos mostrando célula vegetativa (Cv) e heterócito terminal (H)	20
2E. Fotomicrografia (ML) de <i>Calothrix marchica</i> . Detalhes dos filamentos mostrando célula vegetativa (Cv) e heterócito terminal (H)	21
2F. Fotomicrografia (ML) dos filamentos de <i>Geitlerinema unigranulatum</i> . Note a aparência granulosa das células e grânulos de cianoficina (Gr) (seta)	21
2G. Fotomicrografia de (ML) <i>Geitlerinema unigranulatum</i> . Detalhe dos grânulos de cianoficina (Gr) e da bainha mucilaginosa (Bm).....	22

3. Representação gráfica das curvas de crescimento dos cinco organismos isolados em função do tempo, em horas (h). Dados obtidos das leituras de OD _{750 nm} (turbidez). *** efeito significativo a 0,1% de probabilidade, pelo teste F.....	24
4. Representação gráfica das curvas de crescimento dos cinco organismos isolados em função do tempo, em horas (h). Dados obtidos das contagens do N ^o Cél mL ⁻¹ . *** efeito significativo a 0,1% de probabilidade, pelo teste F.....	24
5. Representação gráfica da superfície de resposta da espécie <i>Nostoc piscinale</i> . OD _{750 nm} (A) e N ^o de Cél mL ⁻¹ (B) em função do tempo e diferentes concentrações de As	25
6. Representação gráfica da superfície de resposta da espécie <i>Geitlerinema unigranulatum</i> . OD _{750 nm} (A) e N ^o de Cél L ⁻¹ (B) em função do tempo e de diferentes concentrações de As.....	26
7. Representação gráfica da concentração de As acumulado nas células de <i>Nostoc piscinale</i> e <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , expostas a diferentes doses de As (0,0; 5,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; e 250,0 mg L ⁻¹), após 10 dias de experimento.....	27
8. Representação gráfica da concentração de proteínas totais em <i>Nostoc piscinale</i> e <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , expostas a diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e * efeitos significativos a 0,1% e 5% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente	28
9. Representação gráfica da concentração de tióis totais não-protéicos em <i>Nostoc piscinale</i> e <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , expostos às diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e ** efeito significativo a 0,1% e 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente	29
10. Representação gráfica do conteúdo de Chl <i>a</i> em <i>Nostoc piscinale</i> e <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , expostas às diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e * efeitos significativos a 0,1% e 5% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente	30
11. Efeito do As nas culturas de <i>Nostoc piscinale</i> , após 10 dias de experimento, nas concentrações: A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: 250,0 mg L ⁻¹	31
12. Efeito do As nas culturas de <i>Geitlerinema unigranulatum</i> , após 10 dias de experimento, nas concentrações: A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: 250,0 mg L ⁻¹	31

13A. Fotomicrografia (ML) de filamentos de <i>Nostoc piscinale</i> (controle). Observar filamentos retilíneos (seta) e células vegetativas (Cv) com aspecto normal, após 10 dias de experimento	32
13B. Fotomicrografia (ML) de filamentos de <i>Nostoc piscinale</i> . Tratamento (5 mg L ⁻¹). Observar filamentos (seta) mais curtos que longos, após 10 dias de experimento	33
13C. Fotomicrografia (ML) de filamentos de <i>Nostoc piscinale</i> . Tratamento (150 mg L ⁻¹). Detalhes da presença de filamento isolado com muitos acinetos (A) e redução do protoplasto (P), após 10 dias de experimento	33
13D. Fotomicrografia (ML) de filamento de <i>Nostoc piscinale</i> , com coloração de nanquim, tratados com 250 mg L ⁻¹ . Detalhe da Bainha mucilaginosa (Bm) menos espessa e células vegetativas (Cv) deformadas e sem protoplasto ao longo do filamento	34
14A. Fotomicrografia (ML)/contraste de fase de <i>Geitlerinema unigranulatum</i> (controle). Aspecto normal dos filamentos (setas), com a presença de grânulos (Gr), após 10 dias de experimento	35
14B. Fotomicrografia (ML) <i>Geitlerinema unigranulatum</i> cultivada em BG-11 com As (5 mg L ⁻¹): aspecto geral dos filamentos (seta). Detalhe da presença de grânulos (Gr), característica marcante dessa espécie.....	35
14C. Fotomicrografia (ML) <i>Geitlerinema unigranulatum</i> tratada com (150 mg L ⁻¹) de As, mostrando filamentos mais isolados e curtos (setas).....	36
14D. Fotomicrografia (ML) mostrando filamentos de <i>Geitlerinema unigranulatum</i> . Células cultivadas no tratamento (250 mg L ⁻¹) de As. Aspecto geral dos filamentos desorganizados (setas) e células sem protoplasto (ponta de seta).....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = análise de variância
As = arsênio
As (III) = arsenito
As (V) = arsenato
BSA = soro de albumina bovina
CaT = carotenóides
CaCl₂ . 2 H₂O = cloreto de cálcio bi-hidratado
Chl *a* = clorofila *a*
CH₃OH = metanol
CoCl₂ . 6 H₂O = cloreto de cobalto hexa-hidratado
CuSO₄ . 5 H₂O = sulfato de cobre penta-hidratado
CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMA = ácido dimetilarsínico
DO = densidade ótica
DTNB = ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA = ácido etileno diamino tetracético
EROs = espécies reativas de oxigênio
FeS₂ = pirita
FeAsS = arsenopirita
H₃BO₃ = ácido bórico
HO = radical hidroxil

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
ICP = espectrometria de emissão de plasma
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ = dipotássio hidrogênio fosfato tri-hidratado
MF = matéria fresca
Mg = magnésio
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ = sulfato de magnésio hepta-hidratado
MMA = ácido monometilarsônico
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ = cloreto de manganês tetra-hidratado
 MoO_3 = trióxido de molibdênio
 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ = molibdato de sódio bi-hidratado
 NaNO_3 = nitrato de sódio
 N_2 = nitrogênio
Na = sódio
 Na_2CO_3 = carbonato de sódio
 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ = arseniato de sódio hepta-hidratado
 O_2^- = radical superóxido
OD = densidade ótica
pH = potencial hidrogeniônico
PVPP = polivinilpirrolidona
SH = grupo sulfidril
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ = sulfato de zinco hepta-hidratado

RESUMO

SOUZA, Eliane Aparecida de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Potencial de cianobactérias para a biorremediação de águas e solos contaminados por arsênio.** Orientadora: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-Orientadores: Juraci Alves de Oliveira e Marcelo Ehlerr Loureiro.

A contaminação de ambientes por arsênio (As) é uma ameaça cada vez mais presente nos ecossistemas aquáticos, especialmente aqueles próximos às áreas de mineração. Utilizando a capacidade de alguns microrganismos para tolerar e, ou, absorver contaminantes, muitos pesquisadores têm-se preocupado com esse problema. Estudos de técnicas de biorremediação utilizando microrganismos, entre estes as cianobactérias, consistem em remover íons tóxicos do ambiente com o auxílio de organismos vivos. Este estudo teve como finalidade investigar o efeito do As em culturas de unicelulares cianobactérias: *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, por meio da avaliação do crescimento, absorção e efeitos tóxicos. O padrão de crescimento foi monitorado por meio da avaliação da produção de biomassa, utilizando-se a densidade ótica ($DO_{750\text{ nm}}$) e a contagem do número de células mL^{-1} , associado às determinações da concentração de proteína e tióis totais não protéicos e dos teores de Clorofila *a* (Chl *a*). Foram feitas também as análises das alterações morfológicas das células. As concentrações de As utilizadas foram de 0,0; 5,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; e 250,0 mg L^{-1} , na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sendo as análises realizadas após 10 dias de exposição. Os

dados foram submetidos à análise de variância fatorial (ANOVA $p < 0,05$) e, quando necessário, ao Teste de Comparação de Médias de Tukey ($p < 0,05$). As cianobactérias apresentaram comportamento diferenciado quanto à tolerância ao As, cuja absorção foi proporcional ao aumento da concentração do metalóide no meio de cultura. *N. piscinale* atingiu o pico máximo de absorção no tratamento de 150 mg L^{-1} , alcançando uma concentração de As equivalente a $20,58 \text{ g}^{-1} \text{ kg}$ na biomassa seca. Em *G. unigranulatum*, o maior acúmulo de As ocorreu na dose de 200 mg L^{-1} , atingindo a concentração de $6,83 \text{ g}^{-1} \text{ kg}$ na biomassa seca. O teor de proteínas em *N. piscinale* teve seu platô máximo de $781,19 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ na concentração de As de 50 mg L^{-1} , correspondendo a aproximadamente 12% mais que o controle. Na dose de 100 mg L^{-1} , *G. unigranulatum* produziu $30.737,28 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína, o equivalente a 42% a mais em relação ao controle. Em tióis totais não-protéicos, a maior concentração produzida em *N. piscinale* foi de $0,0587 \text{ nmol g}^{-1}$ e, em *G. unigranulatum*, foi de $0,0533 \text{ nmol g}^{-1}$, na dose correspondente a 150 mg L^{-1} de As. Os teores mais elevados de Chl *a* foram observados no controle, tanto em *N. piscinale* ($2,66 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl *a*) quanto em *G. unigranulatum* ($4,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de Chl *a*). Nos demais tratamentos ocorreu redução na produção de Chl *a*. As alterações morfológicas e visuais da toxicidade do As foram bem evidentes em *N. piscinale*, enquanto em *G. unigranulatum* não foram identificadas alterações tão significativas entre tratamento e controle. Os resultados indicaram que *N. piscinale* e *G. unigranulatum* podem ser potenciais alternativas em futuros estudos de biorremediação de ambientes impactados por As.

ABSTRACT

SOUZA, Eliane Aparecida de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2007. **Potential of cyanobacteria for bioremediation of arsenic-contaminated water and soil.** Adviser: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-Advisers: Juraci Alves de Oliveira and Marcelo Ehler Loureiro.

Environmental contamination by arsenic (As) is an increasingly present threat to aquatic ecosystems, in particular to those, which are close to mining areas. A number of researchers have been using the capacity of some microorganisms to tolerate and/or absorb contaminant ions from the polluted environments. Bioremediation techniques using microorganisms, such as cyanobacteria, consist on removing toxic ions from the environment using living organisms. The aim of this study was to evaluate the effect of As on the growth, absorption and toxic effects of *Nostoc piscinale* and *Geitlerinema unigranulatum* unicyanobacterial cultures. The growth was monitored by biomass content, using optical density (OD_{750nm}) and cell number count (mL⁻¹) associated with protein, total non protein thiols and chlorophyll *a* (Chl *a*). Morphological alterations on vegetative cells were also analyzed. Arsenic concentrations in the experiments were equivalent to: 0; 5; 50; 100; 150; 200; and 250 mg L⁻¹, in the form of sodium arsenate (Na₂HAsO₄ · 7H₂O). The analyses were carried out during 10 days. Data were examined by factorial analysis of variance (ANOVA *p* <0.05) and, when necessary, by Tukey's multiple comparison test (*p* <0.05). Both cyanobacteria *N. piscinale* and *G. unigranulatum* showed different

behavior regard to As tolerance. The absorption was proportional to the increase of As concentration in the culture medium. *Nostoc piscinale* reached the maximum absorption peak at 150 mg L⁻¹ As (As accumulation equal to 20.58 kg g⁻¹ in the dry biomass). For *G. unigranulatum*, the largest As accumulation was 200 mg L⁻¹ kg g⁻¹, reaching 6.83 kg g⁻¹ in the dry biomass. Maximum protein content determined in *N. piscinale* was 781.19 µg mL⁻¹ when As concentration was 50 mg L⁻¹ of As, approximately 12% higher than the control treatment. At 100 mg L⁻¹ of As, *G. unigranulatum* produced 30,737.28µg mL⁻¹ of protein, 42% higher than the control. The highest concentration of total non-protein thiols produced by *N. piscinale* was 0.0587 nmol g⁻¹ and in *G. unigranulatum* was 0.0533 nmol g⁻¹, both concentration was obtained at 150 mg L⁻¹ of As. The highest Chl *a* contents was found in the control treatment, both for *N. piscinale* and equivalent to 2.66 µg ml⁻¹ of Chl *a*. For *G. unigranulatum* the value was 4.25 µg ml⁻¹ of Chl *a*. There was a reduction in Chl *a* content between treatments. Morphological and visual alterations were registered. It shows that As toxicity caused evident morphological alterations in vegetative cells of *N. piscinale*, whereas in *G. unigranulatum* no such significant changes were noticed between treatments and control. The results indicated that *N. piscinale* and *G. unigranulatum* could be indicated and used as potential alternatives for bioremediation of As impacted environments, in future laboratory experiments.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros problemas que afetam os ecossistemas naturais, o processo de contaminação por arsênio (As) tem merecido atenção especial, devido aos efeitos de curto e longo prazos que esse metalóide pode causar à saúde humana e à qualidade dos ecossistemas.

O As é um metalóide amplamente distribuído na crosta terrestre e está presente em mais de 200 minerais, podendo ser encontrado, principalmente, na forma natural de sulfeto em grande variedade de minerais, os quais contêm cobre, chumbo, níquel, cobalto e ferro (MANDAL; SUZUKI, 2002).

A forma mais comum é o mineral chamado de arsenopirita, o qual é formado com o ferro (FeAsS) (SAKUMA et al., 2003). O As pode ser incorporado aos sistemas aquáticos e terrestres por meio de inúmeros processos geoquímicos, como o intemperismo das rochas e solos e a deposição atmosférica (ANJOS, 2006), ou por intermédio de atividades antrópicas.

Uma das principais fontes de contaminação por As está relacionada às atividades de exploração de minérios sulfetados, que produzem resíduos sólidos, ricos em As. A dissolução de minerais de As, como a pirita (FeS₂) e a arsenopirita (FeSAs), nesses resíduos é uma fonte permanente de contaminação. Outra provável fonte dessas está relacionada aos precipitados de arsenatos metálicos utilizados como forma de disposição do As solubilizado em processos hidrometalúrgicos, além da lixiviação natural (LADEIRA et al., 2002).

O efeito tóxico do As depende, principalmente, da forma química do elemento, e em águas naturais tal efeito pode ocorrer na forma de arsenito As (III), arsenato As (V), íon monometilarsênico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA). Em águas subterrâneas, o As pode ocorrer como As (III) e As (V). No mar, lagoas, lagos e onde houver a possibilidade de biometilação, o arsenito e o arsenato ocorrem juntos com os ácidos MMA e DMA (ANDERSON et al., 1986).

A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de As é a seguinte: arsina > arsenito > arsenato > ácidos alquil-arsênicos > compostos de arsênio > arsênio elementar (MELO, 2006). As formas inorgânicas são 100 vezes mais tóxicas do que as formas metiladas (MMA e DMA) (CERVANTES et al., 1994), e entre as formas inorgânicas o As (III) é 60 vezes mais tóxico do que o As (V).

O problema de contaminação com As tem merecido atenção especial em anos mais recentes, uma vez que são geradas, no mundo todo, milhões de toneladas de resíduos contendo altas concentrações de metais, dentre eles o As. Após algum tempo, nesses locais contaminados se verificou que milhares de pessoas apresentaram problemas sérios de saúde pela contaminação (BASU et al., 2001).

São vários os casos de intoxicação e morte de pessoas contaminadas por As em diversos países do mundo. Verdadeiras catástrofes tornaram-se conhecidas mundialmente como as de Bangladesh, Mongólia e Bengala Ocidental devido à exposição prolongada ao As, em que a população foi submetida ao consumo de água contaminada (GONZAGA et al., 2006).

No Brasil, especificamente no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, no delta do rio Amazonas, Santana/Amapá, e também no Vale do Ribeira, em São Paulo, há indícios de contaminação elevada de As na água, no solo e no sedimento. Tal ocorrência tem afetado a produtividade, biodiversidade e sustentabilidade dos ecossistemas, induzindo-lhes danos muitas vezes irreversíveis ao seu equilíbrio (MELO, 2006).

A Organização Mundial da Saúde sugeriu a diminuição do limite máximo de As em águas potáveis de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para $10 \mu\text{g L}^{-1}$, devido ao aumento de riscos carcinogênicos relacionados ao consumo de águas contendo esse metalóide. No Brasil, esse valor está em vigor desde dezembro de 2002. A Resolução Nº 357 do CONAMA, de 17/03/2005, estabelece o valor máximo permissível de As para o padrão de lançamento igual a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para água potável. Desta forma, a avaliação dos problemas ambientais e a detecção precoce dos efeitos

deletérios nos ecossistemas causados pelo As têm sido considerados prioridades, devido aos efeitos de curto e longo prazos que esse metalóide pode causar ao ambiente e, conseqüentemente, à saúde humana.

São várias as tecnologias tradicionais destinadas ao tratamento e remoção de As, como a resina de troca iônica, o tratamento eletroquímico e a precipitação, muitas vezes inadequados, principalmente quando o metalóide está em baixa concentração. Além disso, esses métodos apresentam custos elevados.

O tratamento biológico tem despertado grande interesse, por se tratar de um processo natural, que promove um tratamento adequado no meio, com custo relativamente baixo, em comparação com outras alternativas convencionais de tratamentos de resíduos sólidos (MARTINS et al., 2003).

Assim como algumas espécies de plantas terrestres e aquáticas vêm sendo recomendadas para estudos de fitorremediação, em face do potencial de tolerância e acúmulo em poluentes como o As, os microrganismos, incluindo as bactérias, as microalgas, os fungos filamentosos e as leveduras, têm-se demonstrado eficientes biorremediadores, sendo capazes de remover o poluente via mecanismos ativos ou passivos (DONMEZ; AKSU, 1999).

Estudos com cianobactérias também demonstram que esses organismos são eficientes na remoção de poluentes, incluindo o As (SOEDER et al., 1978; NAKAJIMA et al., 1982; WILKINSON et al., 1990; CHAISUKSANT, 2003; AKHTAR et al., 2004). Por serem cosmopolitas, as cianobactérias constituem excelentes modelos para estudos de biorremediação, uma vez que são constantemente encontrados em ambientes contaminados por As.

As cianobactérias são organismos pioneiros na Terra, sendo encontrados fósseis que datam de 3,5 bilhões de anos. Diferem das demais bactérias por realizarem fotossíntese com a liberação de oxigênio (DAGNINO et al., 2004).

Habitam os mais variados tipos de ambientes; a exemplo dos ecossistemas bem iluminados (exceto aqueles com pH muito baixo), em que algumas espécies são capazes de sobreviver em condições extremas, como areias e rochas de desertos, águas termais (“hot springs”) e lagos do Ártico e da Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). A capacidade de se desenvolver na presença de metais pesados é uma das características marcantes desses microrganismos.

Alguns grupos de cianobactérias possuem, além das células vegetativas, heterócitos e acinetos, células que são estrutural e fisiologicamente especializadas. Nas células vegetativas, ocorrem o processo fotossintético e as divisões celulares que promovem o crescimento. Nos heterócitos acontece a fixação biológica de N_2 , sendo o acineto um esporo de resistência (NASCIMENTO; AZEVEDO, 1999).

A capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico é outra característica marcante em certos grupos de cianófitas, tornando-se independentes de outras fontes nitrogenadas. Já as formas não heterocitadas também fixam N em células vegetativas, devido a uma separação espacial e temporal dos dois processos: fotossíntese e fixação de N (LEE, 1999).

As cianobactérias propiciam uma extraordinária e ampla faixa de contribuição para a vida humana, apresentando, inclusive, importância econômica. Além da produção primária de matéria orgânica e da fixação biológica de nitrogênio, são usadas na produção de alimentos com valores nutricionais promissores para o futuro (SKULBERG, 1995), sendo mais recentemente empregadas como uma alternativa no estudo de biorremediação de ambientes contaminados.

Os efeitos causados pelo As nas cianobactérias dependem da espécie, da fase de crescimento das células e das condições fisiológicas, bem como da forma química do As e de sua concentração no meio (PLANAS; HEALEY, 1978; CERVANTES et al., 1994; KAISE et al., 1999).

Metalóides como o As podem causar efeitos diversos nos organismos, e uma das principais causas da toxidez desse poluente é a sua combinação com os grupos tiólicos (-SH) das enzimas e proteínas, provocando desarranjos no metabolismo vegetal (LAGRIFFLOUL et al., 1998). Grupos de proteínas ainda podem ser expressos ou reprimidos sob condição de estresse (NADDAF, 2004).

Embora haja poucos relatos sobre o efeito direto do As nos sistemas de pigmentos, sabe-se que o teor de clorofila pode ser alterado em condição de estresse e acarretar alterações no crescimento das plantas ou de microrganismos fotossintetizantes, como as cianobactérias (MATHIS; KLEO, 1973).

A elevada toxicidade de metalóides como As está associada, ao menos em parte, aos efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, à capacidade de contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxil (HO), o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BHATTACHARJEE, 1998).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, prejudicando a integridade celular. As EROs são formadas e degradadas por organismos aeróbios, quando requeridas para a função celular normal; todavia, em quantidades excessivas, levam ao aumento do estresse oxidativo (BHATTACHARJEE, 1998).

As respostas antioxidantes e, ou, de dano oxidativo são frequentemente utilizadas como biomarcadores, já que diferentes tipos de poluentes podem induzir situações de estresse oxidativo, como consequência da produção de moléculas deletérias, os radicais livres, que estão além da capacidade protetora das defesas antioxidantes (OLIVEIRA, 2005).

Como consequência, as EROs podem causar danos nos componentes celulares oxidando lipídios (BHATTACHARJEE, 1998), proteínas e ácidos nucléicos (ANGELOVA et al., 2000). Para combater as EROs, as cianobactérias necessitam ativar mecanismos de defesa, imediatamente após a exposição ao metal, e, posteriormente, manter atividades metabólicas secundárias que evitam danos às células e, conseqüentemente, ao seu crescimento.

Dentre os mecanismos de tolerância a metais tóxicos, estudados em cianobactérias, destacam-se a precipitação extracelular do metal; as ligações dos íons à mucilagem, que pode envolver as células; a presença de uma membrana com permeabilidade seletiva para certos íons; a exclusão dos íons por meio de sistemas ativos de transporte; a captura intracelular dos íons por proteínas; e o armazenamento em inclusões celulares, como os grânulos de polifosfato (NADDAF, 2004). Nesse último, o íon, uma vez no interior da célula, é retido nas inclusões celulares, diminuindo sua interação com outros componentes e impedindo sua ação nociva.

Também são estudados mecanismos moleculares como indução de proteínas por choque térmico, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e, no caso de algumas espécies, a expressão das proteínas seqüestradoras de metais, as chamadas metalotioneínas (NADDAF, 2004).

A tolerância ao As também tem sido relacionada com a capacidade dos organismos em sintetizar peptídeos de baixo peso molecular, ricos em enxofre, que participam da complexação desses íons (SCHMOGER et al., 2000).

Normalmente, o As é estocado como complexo As (III)-tris-tiol, e os doadores de tióis para o complexo são provalmente a glutatona ou as fitoquelatinas.

Estas são enzimaticamente induzidas pela presença de cátions metálicos (SRISVASTAVA et al., 2004) e ânions como arsenito e arsenato (RAUSER, 1999).

Embora sejam escassos os relatos sobre as alterações morfológicas causadas pelo As nas células das cianobactérias e outras microalgas, já foram descritas alterações na deposição de mucilagem sobre as tecas de *Tetraselmis chui*, cultivadas em meio MSW; também, a perda de flagelo e, conseqüentemente, da motilidade em células de *Hymenomonas carterae* cultivadas em meio MSW, na presença de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de As. A perda de flagelo em *T. chui* cultivado em meio ASW contendo $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de As e movimentos erráticos em *T. chui* e *H. carterae* foram relatados quando os organismos foram expostos a 1 mg mL^{-1} de As no meio (BOTTINO et al., 1978).

Rachlin (1984) observou que em *Anabaena flos-aquae* exposta ao Cd houve redução na área dos tilacóides, ocorrendo mudança na estrutura e número de algumas inclusões celulares, como grânulos de polifosfato, inclusões lipídicas, grânulos de cianoficina e mudanças no volume das camadas do envoltório celular. E, ainda segundo Gomes (2005), as estruturas mais afetadas pelo As em cianobactérias são os tilacóides e a parede celular, quando submetidos a estresses causados por poluentes.

1.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Isolar e identificar espécies de cianobactérias de solos e águas contaminados por As.
- Selecionar as espécies com graus diferenciados de tolerância para serem utilizadas em futuros experimentos de biorremediação.

2. METODOLOGIA

2.1. Local de coleta e amostragem

As coletas foram realizadas em corpos d'água e solos contaminados com arsênio (As), numa região de mineração de ouro, no Município de Paracatu, noroeste de Minas Gerais, localizado a 850 m de altitude, nas coordenadas 17° 13' 10"S - 46° 52' 17"W.

Para a amostragem de água foram utilizados frascos de vidro de boca larga e, para a amostragem de solo, espátula e sacolas plásticas. As amostras foram identificadas e transportadas, em isopor com gelo, para o Laboratório de Ficologia, do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

2.2. Enriquecimento e cultivo das amostras

No laboratório foi feito o enriquecimento das amostras, a fim de estimular a germinação de formas de resistência acineto e hormogônios, além de células vegetativas.

Utilizou-se o meio de cultura BG-11 líquido (Tabela 1), suplementado ou não, com fontes de nitrogênio (N) (ALLEN; STANIER, 1968), viabilizando a seleção de espécies não heterocitadas e heterocitadas, respectivamente.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo BG-11 com ou sem fontes de nitrogênio (N)

Componentes	g L ⁻¹	Solução-Estoque para 1 L
1 – Na ₂ Mg EDTA	0,1	
Citrato férrico de amônio	0,6	10 mL
Ácido cítrico . H ₂ O	0,6	
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	3,6	
2 - MgSO ₄ . 7 H ₂ O	7,5	10 mL
3 – K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	4,0	10 mL
4 – Na ₂ CO ₃	-	0,02 g
5 – Solução de micronutrientes		1 mL
H ₃ BO ₃	2,86	
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,81	
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,222	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,079	
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,050	
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O ou MoO ₃ (85%)	0,018	
6 – NaNO ₃ (somente para BG-11 suplementado com N)	-	1,5 g

Fonte: Adaptado de ALLEN; STANIER, 1968.

Posteriormente, o volume foi completado com água destilada para 1 L, e o pH foi ajustado para 7,5. O meio de cultura foi autoclavado à temperatura de 120 °C. O enriquecimento foi feito na proporção de 10:1 (10 mL de BG-11 líquido para 1 mL de amostra) (AGUIAR, 1992).

As amostras foram levadas para a sala de cultivo de algas e mantidas em placas de Petri contendo meio BG-11 solidificado com 1,5% de ágar (Merck). As condições de cultivo foram fotoautotróficas de crescimento, ou seja, as culturas foram mantidas à temperatura de 22 ± 1 °C, fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro e 85 μmols de fótons m⁻² s⁻¹, proveniente de lâmpadas frias, fluorescentes.

As espécies foram repicadas em câmaras estéreis, quantas vezes necessário, para a obtenção de culturas monoespecíficas. Culturas líquidas foram mantidas sob agitação a 110 rpm.

2.3. Isolamento e identificação

Para o isolamento foram utilizados os métodos de micropipetagem, diluição em série e plaqueamento em meio sólido (1,5% ágar -Merck), conforme descrito por Aguiar (1992).

As características morfológicas foram observadas por meio de microscopia fotônica, utilizando-se um microscópio de luz (modelo AX 70-Olympus, Japão). À medida que os microrganismos apresentavam crescimento diferenciado, eles foram transferidos para novas placas contendo meio BG-11 líquido. Foram utilizados pipeta Pauster e microscópio estereoscópico para as transferências das células para um novo meio. Também foi utilizado o antibiótico ciclo-hexamida na concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, para eliminar contaminantes eucarióticos do meio (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000).

Para a identificação taxonômica dos gêneros, foi utilizada a literatura especializada, sendo a identificação em nível de espécie realizada no Instituto de Botânica de São Paulo.

As culturas monoespecíficas foram mantidas em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio BG-11, em sala de cultura, sob condições fotoautotróficas anteriormente citadas, em que foram monitoradas, periodicamente, para prevenir contaminações.

2.4. Seleção de espécies

A seleção das cianobactérias para serem utilizadas nos experimentos posteriores se deu mediante a avaliação visual (pré-testes), baseada na produção de biomassa, ou seja, no crescimento das cianobactérias previamente isoladas: *Nostoc piscinale*, *Nostoc planctonicum*, *Nostoc* sp, *Calothrix marchica* e *Geitlerinema unigranulatum*, em meio de cultura com diferentes concentrações de arsênio (As) variando de 0 a 500 mg L^{-1} . Para a escolha das concentrações utilizadas, foram

levados em consideração a quantidade de As disponível na água e o solo onde foram realizadas as amostragens ($0,200 \text{ mg L}^{-1}$ de As).

O crescimento das respectivas cianobactérias também foi avaliado utilizando-se como parâmetro a densidade ótica (OD), com o uso de espectrofotômetro (Modelo UV mini-1240, Shimadzu, Japão), em comprimento de onda igual a 750 nm, conforme Lee et al. (1991) e Thompson et al. (2002).

Culturas-estoque com 10 dias de idade foram homogenizadas em um homogeneizador mecânico (Potter S, B. Braun Biotech International, Alemanha). Em seguida, as culturas foram concentradas, por centrifugação (12.000 xg), durante 20 min, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de meio BG-11 líquido com ou sem N.

Alíquotas de 500 μL de suspensão de células, de cada espécie, foram inoculadas em 36 frascos Erlenmeyers de 25 mL contendo 15 mL de meio líquido BG-11, suplementado ou não com fontes de nitrogênio (N), conforme a característica da cianobactéria, não-heterocitada e heterocitada, respectivamente. As culturas foram mantidas sob constante agitação (110 rpm), em mesa agitadora orbital (Modelo TE-145 Tecnal, Piracicaba, São Paulo), em condições fotoautotróficas, durante um período de 22 dias.

A cada 48 h, alíquotas de 2 mL foram retiradas das culturas (três repetições) homogeneizadas, com a ajuda de um agitador mecânico, para desfazer os grumos de células, e lidas a $OD_{750 \text{ nm}}$. Também foi feita a contagem de células (Cél mL^{-1}), em alíquotas de 2 mL fixadas previamente em formol (4%), utilizando-se uma câmara do tipo Fuchs-Rosenthal (Bright line, Boeco, Alemanha), sob microscópio óptico (Axiostar Plus, Zeiss, Alemanha).

A $OD_{750 \text{ nm}}$ (turbidez) foi avaliada com o objetivo de comparar os dois parâmetros ($\text{N}^\circ \text{Cél mL}^{-1}$ e $OD_{750\text{nm}}$) nos experimentos posteriores; todavia, posteriormente optou-se por não adotar esse parâmetro. Para as contagens de células também foi utilizada a microscopia de contraste de fase, otimizando significativamente a identificação e a visualização das células.

As amostras (suspensão de células fixadas em formol 4%) foram diluídas quando necessário, de modo que o número de células não fosse inferior a 60 nem superior a 130 células. Foi feita ainda a diluição das amostras que ultrapassaram a leitura da $OD_{750 \text{ nm}}$ ($0,8 \text{ nm}$).

Calculou-se o tempo de geração (g), utilizando a seguinte equação (NADDAF, 2004):

$$g = \frac{t \log 2}{\text{Log}b - \text{Log}B}$$

em que:

g = tempo de geração;

B = número de células em algum ponto do início da fase logarítmica;

b = número de células em algum ponto do fim da fase logarítmica; e

t = intervalo de tempo, em horas, entre B e b .

Foram identificadas as fases de crescimento (logarítmica e estacionária) de cada isolado. O tempo de geração auxiliou a seleção das espécies com crescimento mais rápido, as quais foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

Foram selecionadas as espécies de *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*.

Utilizaram-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de (5x12), representado pelas espécies, e o tempo em horas (h), em três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando necessário, foram feitas análises de regressão, utilizando-se o Programa Estatístico SAEG.

2.5. Curva de crescimento das espécies em presença de arsênio

O crescimento das cianobactérias na presença do arsênio (As) também foi avaliado comparando-o com a leitura da $OD_{750\text{ nm}}$ e a contagem de células (Cél mL^{-1}). O experimento foi conduzido em intervalos de 48 h, por um período de 10 dias de experimento, conforme descrito no item 3.4.

As espécies selecionadas foram submetidas a diferentes doses de As. Inóculos de 1.000 μL de cianobactérias foram retirados de culturas-estoque (10 dias de idade) e transferidos para Erlenmeyers de 50 mL, contendo 25 mL de meio BG-11 suplementado com N para *Geitlerinema unigranulatum* ou não para *Nostoc piscinale*, e a solução de As, nas concentrações de 0, 100, 150 e 250 mg L^{-1} , na forma de

arseniato de sódio (Na_2AsHO_4) · 7 H_2O (Sigma). As culturas foram deixadas sob condições fotoautotróficas de crescimento e constante agitação (110 rpm).

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, à análise de regressão. Nas análises, foi utilizado o Programa Estatístico SAEG, cujos dados foram representados por superfícies de resposta. As variáveis independentes foram tempo e concentração de As.

2.6. Acúmulo de arsênio

Inóculos de 1.000 μL foram retirados de culturas-estoque das cianobactérias e transferidos para 21 Erlenmeyers de 50 mL, contendo 25 mL de meio BG-11 líquido, suplementado para *Geitlerinema unigranulatum* ou não para *Nostoc piscinale*, nas concentrações de arsênio (As) de 0, 5, 50, 100, 150 e 250 mg L^{-1} .

Os frascos inoculados foram acondicionados em sala de crescimento, sob condições fotoautotróficas, e constante agitação (110 rpm), por um período de 10 dias. Após esse período, o As acumulado foi analisado, nas células dos organismos.

As amostras foram concentradas por centrifugação (12.000 xg, durante 20 min, à temperatura ambiente) e lavadas duas vezes com meio BG-11, para remoção de contaminação externa pelos íons de As adsorvidos no envoltório celular das cianobactérias. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 xg, durante 10 min, a 4 °C.

Após a lavagem, o material decantado foi transferido para frascos previamente tarados e identificados. Posteriormente, o material foi seco em estufa à 45 °C até a obtenção de peso constante. A concentração de As contido nas cianobactérias foi calculada, utilizando-se o valor da massa seca.

Para a digestão, 10 mL de solução nitroperclórica 3:1 foi adicionada às amostras secas, devidamente pesadas. O material permaneceu nessa solução durante 12 h e, em seguida, foi colocado em bloco digestor a 50 °C, aumentando-se gradativamente a temperatura em intervalos de 20 min até atingir 150 °C.

Quando o extrato se tornou incolor, a temperatura foi reduzida e o volume, completado para 25 mL com água desmineralizada. A solução, contendo apenas a fração mineral, foi utilizada na determinação da concentração interna de As, utilizando-se espectrometria de Emissão em Plasma (ICP), modelo 3300 DV Optima no comprimento de onda de 193,69 nm, do Departamento de Solos da UFV.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de (2x7), representado pelas espécies selecionadas e as concentrações de As, em três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises foi utilizado o Programa Estatístico SAEG.

2.7. Determinação da concentração de proteína, tíóis não protéicos e conteúdo de clorofila *a*

A avaliação dos teores de proteínas totais, tíóis totais não protéicos e o conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*) foi feita para *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, após 10 dias de experimento.

Foram utilizadas culturas-estoque com idade de 10 dias, em fase exponencial, cultivadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio BG-11, sob condições fotoautotróficas de crescimento.

Os frascos foram mantidos sob agitação constante (110 rpm). As culturas foram homogenizadas a 1.000 rpm, em homogenizador mecânico, a fim de promover a ruptura dos filamentos. Posteriormente, as células foram concentradas por meio de centrifugação (12.000 xg, durante 20 min, em temperatura ambiente), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado de cada tubo foi ressuspensionado em 5 mL de meio BG-11 e transferido para um béquer (culturas-estoque).

Alíquotas de 1.000 µL de culturas-estoque foram transferidas para frascos Erlenmeyers estéreis com capacidade para 50 mL, contendo 25 mL de meio BG-11 e as seguintes concentrações de arsênio (As): 0, 5, 50, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹.

Utilizaram-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de (2x7), representado pelas espécies, e as concentrações de As em cinco repetições. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análise de regressão foi realizada quando necessário. Os dados foram analisados usando-se o Programa Estatístico SAEG.

2.7.1. Extração e quantificação de proteínas totais

Para a extração e quantificação de proteínas, as amostras dos frascos foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 12.000 xg, durante 20 min, em

temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e 0,5 g da amostra foi utilizado para extração de proteínas em células de cianobactérias expostas ou não ao As. Foram utilizados 2 mL de meio de extração (tampão-fosfato de potássio 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,2) contendo 0,002 mol L⁻¹ de EDTA e Triton 100 0,01%) e 30% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Posteriormente, as células foram maceradas em almofariz para rompimento mecânico, sendo a seguir transferidas para Eppendorfs, e centrifugadas a 10.000 xg, durante 15 min, à temperatura de 4 °C.

O sobrenadante contendo proteínas foi reservado, sendo descartado o precipitado contendo outros compostos celulares. Três alíquotas de 2 e 20 µL de cada uma das repetições de cada espécie foram retiradas para quantificação da concentração de proteínas. A seguir, os dados foram comparados em uma curva-padrão de BSA (soro de albumina bovina), de acordo com o método de Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (modelo UV mini-1240, Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 412 nm. Todos os procedimentos descritos foram realizados com as amostras sendo manuseadas em gelo, a fim de evitar a degradação de proteínas.

2.7.2. Extração e quantificação da concentração de tióis não protéicos

Após um período de 10 dias de exposição ao As, foi obtido um concentrado de células a partir de centrifugação das amostras a 12.000 xg, durante 20 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 0,5 g de amostra fresca, macerado em almofariz contendo PVPP (p/v) 30%, sendo em seguida adicionados 2 mL de meio de extração (ácido sulfossalicílico 5% e 6,3 mM de EDTA). Posteriormente, a amostra foi transferida para Eppendorf, sendo o homogeneizado centrifugado a 10.000 xg, durante 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para a determinação da concentração de tióis totais não protéicos, segundo De Vos et al. (1992).

Alíquotas de 0,3 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,63 mL de tampão-fosfato de potássio 0,5 M e incubadas a 30 °C, durante 5 min. Posteriormente, foram adicionados 0,05 mL do meio de reação, pH 7,5, contendo DTNB 6 mM [ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)], acrescido de solução de fosfato de potássio 0,143 mM e EDTA 6,3 mM, sendo o pH ajustado para 7,5. As soluções foram incubadas durante 2 min à temperatura de 30 °C. Após esse período,

foi lida a absorvância no comprimento de onda de 412 nm, em espectrofotômetro. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para calcular o teor de tióis não protéicos, sendo os resultados expressos em nmoles de SH g^{-1} MF (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

2.7.3 Determinação do teor de clorofila *a* (Chl *a*)

A quantificação do teor de Chl *a* seguiu a metodologia de Meeks e Castanholz (1971). Após 10 dias de exposição ao As, as culturas contidas em Erlenmeyers foram transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 xg , durante 20 min, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuscitado em 1 mL de meio BG-11. Posteriormente, as células foram rompidas por movimentos contínuos com seringas, bastão de vidro e agitação em vortex.

Os tubos foram envolvidos em papel-alumínio, para evitar danos fotoxidativos. Nos tubos foi acrescentado o metanol (CH_3OH) 100% (Merck) na proporção de 9:1 (9 mL de CH_3OH :1 mL de concentrado de células).

Após 15 min no escuro, à temperatura ambiente, os tubos foram novamente submetidos à vigorosa agitação em vortex, a fim de otimizar a extração dos pigmentos.

Os extratos foram centrifugados a 12.000 xg , durante 10 min, à temperatura ambiente, e o extrato metonólico foi lido em espectrofotômetro (modelo Hitachi U2000), no comprimento de onda de 665,2 nm ($A_{665,2}$), correspondendo a Chl *a*, sendo o metanol puro usado como branco.

O cálculo da concentração de clorofila *a* foi feito com base na fórmula descrita por Meeks e Castenholz (1971):

$$C = A \cdot a$$

em que:

C = concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A = absorvância; e

a = coeficiente de absorvância para a clorofila, extraída com metanol (12,7).

Os dados foram plotados em um gráfico, sendo descrita uma curva de crescimento característica de cada espécie selecionada.

2.8. Caracterização morfológica e registro fotográfico

As observações morfológicas dos taxa selecionados foram feitas após 10 dias de exposição ao arsênio, em diferentes concentrações: 0, 5, 150 e 250 mg L⁻¹.

O material fresco foi observado sob microscopia fotônica, utilizando-se um microscópio de luz (modelo AX 70, Olympus) acoplado a um sistema de captura de imagem (modelo UPhoto, Olympus), pertencente ao Setor de Anatomia Vegetal-DBV/UFV.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e identificação

O uso das técnicas de diluição em série, plaqueamento em meio sólido e micropipetagem permitiu o isolamento rápido e eficiente dos organismos. A identificação dos isolados por meio da observação em microscopia fotônica permitiu a descrição de cinco taxa pertencentes à Classe Cyanophyceae, representadas pelas ordens Nostocales: *Nostoc piscinale*, *Nostoc planctonicum*, *Nostoc* sp e *Calothrix marchica* e Oscillatoriales: *Geitlerinema unigranulatum* (Figura 1A-E).

As espécies pertencentes à ordem Nostocales (Figura 2A-E) possuem filamentos isolados ou não, longos ou curtos, sem ramificação, envoltos por uma bainha mucilaginosa. Alguns formam emaranhados de tricomas ou filamentos, com presença de heterocitos intercalares e, ou, terminais, ápices isopolares ou heteropolares. Também apresentam acinetos e se reproduzem por fragmentação dos tricomas ou germinação dos acinetos. A coloração das células varia de verde-azulada a amarronzada quando jovens e amarelada quando as células estão em culturas velhas. Na natureza, os organismos podem ser encontrados em ambientes subaéreos ou perifíticos, entre macrófitas e algas de água doce ou salgada, solos, sedimentos e pedras, poluídos ou não.

A representante da ordem Oscillatoriales, a espécie *Geitlerinema unigranulatum* (Figuras 2F-G), possui filamentos longos dispostos em feixes e emaranhados. São levemente atenuados nas extremidades, sem qualquer ramificação. Os tricomas são homocitados e isopolares e se reproduzem através da formação de hormogônios.

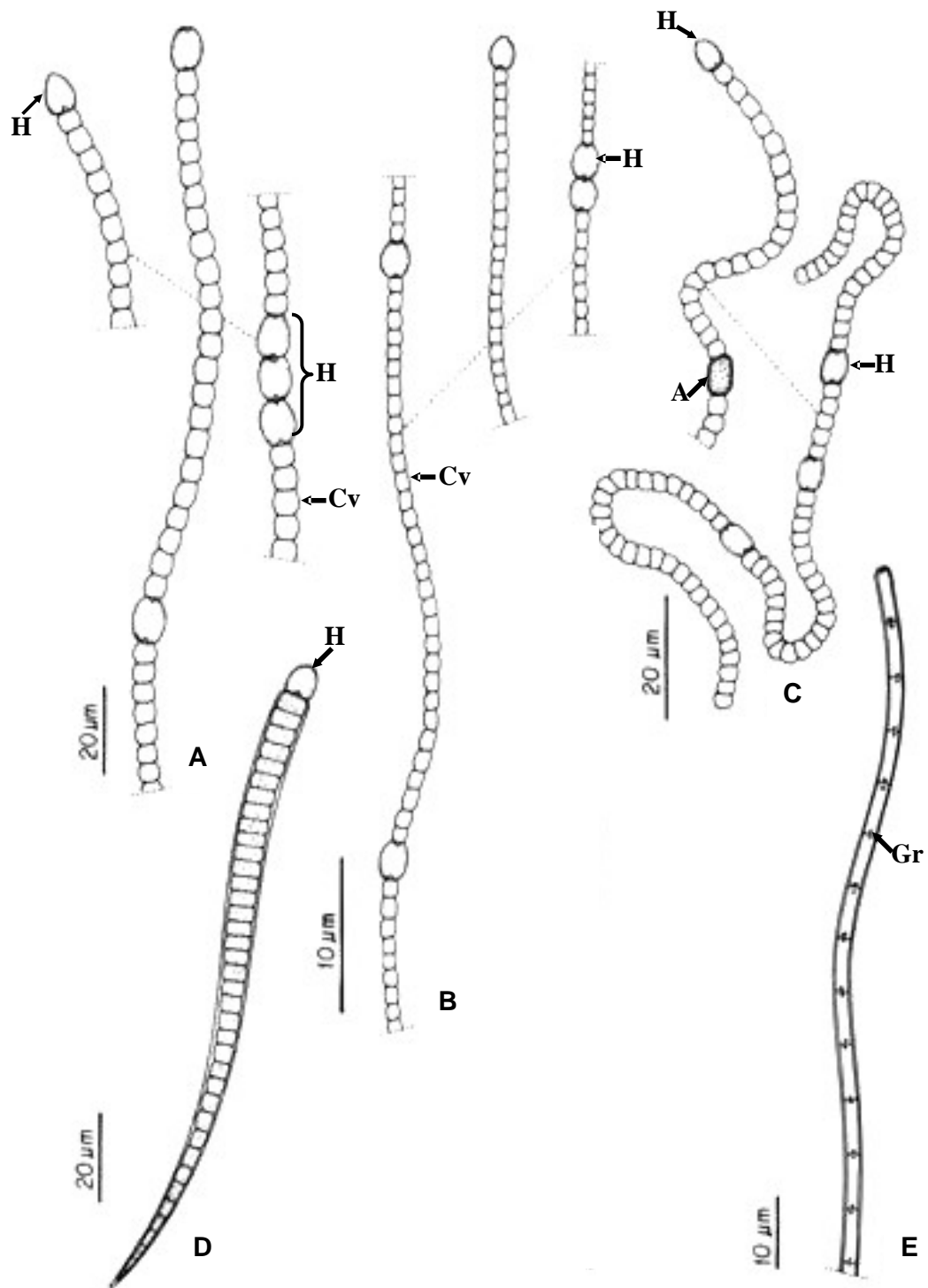


Figura 1 – Ilustração dos taxa isolados de águas e solos contaminados com arsênio: A)-*Nostoc piscinale*; B)-*Nostoc planctonicum*; C)-*Nostoc* sp; D)-*Calothrix marchica*; e E)-*Geitlerinema unigranulatum*. Célula vegetativa (Cv); acineto (A); heterócito terminal e intercalar (H); e grânulos (Gr).



Figura 2A – Fotomicrografia (ML) de *Nostoc piscinale*. Célula vegetativa (Cv); e heterócito terminal e intercalar (H).



Figura 2B – Fotomicrografia (ML) de *Nostoc piscinale* exposta à tinta-nanquim. Observar detalhe do espessamento da bainha mucilaginosa (Bm) e a forma globosa das células vegetativas (Cv).

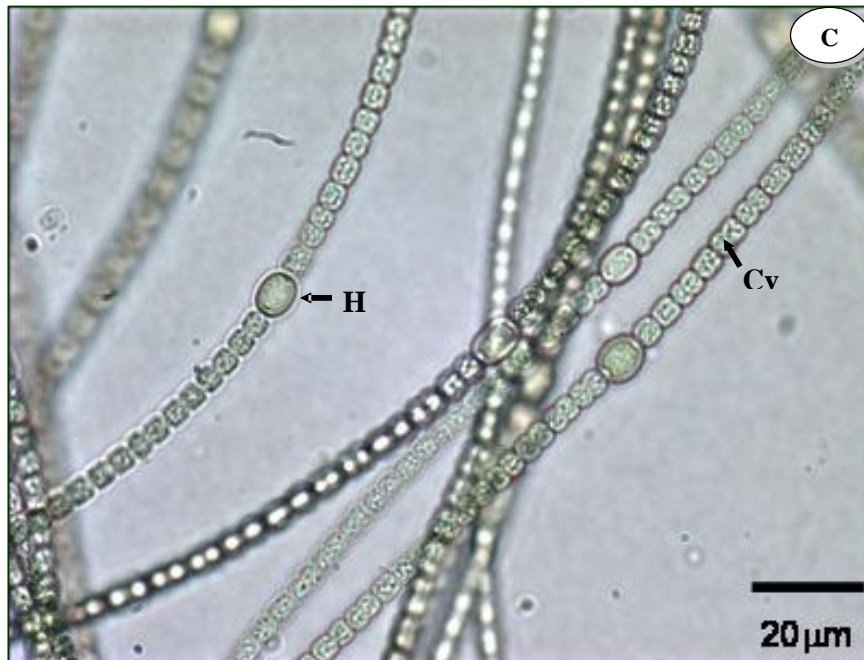


Figura 2C – Fotomicrografia (ML) de filamentos de *Nostoc planctonicum*. Célula vegetativa (Cv) e heterócito intercalar (H).



Figura 2D – Fotomicrografia (ML) de *Nostoc* sp. Detalhes dos filamentos mostrando célula vegetativa (Cv) e heterócito terminal (H).

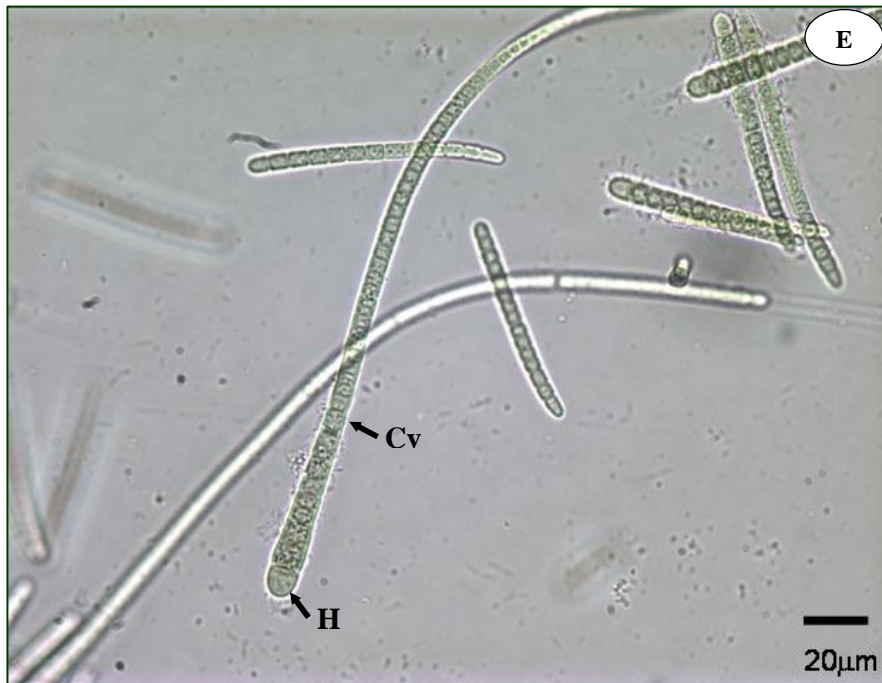


Figura 2E – Fotomicrografia (ML) de *Calothrix marchica*. Detalhes dos filamentos mostrando célula vegetativa (Cv) e heterócito terminal (H).



Figura 2F – Fotomicrografia (ML) dos filamentos de *Geitlerinema unigranulatum*. Note a aparência granulosa das células e grânulos de cianoficina (Gr) (seta).

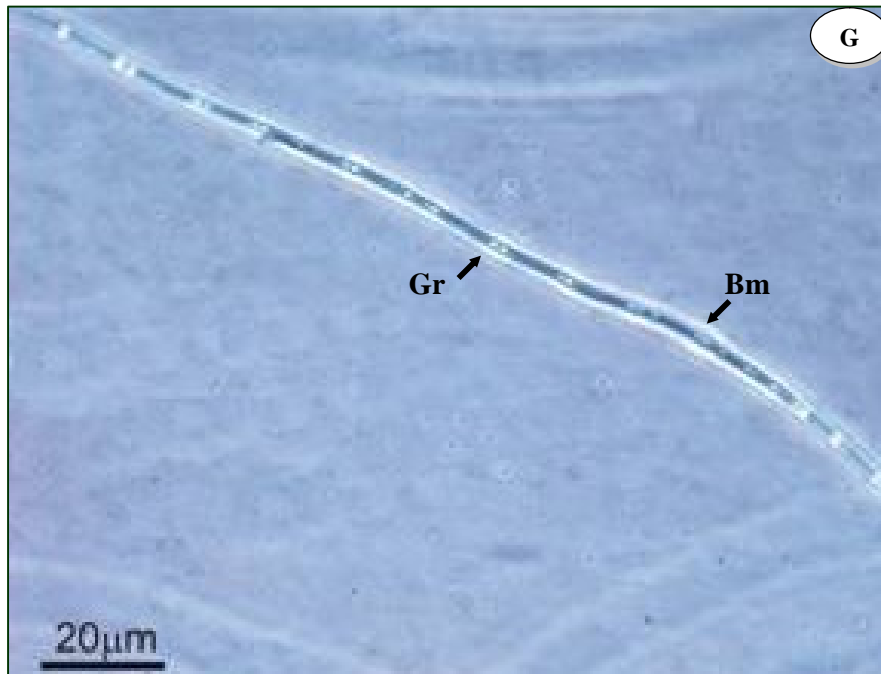


Figura 2G – Fotomicrografia de (ML) *Geitlerinema unigranulatum*. Detalhe dos grânulos de cianoficina (Gr) e da bainha mucilaginosa (Bm).

Quando jovens, essas espécies apresentam coloração verde-oliva, e as culturas velhas tendem a tornar-se alaranjadas. São observados nessas espécies numerosos grânulos de cianoficina (reserva de carboidratos). Os indivíduos podem ser encontrados em ambientes subaéreos ou perifíton entre macrófitas e algas de água doce ou salgada, solos, sedimentos e pedras, poluídos ou não.

3.2. Seleção das espécies e análise do crescimento

As curvas de crescimento obtidas nos três gêneros estudados mostraram a fase Log ou de crescimento exponencial, evidente em todos os gêneros. O tempo de duração dessa fase variou entre 240 e 511 h nos dois parâmetros avaliados (N° Cél mL^{-1} e $OD_{750\text{ nm}}$). A fase estacionária foi observada entre 240 e 528 h, após o início do crescimento, em todas as cianobactérias. Nessa fase foram observadas alterações nas culturas, como: mudança de coloração e alterações na morfologia das culturas (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Valores médios do tempo de geração (TG) das cianobactérias isoladas

Espécie	Tempo de Geração (horas)
<i>Nostoc piscinale</i>	107,4
<i>Nostoc planctonicum</i>	192,6
<i>Nostoc sp.</i>	152,4
<i>Calothrix marchica</i>	165,3
<i>G. unigranulatum</i>	204,1

Tabela 3 – Valores médios do crescimento máximo das cianobactérias isoladas

Espécie	Parâmetro	Crescimento Máximo (h)
<i>Nostoc piscinale</i>	Turbidez	415
	Nº Cél mL ⁻¹	240
<i>Nostoc planctonicum</i>	Turbidez	416
	Nº Cél mL ⁻¹	388
<i>Nostoc sp.</i>	Turbidez	378
	Nº Cél mL ⁻¹	417
<i>Calothrix marchica</i>	Turbidez	511
	Nº Cél mL ⁻¹	391
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Turbidez	415
	Nº Cél mL ⁻¹	475

Os valores médios do tempo de geração e do crescimento máximo de cada espécie foram obtidos por meio de equações de regressão com significância de 0,1% de probabilidade e são apresentados nas Figuras 3 e 4.

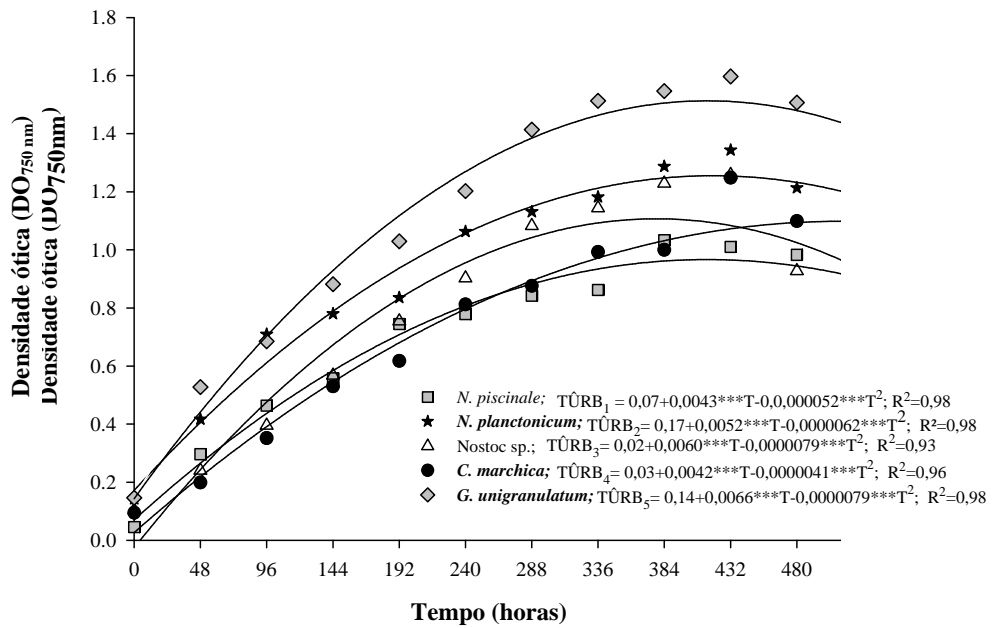


Figura 3 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos cinco organismos isolados em função do tempo, em horas (h). Dados obtidos das leituras de $OD_{750\text{ nm}}$ (turbidez). *** efeito significativo a 0,1% de probabilidade, pelo teste F.

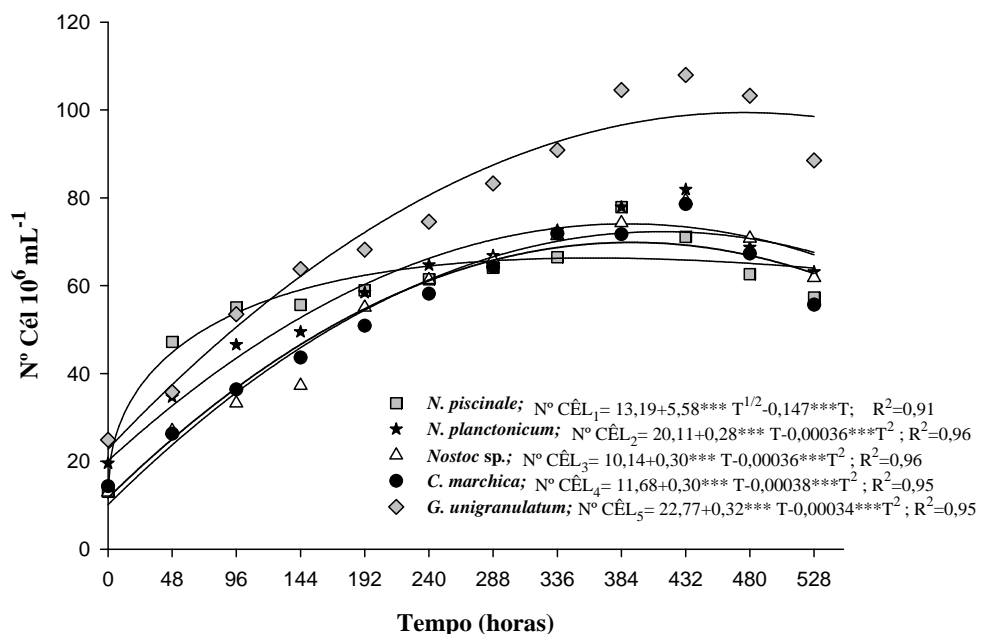


Figura 4 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos cinco organismos isolados em função do tempo, em horas (h). Dados obtidos das contagens do $N^\circ\text{ Cél mL}^{-1}$. *** efeito significativo a 0,1% de probabilidade, pelo teste F.

Foram selecionadas as espécies de *N. piscinale* e *G. unigranulatum*. Entre as espécies isoladas, *N. piscinale* foi aquela que apresentou os menores valores de turbidez e N° de Cel mL⁻¹ (1,03 e 77,87 . 10⁶ mL⁻¹), respectivamente. Entretanto, demonstrou maior tolerância ao As em pré-testes laboratoriais, observação visual do crescimento em diferentes concentrações de As, em relação às demais espécies isoladas, assim como *G. unigranulatum*. Esta última exibiu valores altos para turbidez e N° de Cel mL⁻¹, diferindo significativamente das demais espécies.

A Análise de variância revelou efeito altamente distinto entre os fatores tempo x cianobactérias (p = 0,05), sendo as médias dos tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey.

3.3. Análise de crescimento em presença de arsênio

O efeito do arsênio (As) no crescimento das espécies *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, em função do tempo, são apresentados graficamente nas Figuras 5 e 6. A densidade celular foi diferenciada entre as duas espécies, conforme pode ser observado nos modelos ajustados para N° de Cél mL⁻¹ e OD_{750 nm}, em função das doses de As (Tabela 4).

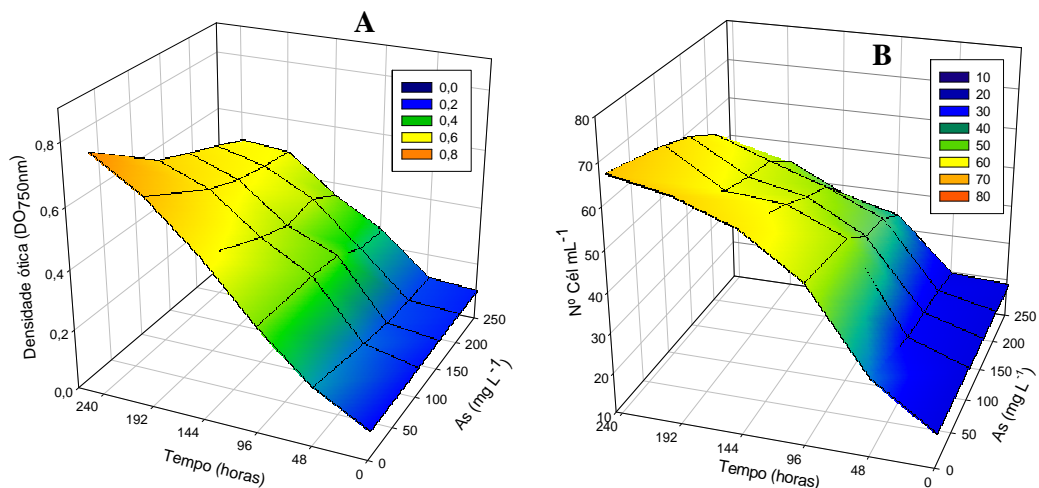


Figura 5 – Representação gráfica da superfície de resposta da espécie *Nostoc piscinale*. OD_{750 nm} (A) e N° de Cél mL⁻¹ (B) em função do tempo e diferentes concentrações de As.

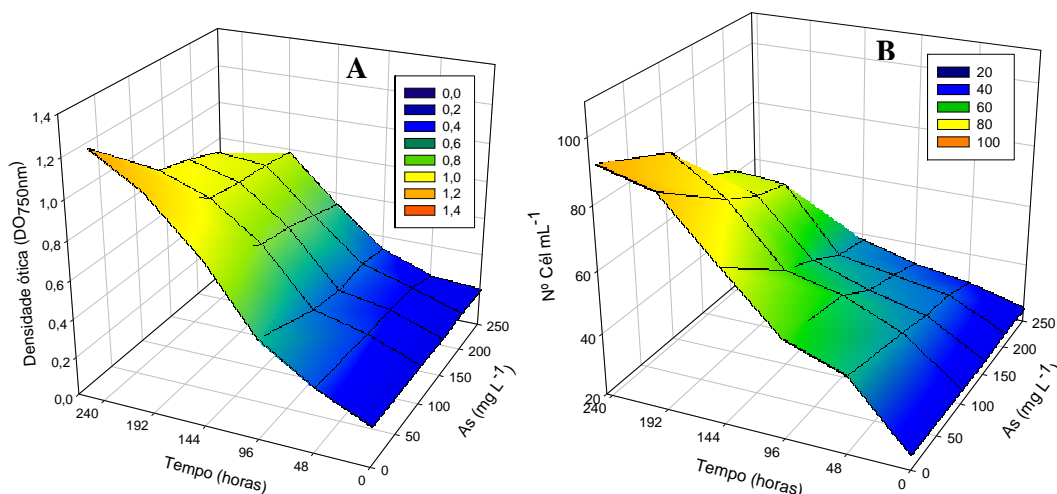


Figura 6 – Representação gráfica da superfície de resposta da espécie *Geitlerinema unigranulatum*. OD_{750 nm} (A) e N^o de Cél L⁻¹ (B) em função do tempo e de diferentes concentrações de As.

Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas das variáveis célula (CÊL) e turbidez (TÛRB), em função da concentração de As em *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, seguida do coeficiente de determinação (R²)

Táxon	Equação Ajustada	R ²
1	$\hat{TÛRB}_1 = 0,15 + 0,0023*** \text{ TEMP} - 0,00055*** \text{ As}$	0,93
1	$\hat{CÊL}_1 = 27,44 + 0,1762*** \text{ TEMP} - 0,056 *** \text{ As}$	0,87
2	$\hat{TÛRB}_2 = 0,30 + 0,0033*** \text{ TEMP} - 0,0010*** \text{ As}$	0,88
2	$\hat{CÊL}_2 = 41,92 + 0,1900*** \text{ TEMP} - 0,11 *** \text{ As}$	0,81

*** efeito significativo a 0,1% de probabilidade, pelo teste F.

O maior crescimento registrado foi observado no controle (0 mg L⁻¹ de As), tanto em *N. piscinale* (OD_{750 nm} de 0,79 nm e N^o de células de 67,73 . 10⁶ mL⁻¹) quanto em *G. unigranulatum* (OD_{750 nm} de 1,26 nm e N^o de células de 102,40 . 10⁶ mL⁻¹). Em relação aos demais tratamentos, o crescimento reduziu gradativamente com o aumento da concentração de As e o tempo de exposição.

A análise de variância revelou efeito altamente distinto entre os fatores tempo x cianobactérias (p = 0,05).

3.4. Acúmulo de arsênio nas espécies de cianobactérias

O acúmulo de As nas cianobactérias foi influenciado pelas doses do metalóide no meio de cultura (Figura 7). O maior acúmulo de As em *Nostoc piscinale* foi observado na dose de 150 mg L⁻¹, em que foram encontrados 20,58 g kg⁻¹ de biomassa seca. Entretanto, nas doses de 200 e 250 mg L⁻¹ ocorreu decréscimo acentuado no As acumulado. Em *Geitlerinema unigranulatum*, o maior acúmulo de As foi na dose de 200 mg L⁻¹, em que foram encontrados 6,83 g kg⁻¹ de biomassa seca. Houve decréscimo no As acumulado na dose de 250 mg L⁻¹.

Os dados, quando submetidos à análise de variância, indicaram interação significativa entre a concentração de As e as espécies estudadas ($p = 0,05$), sendo as médias dos tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey.

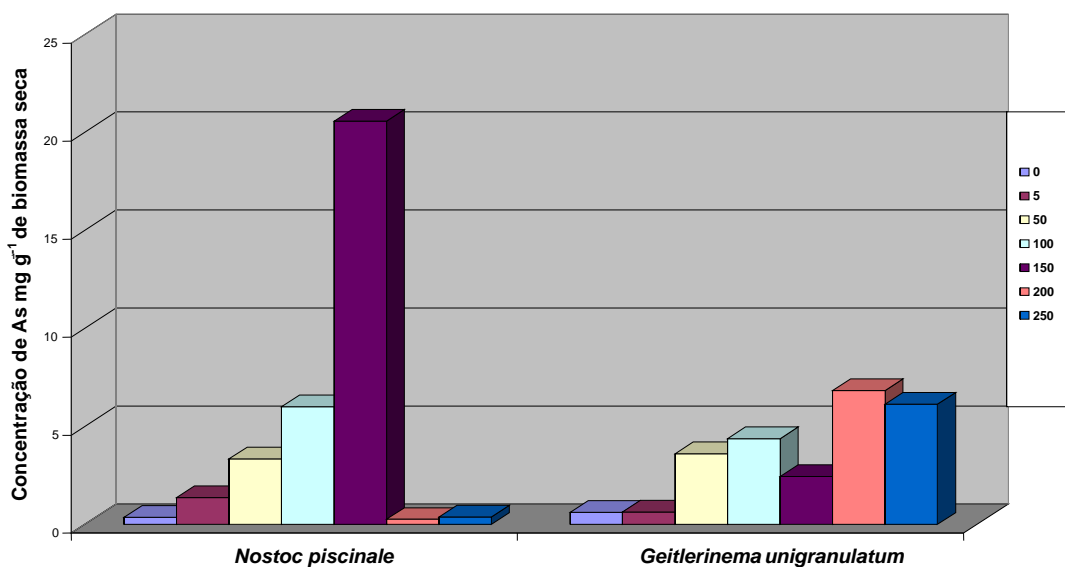


Figura 7 – Representação gráfica da concentração de As acumulado nas células de *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, expostas a diferentes doses de As (0,0; 5,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; e 250,0 mg L⁻¹), após 10 dias de experimento.

3.5. Concentração de proteínas totais

As diferentes concentrações de arsênio (As) influenciaram a produção de proteína total nas células. Observou-se um pico máximo de proteína na dose de As igual a 50 mg L⁻¹ em *Nostoc piscinale* (781,19 µg mL⁻¹) e na dose de As de 100 mg L⁻¹ em *Geitlerinema unigranulatum* (30.737,28 µg mL⁻¹), em comparação com o controle. Não obstante, nas concentrações de 150, 200 e 250 mg L⁻¹ observou-se decréscimo na concentração de proteínas nas duas espécies estudadas (Figura 8).

Os dados, após serem submetidos à análise de variância, apontaram interação entre a concentração de As e as espécies estudadas ($p = 0,05$), sendo as médias dos tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey.

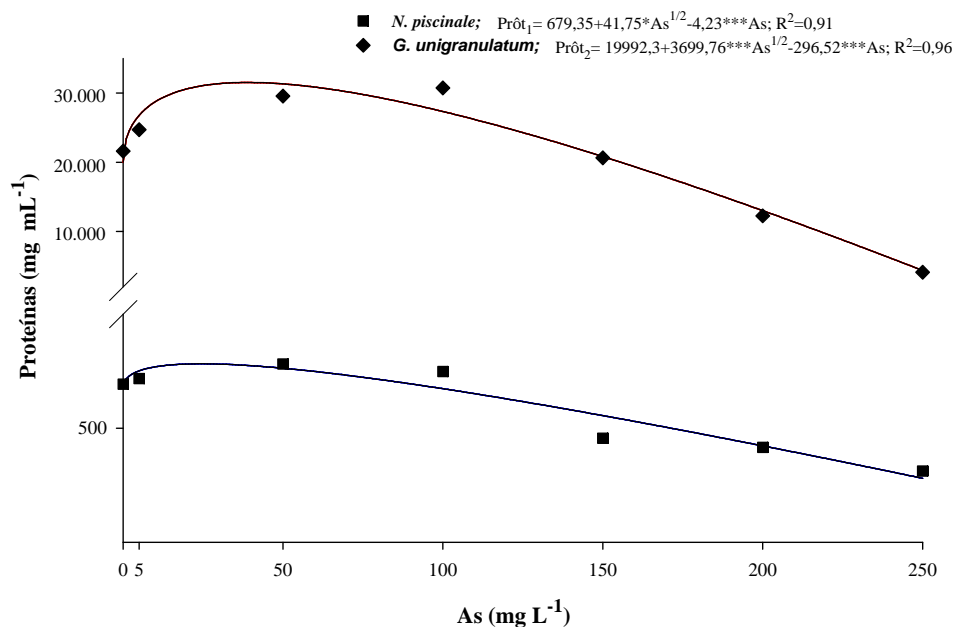


Figura 8 – Representação gráfica da concentração de proteínas totais em *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, expostas a diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e * efeitos significativos a 0,1% e 5% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

3.6. Concentração de tióis totais não protéicos

Pelos dados da análise de regressão, foi observado que a concentração de compostos tiolados nas células de cianobactérias (*Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*) foi influenciada pelas diferentes doses de arsênio (As) no meio de cultura (Figura 9). Entretanto, a maior concentração de tióis observada em *N. piscinale* (0,0587 nmol g⁻¹) e *G. unigranulatum* (0,0533 nmol g⁻¹) ocorreu na dose de 150 mg L⁻¹ de As. A concentração de tióis decresceu proporcionalmente nas doses maiores de As (200 e 250 mg L⁻¹).

Através da análise de variância, observou-se efeito significativo (p = 0,05) sobre o fator organismo e tratamento. Entretanto, não houve interação significativa entre os mesmos fatores, sendo as médias dos tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey.

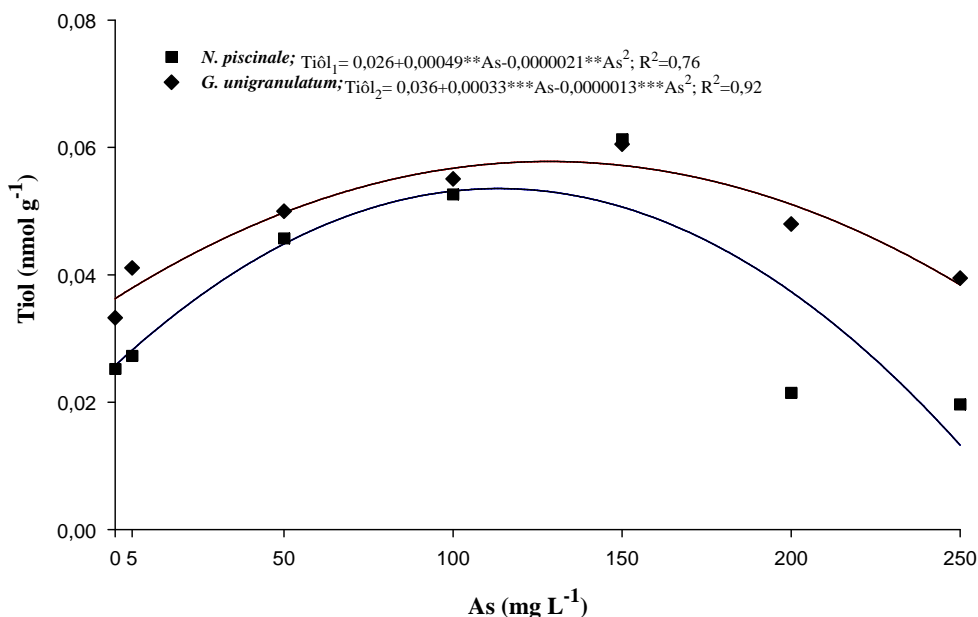


Figura 9 – Representação gráfica da concentração de tióis totais não-protéicos em *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, expostos às diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e ** efeito significativo a 0,1% e 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

3.7. Conteúdo de clorofila *a*

A análise de regressão evidenciou que a produção de Chl *a* se alterou em função do aumento na concentração de As, tanto em *Nostoc piscinale* quanto em *Geitlerinema unigranulatum*, em comparação com o controle, sendo os maiores valores de Chl *a* observados no controle (2,66 e 4,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em *N. piscinale* e *G. unigranulatum*, respectivamente. Entretanto, houve redução nos demais tratamentos. A diminuição no conteúdo de Chl *a* foi menos significativo em *N. piscinale*, enquanto em *G. unigranulatum* a redução foi mais acentuada, em relação aos maiores tratamentos (200 e 250 mg L^{-1} de As), conforme mostrado na Figura 10.

Os dados submetidos à análise de variância indicaram interação entre a concentração de As e as cianobactérias ($p = 0,05$), sendo as médias dos tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey.

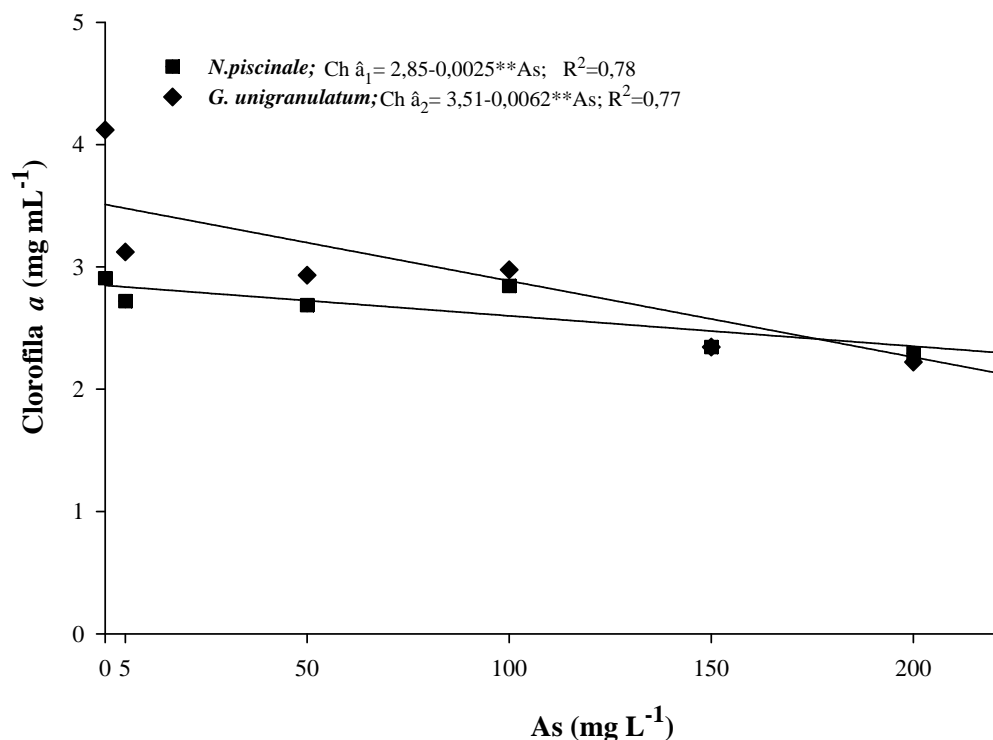


Figura 10 – Representação gráfica do conteúdo de Chl *a* em *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*, expostas às diferentes concentrações de As, após 10 dias de experimento. *** e * efeitos significativos a 0,1% e 5% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

3.8. Caracterização morfológica das células de cianobactérias expostas ao arsênio

Após 10 dias de exposição ao arsênio (As), foram observadas alterações na coloração e redução no volume de biomassa produzida pelas duas espécies (Figuras 11A-D e 12A-D); o mesmo não ocorreu com o controle.

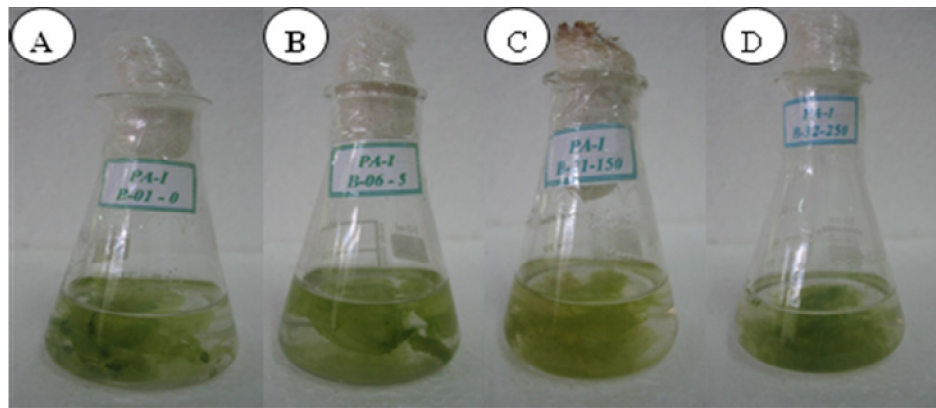


Figura 11 – Efeito do As nas culturas de *Nostoc piscinale*, após 10 dias de experimento, nas concentrações: A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: 250,0 mg L⁻¹.

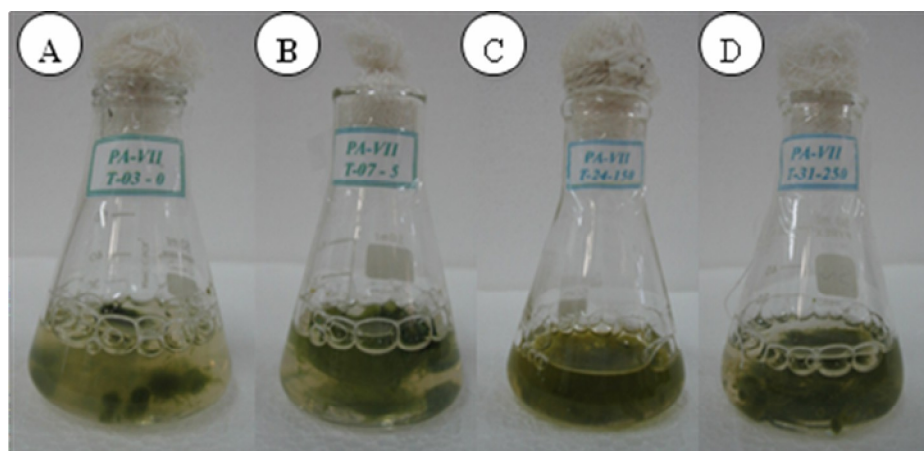


Figura 12 – Efeito do As nas culturas de *Geitlerinema unigranulatum*, após 10 dias de experimento, nas concentrações: A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: 250,0 mg L⁻¹.

Em *Nostoc piscinale*, observou-se diminuição do número e disposição dos filamentos das culturas tratadas com As. Nas culturas-controle, os filamentos estavam envolvidos por uma bainha espessa formando verdadeiros emaranhados e coloração esverdeada. Já nos tratamentos de 5, 150 e 250 mg L⁻¹ os filamentos apresentaram-se, no microscópio óptico, mais isolados, com células soltas, tamanho reduzido e coloração amarelada (Figuras 13A-D).

Em *Geitlerinema unigranulatum*, os filamentos mostraram-se com uma coloração verde-oliva consistente, tanto no controle quanto nos demais tratamentos. Ao microscópio óptico, os filamentos estavam mais emaranhados nos tratamentos com As, com tamanho reduzido e algumas células soltas (Figura 13A-D).

Nas Figuras 13A-D, apresentam-se fotomicrografia (ML) de filamentos de *Nostoc piscinale* exposta a diferentes concentrações de As (A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: 250,0 mg L⁻¹), após 10 dias de experimento.

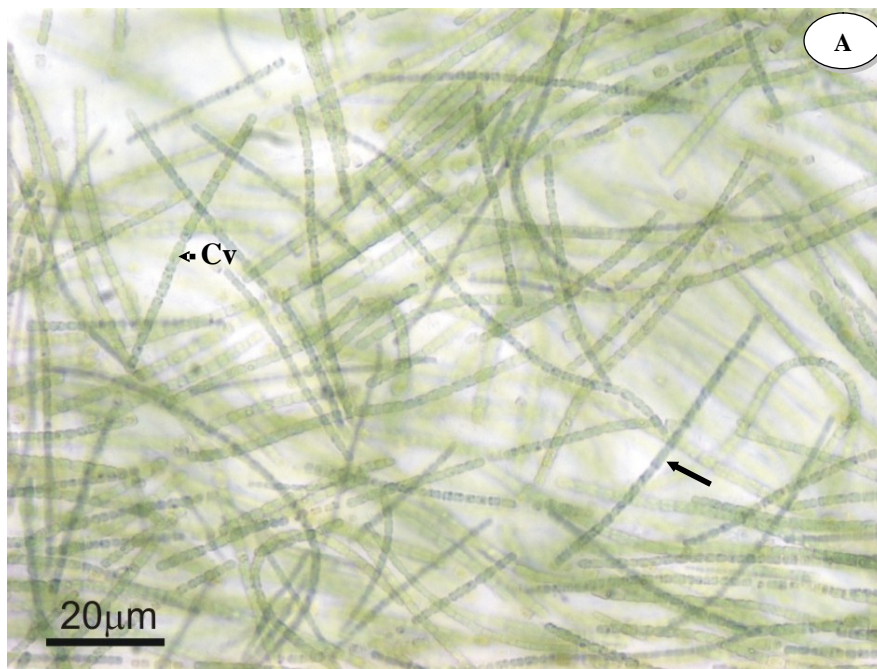


Figura 13A – Fotomicrografia (ML) de filamentos de *Nostoc piscinale* (controle). Observar filamentos retilíneos (seta) e células vegetativas (Cv) com aspecto normal, após 10 dias de experimento.

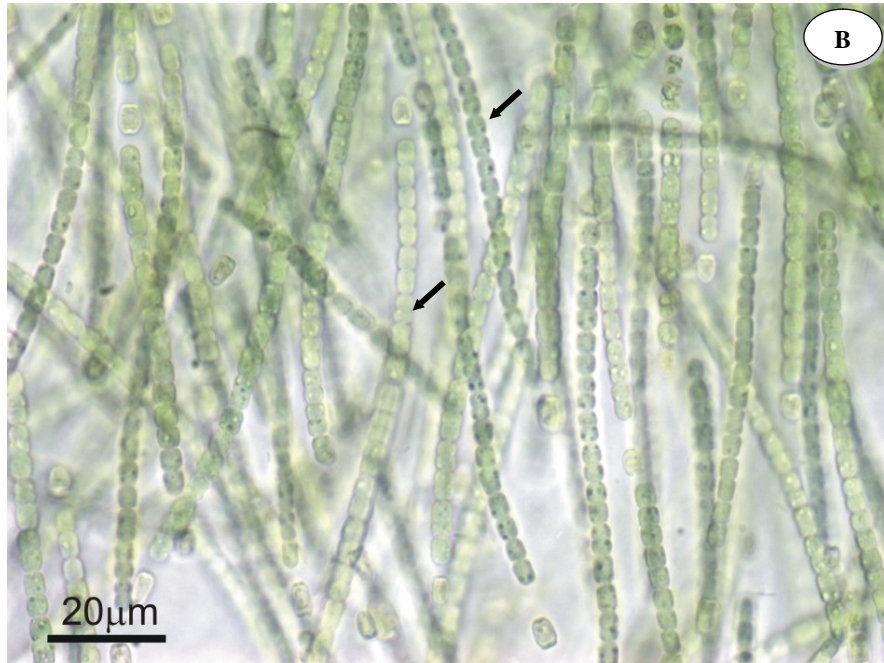


Figura 13B – Fotomicrografia (ML) de filamentos de *Nostoc piscinale*. Tratamento (5 mg L^{-1}). Observar filamentos (seta) mais curtos que longos, após 10 dias de experimento.

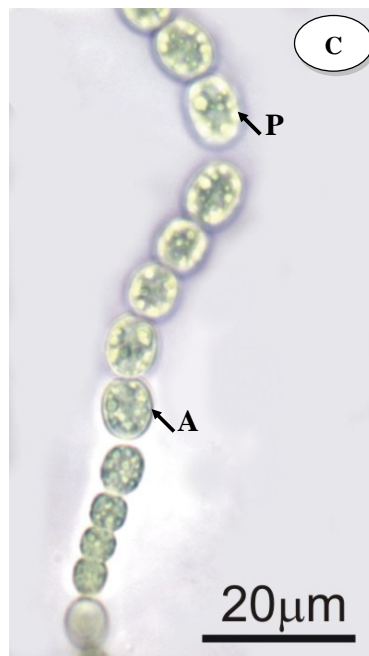


Figura 13C – Fotomicrografia (ML) de filamentos de *Nostoc piscinale*. Tratamento (150 mg L^{-1}). Detalhes da presença de filamento isolado com muitos acinetos (A) e redução do protoplasto (P), após 10 dias de experimento.

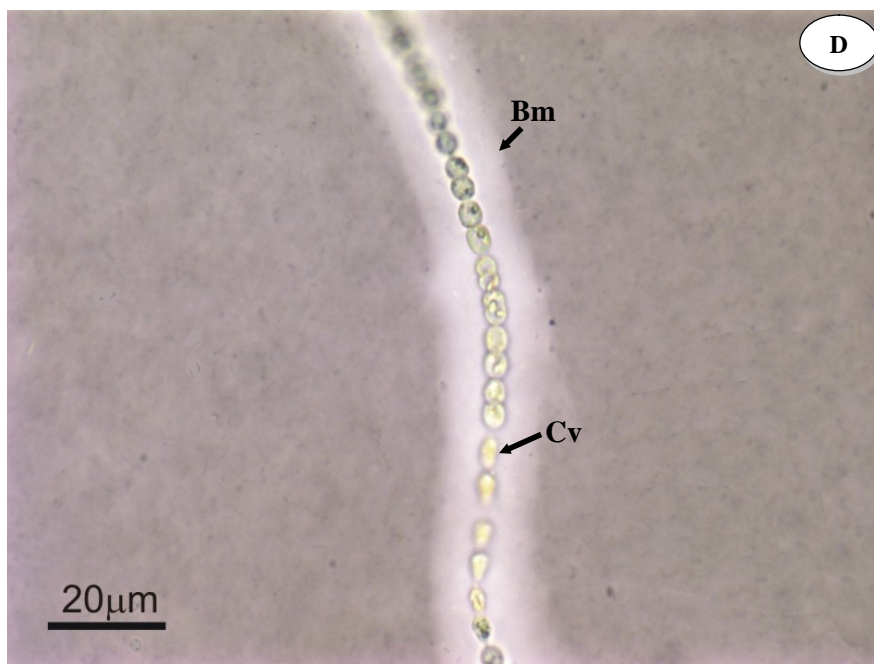


Figura 13D – Fotomicrografia (ML) de filamento de *Nostoc piscinale*, com coloração de nanquim, tratados com 250 mg L^{-1} . Detalhe da bainha mucilaginosa (Bm) menos espessa e células vegetativas (Cv) deformadas e sem protoplasto ao longo do filamento.

Na espécie *G. unigranulatum*, observou-se que as células expostas à concentração máxima de As (250 mgL^{-1}) foram mais afetadas. Os grânulos no interior das células tornaram-se pouco visíveis em relação ao controle. As alterações morfológicas nesta espécie foram pouco evidentes, para as demais concentrações de As (Figura 14B-D).

Nas Figuras 14A-D, fotomicrografia (ML)/contraste de fase dos filamentos de *Geitlerinema unigranlatum* exposta a diferentes concentrações de As: A: 0,0; B: 5,0; C: 150,0; e D: $250,0 \text{ mgL}^{-1}$, após 10 dias de experimento.

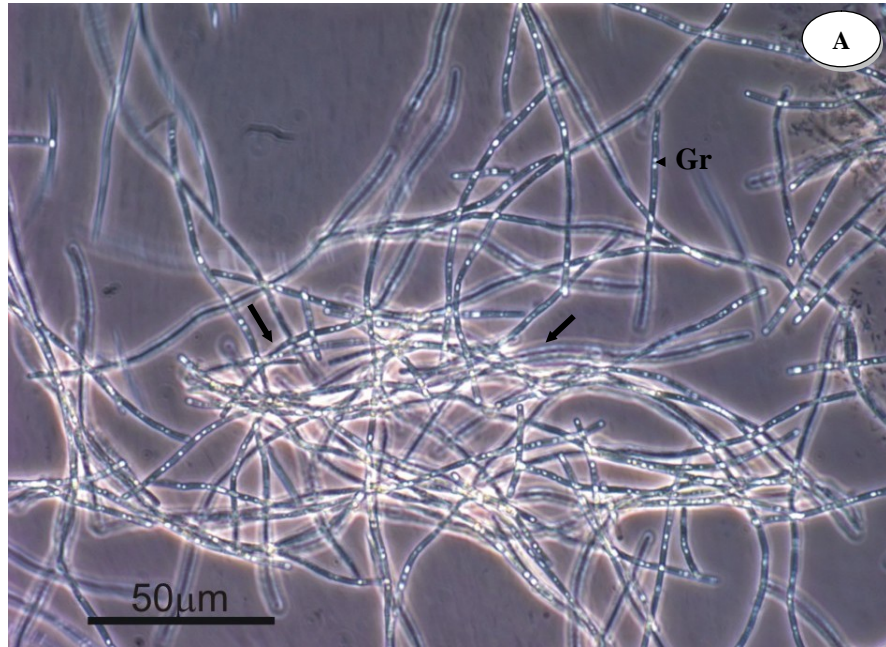


Figura 14A – Fotomicrografia (ML)/contraste de fase de fase de *Geitlerinema unigranulatum* (controle). Aspecto normal dos filamentos (setas), com a presença de grânulos (Gr), após 10 dias de experimento.

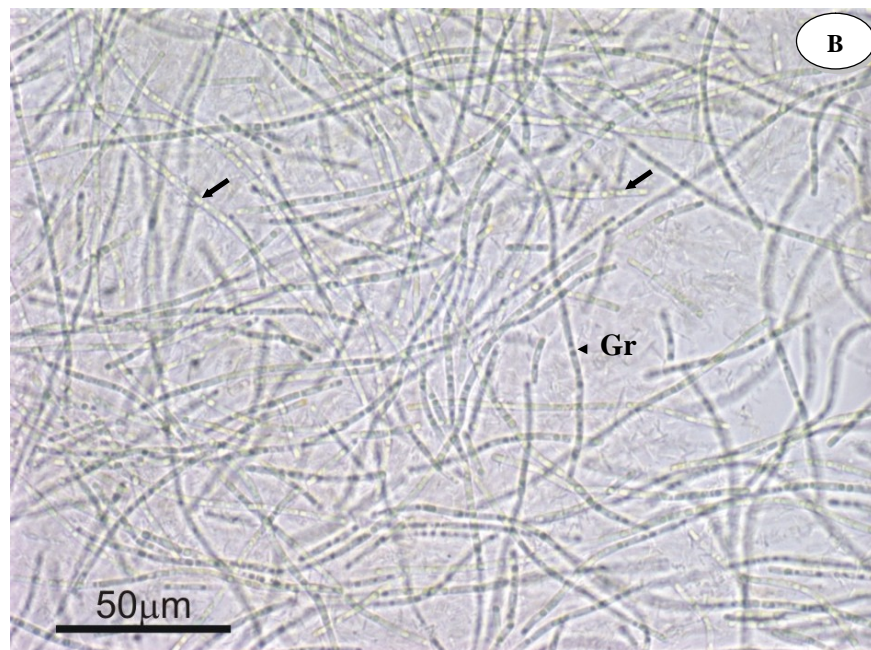


Figura 14B – Fotomicrografia (ML) *Geitlerinema unigranulatum* cultivada em BG-11 com As (5 mg L^{-1}): aspecto geral dos filamentos (seta). Detalhe da presença de grânulos (Gr), característica marcante dessa espécie.



Figura 14C – Fotomicrografia (ML) *Geitlerinema unigranulatum* tratada com (150 mg L^{-1}) de As, mostrando filamentos mais isolados e curtos (setas).

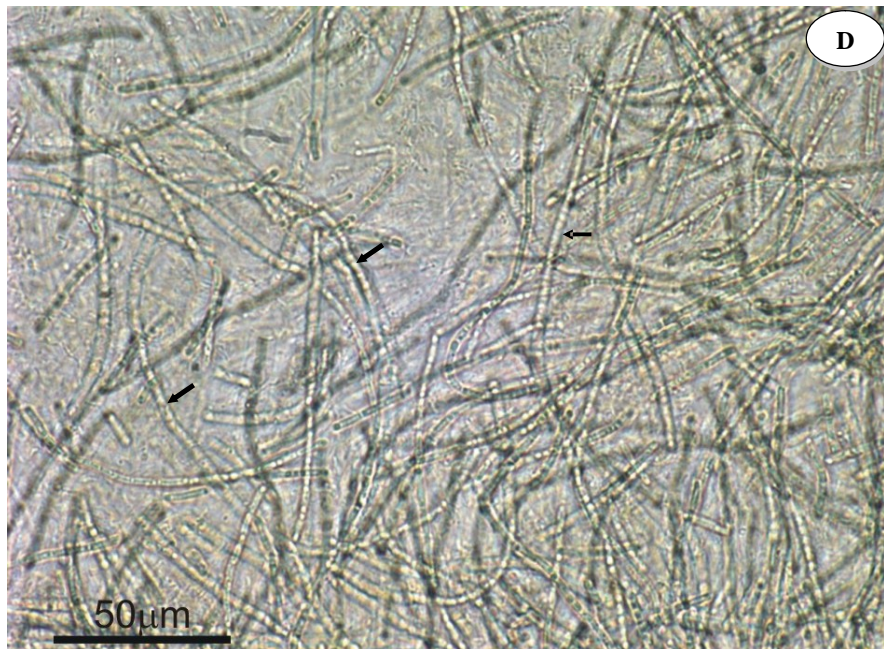


Figura 14D – Fotomicrografia (ML) mostrando filamentos de *Geitlerinema unigranulatum*. Células cultivadas no tratamento (250 mg L^{-1}) de As. Aspecto geral dos filamentos desorganizados (setas) e células sem protoplasto (ponta de seta).

4. DISCUSSÃO

As pesquisas aqui realizadas com as cianobactérias se devem ao fato de que tais microrganismos são freqüentemente encontrados em ambientes poluídos, especialmente naqueles onde ocorrem concentrações significativas de metais e metalóides, entre eles o arsênio (As). A partir da amostragem oriunda de áreas contaminadas por As, foi possível isolar e identificar, com sucesso, espécies de cianobactérias, que foram utilizadas posteriormente em experimentos de laboratório.

O conhecimento do padrão de crescimento das cianobactérias permitiu a seleção das espécies de *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum* para os experimentos posteriores. As duas espécies selecionadas possuem características distintas, o que permitiu avaliar a resposta de crescimento diante das diferentes concentrações de As (0,0; 100,0; 150,0; 200,0; e 250,0 mg L⁻¹). Tanto *N. piscinale* quanto *G. unigranulatum* apresentaram taxas de crescimento inferiores às do controle, em comparação com os tratamentos. Entretanto, as duas espécies mantiveram o crescimento até o final do experimento, fato que permitiu inferir que concentrações menores de As otimizarão futuros estudos de biorremediação com as cianobactérias, pois as doses de As utilizadas no experimento foram realmente altas. Apesar de serem possivelmente encontradas em solos e corpos de água próximos às áreas de mineração de ouro.

Planas e Healey (1978) mostraram que em *Anabaena* sp. e *Cryptomonas* sp. o crescimento não foi afetado quando as células foram cultivadas a uma concentração igual a 30 µg/mL de arsênio no meio. A exposição ao As também não foi tóxica para

Skeletonema costatum quando indivíduos foram expostos às concentrações de 1 µg/mL na presença de 2,7 µg/mL de P no meio de cultura (SANDERS, 1979).

As cianobactérias, em geral, são relatadas como organismos resistentes aos efeitos do arsênio (MATSUTO, 1984; THIEL, 1988). Provavelmente, isso foi devido à capacidade das cianobactérias em formar corpúsculos de polifosfato intracelular, os quais armazenam fosfato em condições de estresse (JACOBSON; HALMANN, 1982).

Os resultados da produção de Chl *a* nas duas espécies comprovaram a alteração no teor de Chl *a* em função do aumento da concentração de As, sendo os maiores valores de Chl *a* observados no controle de 2,66 e 4,25 µg mL⁻¹ em *N. piscinale* e *G. unigranulatum*, respectivamente, corroborando as demais análises de crescimento (nº de cél mL⁻¹ e leitura da OD_{750nm}).

De modo geral, as espécies sofreram redução da biomassa (OD_{750nm}, nº de cél mL⁻¹ e Chl *a*). A redução do crescimento é um dos mais frequentes sintomas observados numa condição de estresse ambiental nos organismos. Por causa do efeito tóxico, o As geralmente promove efeitos deletérios ou inibitórios nesses organismos.

Embora haja poucos relatos sobre o efeito direto do As nos sistemas de pigmentos, sabe-se que o teor de clorofila pode ser alterado em condição de estresse, acarretando alterações no crescimento das plantas ou de microrganismos fotossintetizantes, como as cianobactérias (MATHIS; KLEO, 1973).

O *input* de metais e metalóides acumulados pelas cianobactérias e outros organismos como microalgas e plantas superiores tem aumentado consideravelmente, segundo alguns autores. Matsuto et al. (1984) observaram que a cianobactéria *Phormidium* sp acumulou 19.000 µg.mg⁻¹ de As em sua biomassa seca. Naddaf (2004), analisando culturas de cianobactéria *Synechococcus leopoliensi*, obteve concentrações de Cd de até 95 µg.g⁻¹ (matéria fresca).

Francesconi et al. (2002) e Ma et al. (2001) relataram que em *Pteris vittata* e *Pityrogramma colomelanos* as plantas acumularam as seguintes concentrações de As em sua biomassa seca: 23.000 e 8.350 mg kg⁻¹, respectivamente. Guimarães (2006), avaliando o potencial acumulador das macrófitas *Azolla caroliniana*, *Salvinia mínima* e *Lemna gibba*, encontrou valores de As acumulado de 0,130; 0,200; e 1,397 mg g⁻¹ de As, respectivamente, na biomassa seca, quando as plantas foram expostas a 5 mg L⁻¹ de As.

Os resultados de acúmulo de As mostraram que as cianobactérias estudadas foram capazes de absorver e acumular As. Tal absorção ocorreu proporcionalmente à concentração do metalóide no meio de cultura, como aconteceu nos outros organismos. Foi possível observar em *N. piscinale* que ela atingiu um platô de absorção no tratamento equivalente a 150 mg L⁻¹ de As (20,58 mg⁻¹ g), em sua biomassa seca, enquanto *G. unigranulatum* teve seu platô na concentração de 200 mg L⁻¹ de As (6,83 mg⁻¹ g) em sua biomassa seca.

É sabido que a acumulação de As é feita através de biossorção, utilizando-se processos biológicos, químicos e físicos, o que pode ocorrer em células vivas ou mortas (BECEIRO-GONZÁLEZ et al., 2000; CALZADA et al., 1999; GENTER, 1996). Os principais mecanismos envolvidos na biossorção são: adsorção e absorção (GENTER, 1996). No entanto, é importante ressaltar que esses mecanismos antecedem respostas dos organismos ao estresse (BECEIRO-GONZÁLEZ et al., 2000; PIRSZEL et al., 1995), ou seja, a absorção de As pode ser dependente do estágio fisiológico das células.

A absorção de As em *N. piscinale* e *G. unigranulatum* ocorreu na fase “Log”. Dados semelhantes foram relatados por Maeda et al. (1992), que observaram taxa maior de absorção de As em cianobactérias durante a fase “Log”, ou seja, fase ótima de crescimento, com diminuição quando as células entraram na fase estacionária, em que provavelmente a excreção de formas de As inorgânicas e orgânicas tenha sido maior que a absorção do elemento. De acordo com Dembistky e Rezanka (2003), Kaise et al. (1999), Cervantes et al. (1994) e Matsuto et al. (1984), as células das cianobactérias, depois de determinado tempo de exposição ao As, são capazes de excretar formas metiladas ou não desse elemento.

Não se constatou se houve biotransformação ou metilação de arsênio pelas células de *N. piscinale* e *G. unigranulatum*, visto que neste trabalho foi analisado somente o arsênio total.

Bottino et al. (1978) identificaram a ocorrência da excreção de As acumulado em células de *Phormidium* sp., *Hymenomonas cartearae* e *Tetraselmis chui*, respectivamente. É importante ressaltar que a excreção de As por esses organismos ocorreu somente após a absorção ter alcançado o seu platô.

Em *N. piscinale* e *G. unigranulatum*, as maiores taxas de acúmulo de As ocorreram nos tratamentos em que as concentrações de As eram maiores. Nesses casos, visualmente foi observado que houve redução na produção da biomassa. Esse

comportamento está relacionado ao efeito tóxico do As sobre o crescimento das cianobactérias, resultando em morte celular, ou atribuído a deficiências nutricionais, como ausência de fosfato (PO_4^-) no meio de cultura. Isso vai de acordo com os resultados obtidos por Bottino et al. (1978), em que as maiores taxas de absorção foram obtidas quando o meio de cultura foi suplementado com fontes de PO_4^- .

Fator primordial em estudos de absorção de arsênio por cianobactérias e microalgas é a quantidade de biomassa necessária para a condução dos experimentos. Apesar de ser esse um parâmetro importante, não foi encontrada na literatura uma descrição uniforme da quantidade de biomassa algal que deveria ser utilizada para responder, adequadamente, à exposição ao contaminante, no caso o arsênio.

Segundo Beceiro-González (2000), quanto maior a quantidade de biomassa produzida, maior a quantidade de sítios de ligação disponíveis que facilitam os processos de absorção pelas células de algas. Gomes (2005) sugeriu o uso de biomassa de cianobactéria igual ou superior a 1,0 g de peso de matéria seca para a condução dos experimentos.

A composição do meio de cultura também é outro fator importante. Segundo Knauer et al. (1999) e Planas e Healey (1978), a absorção de As por cianobactérias depende da forma química e concentração de As no meio de cultura. O fosfato tem papel primordial na redução dos efeitos tóxicos desse elemento nas células daqueles organismos expostos ao metalóide (CALZADA et al., 1999; PLANAS; SANDRS, 1979; HEALEY, 1978; THIEL, 1988).

De acordo com os resultados deste estudo para os parâmetros CaT, proteína total, tióis totais não protéicos e Chl a, observou-se que os efeitos foram semelhantes, em todos os tratamentos de As.

Sabe-se que os organismos, de maneira geral, possuem sistemas de defesa antioxidante, os quais atuam na destoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) de formas diferenciadas. As EROs são favorecidas pelos fatores ambientais, entre eles a exposição aos metais e metalóides como o As. O efeito deletério das EROs ocorre quando estas estão em quantidades excessivas no organismo, ultrapassando a capacidade deste de neutralizá-las através dos sistemas naturais. O sistema antioxidante dos organismos promove a remoção das EROs formadas durante o metabolismo intracelular (YU, 1994). Os sistemas antioxidantes, por sua vez, parecem possuir a capacidade de adequar-se ao aumento da produção de EROs, através do aumento, redução ou estabilização de sua atividade.

Os CaT são compostos que, além de funcionarem como pigmentos acessórios, possuem importante capacidade para neutralizar e, ou, desintoxicar várias formas EROs. É importante ressaltar que o incremento significativo ocorrido na produção de CaT em *N. Piscinale*, no tratamento de 100 mg L⁻¹ de As (339,64 mg L⁻¹), permitiu associar a produção de CaT a um mecanismo de proteção, nessa espécie. A queda da produção de CaT em concentrações mais altas de As (200 e 250 mg L⁻¹), em *N. piscinale*, possivelmente esteja relacionada à diminuição da sua capacidade antioxidante, ou seja devida à redução de biomassa que ocorreu em face do efeito tóxico do As.

O contrário foi observado em *G. unigranulatum*, onde houve redução na produção de CaT nos tratamentos com As, em comparação com o controle. Nessa espécie, os CaT podem não estar associados a mecanismos de defesa nas células. Em organismos fotossintetizantes, como as cianobactérias, pigmentos da classe dos carotenóides compõem um dos sistemas não-enzimáticos para neutralização das EROs (THOMAS et al., 1998), daí a sua associação com uma ação protetora nas espécies estudadas. Entretanto, relatos associados aos efeitos dos CaT e à sua ação protetora sobre as células de cianobactérias, expostas aos metais pesados, são inexistentes.

Nesses experimentos, os resultados obtidos na produção de proteínas totais demonstraram que houve incremento na produção de proteínas no tratamento de 50 mg L⁻¹ de As, em *N. piscinale* (781,19 µg mL⁻¹), e no tratamento de 100 mg L⁻¹ de As, em *G. unigranulatum* (30.737,28 µg mL⁻¹); posteriormente, houve redução em ambas as espécies, nas maiores concentrações de As. Na produção de tióis totais não-protéicos, houve incremento no tratamento de 150 mg L⁻¹ de As em *N. piscinale* (0,0587 nmol g⁻¹) e no tratamento de 100 mg L⁻¹ de As, em *G. unigranulatum* (0,0533 nmol g⁻¹), reduzindo a produção de tióis totais não-protéicos nas concentrações mais elevadas de As, nas duas cianobactérias.

Sabe-se que as proteínas podem ser afetadas pelas EROs, através da oxidação das cadeias laterais de aminoácidos, assim como através das reações secundárias com produtos aldeídicos da peroxidação lipídica (SANDÁLIO et al., 2001; REINHECKEL et al., 1998). Proteínas e compostos tiólicos estão envolvidos nos mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos e protegem as células contra o estresse oxidativo provocado pelas EROs. Tal fato confere a esses elementos a capacidade de eliminação ou, então, impede a transformação deles em produtos mais

tóxicos para as células. Porém, sob condições extremas de estresse oxidativo, os organismos podem ter a funcionalidade desses compostos (proteínas e tióis) comprometida.

Estudos fisiológicos têm mostrado que um dos principais mecanismos de tolerância das cianobactérias aos metais envolve a complexação de íons metálicos no citosol, pelas metalotioneínas (MTs) classe II, de proteínas que se ligam aos metais, reduzindo-os ou inativando-os da toxicidade de íons metálicos, ou pelas fitoquelatinas, que são compostos tiólicos (LIU et al., 2003; SILVER; WALDERHAUG, 1995; GUPTA et al., 1993;). Por isso, avaliou-se a produção de compostos tiólicos (contendo grupos -SH), que são de grande importância como mecanismos de defesa contra os íons metálicos.

Os resultados desses experimentos permitiram mostrar que os compostos tiólicos estão envolvidos nos mecanismos de resistência ao As, semelhantemente às proteínas. Apesar de serem oriundos de estudos preliminares, os resultados indicaram a existência de um processo associado de proteção às células das cianobactérias. Assim como em outros organismos, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é favorecida pelos fatores ambientais que levam ao estresse, como é a exposição aos metais. Tal exposição induz os organismos a aumentar as defesas antioxidantes (não-enzimáticas e enzimáticas) (MALLICK; MOHN, 2000). Os compostos tiólicos estão entre as defesas não-enzimáticas e são descritos como os principais responsáveis pelos efeitos antioxidantes das proteínas plasmáticas. Apesar de os níveis desses compostos terem sido baixos nas cianobactérias estudadas, foi possível associar a sua produção ao estresse oxidativo. Verificou-se que o incremento de compostos tiólicos na presença de concentrações baixas de As podem atuar como resposta de proteção para os organismos estudados, visto que podem, também, estar envolvidos no processo de desintoxicação de metais.

A tolerância aos metais, especialmente ao As, tem sido relacionada com o potencial de alguns microrganismos de sintetizar peptídeos de baixo peso molecular e ricos em enxofre, como são os compostos tiólicos, os quais estão relacionados com a complexação dos íons (SCHMOGER et al., 2000). O As é armazenado como complexo As (III)-tris-tiol, tendo como doadores de elétrons possivelmente componentes como a glutatona ou fitoquelatinas, induzidas por intermédio da ação de enzimas antioxidantes na presença de cátions metálicos (SRIVASTAVA et al., 2004) e de ânions como arsenito e arsenato (RAUSER, 1999).

Os resultados preliminares evidenciam que a tolerância das espécies *N. piscinale* e *G. unigranulatum* está, de fato, associada à capacidade dos organismos de desenvolver sistemas antioxidantes eficientes. Nesse sentido, fazem-se necessários estudos mais aprofundados (bioquímicos, fisiológicos e moleculares) sobre o efeito da exposição dessas espécies ao As por um período mais prolongado.

As alterações morfológicas causadas às células, após a exposição ao As (12 dias), variaram de acordo com as doses aplicadas. Em tratamentos com concentrações inferiores a 5 mgL^{-1} de As, não foi possível observar, através da microscopia óptica, alterações morfológicas drásticas. Verificou-se pequena redução de filamentos nas culturas das duas espécies. Entretanto, nas concentrações de 150 e 250 mg L^{-1} de As houve desestruturação e desorganização dos filamentos e das células de *N. Piscinale*, enquanto em *G. unigranulatum* se observou apenas diminuição dos filamentos na cultura, o que não ocorreu com o tratamento-controle.

Descrições sobre as alterações morfológicas e ultra-estruturais em células de cianobactérias sob condições de estresse de As são raras e corroboram relatos de Gomes (2005), que ressalta a importância de descrições detalhadas dos efeitos do As na morfologia de células de cianobactérias.

Gomes (2005) demonstrou que as alterações observadas nas células de cianobactérias e algas podem estar relacionadas com funções desempenhadas pelo P nas células, como: redução do crescimento, observado em *Stigeoclonium* UFV-E02; formação de grânulos densos no citoplasma, em *Geitlerinema* UFV-E01, provavelmente corpúsculos de polifosfato, relatados na literatura (PLANAS; HEALEY, 1978; SANDERS, 1979; JACOBSON; HALMANN, 1982; THIEL, 1988; CERVANTES et al., 1994).

Estudos de microscopia de luz associados à microscopia eletrônica (ultra-estrutura) auxiliarão a compreensão das alterações morfológicas causadas pelos efeitos do As, por exemplo, na parede celular e nos tilacóides. Tais estruturas são, geralmente, as mais afetadas quando as cianobactérias são submetidas a estresse por poluentes. As alterações morfológicas observadas nos organismos podem ser responsáveis pelas diferenças na capacidade de biossorção de poluentes (orgânicos e inorgânicos), incluindo o As, o que irá afetar o potencial de tolerância e de absorção de As, assim como de outros poluentes.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontaram que as cianobactérias *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum* são capazes de absorver e acumular arsênio (As) em ambientes aquáticos e terrestres.

A concentração de As e o tempo de exposição foram fatores preponderantes no crescimento tanto de *N. piscinale* quanto de *G. unigranulatum*.

A diferença significativa na absorção de As por *N. piscinale* em relação a *G. unigranulatum* pode estar associada a características metabólicas diferenciadas não estudadas.

Ao considerar o potencial de extração e acúmulo, *N. piscinale* mostrou-se como a espécie de maior potencial para estudos de remoção de poluentes, em concentrações menores, enquanto *G. unigranulatum* apresentou tolerância a concentrações maiores, mesmo tendo produzido menor biomassa em relação ao controle.

A determinação do teor de proteína e tíóis não-protéicos forneceu informações importantes. Podem o incremento e, ou, a redução desses elementos estar associados à prevenção de danos celulares provocados pelo estresse oxidativo causado pela exposição ao As, apesar de serem pouco avaliados em estudos toxicológicos.

Reduções no crescimento, produção de Clorofila *a* e as alterações morfológicas significativas só ocorreram nas concentrações maiores de As. Sob as

demais concentrações de As utilizadas, observou-se maior capacidade de adaptação e proteção dos organismos.

Sugere-se que pesquisas com cianobactérias sejam mais incentivadas, no sentido de selecionar espécies tolerantes para serem utilizadas em estudos de biorremediação de metais pesados e metalóides como o As.

REFERÊNCIAS

ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SLOKOSKA, L. S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 544-549, 2000.

AGUIAR, R. M. **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1992. 122 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALLEN, M. M.; STANIER, S. T. Selective isolation of blue green algae from water and soil. **Journal of General Microbiology**, v. 51, p. 203-207, 1968.

AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies. **Journal of Hazardous Materials**, n. 108, 2004.

ANDERSON, R. K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E. **Analyst**, p. 111-1143, 1986.

ANJOS, V. E. **Especiação de cobre e arsênio no complexo estuarino da Baía de Paranaguá**. Curitiba: UFPR, 2006. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ASHER, C. J.; REAY, P. F. Arsenic uptake by barley seedlings. Australian. **Journal of Plant Physiology**, v. 6, p. 459-466, 1979.

BASU, A.; MAHATA, J.; GUPTA, S.; GIRI, A. K. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. **Mutation Research**, n. 488, p. 171-194, 2001.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum**, v. 40, p. 131-135, 1998.

BOTTINO, N. R.; NEWMAN, R. D.; COX, E. R.; STOCKTON, R.; HOBIN, M.; ZINGARO, R. A.; IRGOLIC, K.J. The effects of arsenate and arsenite on the growth and morphology of the marine unicellular algae *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) and *Hymenomonas carterae* (Chrysophyta). **Journal Experience Marine Biological Ecological**, v. 33, p. 153-168, 1978.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-259, 1976.

CAO, X.; MA, L. Q.; CONG, TU. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) **Environmental Pollution**, v. 128, p. 317-325, 2004.

CARBONELL, A. A.; AARABI, M. A.; DELAUNE, R. D.; GAMBRELL, R. P.; PATRICK JR., W. G. Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. **The Science of the Total Environment**, n. 217, p. 189-199, 1998.

CASTENHOLZ, R. W. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Eds.). **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1973. p. 379-414.

CERVANTES, C.; JI, G.; RAMÍREZ, J. L.; SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 355-367, 1994.

CHAIKUSANT, Y. Biosorption of cadmium (II) and copper (II) by pretreated biomass of marine alga *Gracilaria sheri*. **Environ. Technol.**, v. 24, p. 1501-150, 2003.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional**. 2005. Disponível em: <<http://www.lei.adv.br/357/2005.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2007.

DAGNINO, D.; MEIRELES, ABREU, D. E.; ALMEIDA, J. C. A. Controle de florações de cianobactérias tóxicas – buscando inibidores de crescimento de origem biológica. In: **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Niteroi, RJ: Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 2004. 9 p.

DEMBISTSKY, V. M.; REZANKA, T. Natural occurrence of arsenic compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science**, n. 165, p. 1177-1192, 2003.

DE VOS, C. H. R.; VONK, M. J.; VOOIJS, R.; SHAT, H. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*, **Plant Physiology**, v. 98, p. 853-858, 1992.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 135-142, 1999.

DOR, G.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crust in the Dead Sea Valley, Israel. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 83, p. 197-206, 1996.

FRANCESCONI, K.; VISOOTIVISETH, P.; SRIDOKCHAN, W.; GOESSLER, W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: potential phytoremediator of arsenic-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, n. 284, p. 27-35, 2002.

GENTER, R. B. Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In: **Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems**. San Diego: Academic Press, INC, 1996. 761 p.

GOMES, C. Q. **Caracterização de *geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-E02 (Chlorophyta) cultivadas em presença de arsênio**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 67 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A. G.; MA., L. Q. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Science Agriculture** (Piracicaba, Braz.), v. 63, p. 90-101, 2006.

GREGER, M. Metal availability and bioconcentration in plants. In: HAGEMEYER, J. (Ed.). Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. **Springer, Berlin, Heidelberg**, p. 1-27, 1999.

GUIMARÃES, F. P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GUPTA, A.; MORBY, A. P.; TURNER, J. S.; WHITTON, B. A.; ROBINSON, N. J. Deletion within the metallothionein locus of Cd-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). **Molecular Microbiology**, v. 7, p. 159-167, 1993.

JAIN, M.; GADRE, R. P. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. **Water Air & Soil Pollution**, v. 93, p. 109-115, 1997.

KAISE, T.; FUJIWARA, S.; TSUZUKI, M.; SAKURAI, R.; SAITOH, T.; MASTUBARA, C. Accumulation of arsenic in a unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 13, p. 107-111, 1999.

LADEIRA, A. C. Q.; CIMINELLI, V. S. T.; NEPOMUCENO, A. L. **Mineração: seleção de solos para a imobilização de arsênio**. Ouro Preto, MG: UFOP, Revisão Escola de Minas, 2002. 12 p.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll content and activities of stress related enzymes in young maize plants. London, **Plant and Soil**, n. 200, p. 241-250, 1998.

LEE, R.E. **Phycology**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1999. 645 p.

LEE, L. H.; LUSTGMAN, B.; CHU, I-YU; JOU, HUEY-LING. Effect of aluminum and pH on growth of *Anacystis nidulans*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 720-726, 1991.

LIU, T.; NAKASHIMA, S.; HIROSE, K.; UEMURA, Y.; SHIBASAKA, M.; KATSUHARA, M.; KASAMO, K. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters**, v. 542, p. 159-163, 2003.

MA, L. Q.; KOMAR, K. M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E. D. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, v. 409, p. 579, 2001.

MAEDA, S.; OHKI, A.; KUSADOME, K.; KUROIWA, T.; YOSHIFUKU, I.; NAKA, K. Bioaccumulation of arsenic and its fate in a freshwater food chain. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 6, p. 213-219, 1992.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, v. 58, p. 201-235, 2002.

MARTINS, A.; DINARDI, A. L.; FORMAGI, V. M.; LOPES, T. A.; BARROS, R. M.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. **Biorremediação**. III Fórum de Estudos Contábeis – Centro Superior de Educação Tecnológica (CESET). Campinas, SP: UNICAMP, 2003. 14 p.

MATHIS, P.; KLEO, J. The triplet state of B-carotene and of analog polyenes of different length. **Photochemistry Photobiologic**, v. 18, p. 343-346, 1973.

MATSUTO, S.; KASUGA, H.; OKUMOTO, H.; TAKAHASHI, A. Accumulation of arsenic in blue-green alga, *Phormidium* sp. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 78, p. 377-382, 1984.

MEEKS, J. C.; CASTENHOLZ, R. W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* – I. Effect of temperature on fluorescence and enhancement of CO₂ assimilation. **Journal Thermal Biology**, v. 3, p. 11-18, 1971.

MELO, R. F. **Potencial de espécies vegetais para fitorremediação de um solo contaminado por arsênio**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NADDAF, Y. G. **Análise proteômica de *Synechococcus lopoliensis* PCC7942 em resposta ao cádmio**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NAKAJIMA, A.; HORIKOSHI, T.; SAKAGUSHI, T. Recovery of uranium by immobilized microorganisms. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 88-91, 1982.

NASCIMENTO, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios – An ecofisiological study. **Environmental Toxicology**, v. 14, p. 37-44, 1999.

OLIVEIRA, F. S. **Disciplina: estresse oxidativo em sistemas biológicos propriedades das algas no balanço oxidativo**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 12 p.

PLANAS, D.; HEALEY, F. P. Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. **Journal of Phycology**, v. 14, p. 337-341, 1978.

RACHLIN, J. L.; JENSEN, T. E.; WARKENTINE, B. The toxicological response of the alga *Anabaena flos-aquae* (Cyanophyceae) to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v. 13, p. 143-151, 1984.

RAUSER, W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 19-48, 1999.

SAKUMA, A. M.; DE CAPITANI, E. M.; TIGLEA, P. Arsênio. In: AZEVEDO, F. A. CHASIN, A. A. M. (Eds.). **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 203-238.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 643-68, 1998.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowlwdge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, p. 359-385, 2000.

SCHMOGER, M. E.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxiation of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, v. 122, p. 793-801, 2000.

SILVER, S.; WALDERHAUG, M. Bacterial plasmid-mediated resistances to mercury, cadmium and copper. In: GOYER, R.A.; CHERIAN, M.G. (Eds.). **Toxicology of metals – Biochemical aspects**. Berlin: Springer –Verlag, 1995. p. 435-458.

SING, N.; MA, L. Q.; SHIVASTAVA, M.; RATHINASABAPATHI, B. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**. Corrected Proof. 2005. In Press.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S. Phytoremediation of Hazardous Lead from Environment. **Internacional Society of environmental Botanists**, v. 10, n. 2 – april 2004. Disponível em: <http://www.geocities.com/isebindia/01_04/04-04-4.html>. Acesso em: 24 abr. 2007.

SKULBERG, O. M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YURUM, Y. (Ed.). **Hydrogen energy system**. Production and utilization of hydrogen and future aspects. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 95-110.

SOEDER, C.J.; PAYER, H.D.; RUNKEL, K.H.; BEINE, J.; BRIELE, E. Sorption and concentration of toxic minerals by mass cultures of Chlorococcales. **Mitt. Int. Verein. Limnol.**, v. 21, p. 575-584, 1978.

THOMPSON, S. L.; MANNING, F. C. R.; McCOLL, S. M. Comparason of toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria. **Bulletin of Environmental Contamination and toxicology**, v. 69, p. 286-293, 2002.

ULLRICH-EBERIUS, C. I.; SANZ, A.; NOVACKY, J. Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 119-12, 1989.

WILKINSON, S. C.; GOULDING, K. H.; ROBINSON, P. K. Immobilized algae for wastewater treatment. **Journal of Phycology**, v. 25, p. 99-105, 1990.