

**ALLAN VICTOR MARTINS ALMEIDA**

**BASES FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM CIANOBACTÉRIAS EM  
RESPOSTA A PRESENÇA DE ARSÊNIO**

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

Orientador: Wagner Luiz Araújo

Coorientador: Marcelo Gomes Marçal Vieira  
Vaz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A447b  
2023  
Almeida, Allan Victor Martins, 1995-  
Bases fisiológicas e moleculares em cianobactérias em  
resposta a presença de arsênio / Allan Victor Martins Almeida. –  
Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (164 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.035>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cianobactérias - Filogenia. 2. Cianobactérias -  
Morfologia. 3. Cianobactérias - Metabolismo. 4. Arsênio.  
I. Araújo, Wagner Luiz, 1980-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 579.39

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552


**ALLAN VICTOR MARTINS ALMEIDA**

**BASES FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM CIANOBACTÉRIAS  
EM RESPOSTA A PRESENÇA DE ARSÊNIO**

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


APROVADA: 15 de dezembro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **ALLAN VICTOR MARTINS ALMEIDA**  
Data: 24/01/2024 11:20:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Allan Victor M. Almeida  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 **WAGNER LUIZ ARAUJO**  
Data: 31/01/2024 08:22:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Wagner Luiz Araújo  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmã, Ivanilson, Simone e Amanda, por todo o apoio ao longo da minha vida, pelo carinho, pelo auxílio, por todo incentivo para ser quem eu sou. Por tudo, muito obrigado!

Ao meu padrinho, madrinha e a minha avó, Ivonilson, Ive Estella e Maria Idalina, agradeço todo o carinho e por estarem sempre ao meu lado.

À minha família, pelo apoio e companhia, e por estarem sempre presentes durante minha jornada.

À minha grande companheira Julia, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelas conversas, pela paciência, pelo carinho. Obrigado!

Ao meu orientador, Wagner L. Araújo, pela ajuda, pelo auxílio e pela orientação e valiosa mentoria dada ao longo de todos esses anos.

Ao meu coorientador, Marcelo Vaz, por toda a inspiração durante a academia, por todo o auxílio e apoio ao longo de todos os anos de trabalho.

Aos meus grandes amigos que conheci durante esses últimos 10 anos, que ficarão para sempre.

À turma da BIO2013, à turma da Kosmos, à União Cacetinho de Queijo, ao Grupo do Ivan e todas as pessoas das quais fico muito feliz de ter tido a oportunidade de conhecer.

Aos colegas de laboratório da UCP, por toda companhia, por toda ajuda durante esse período.

A todos que fizeram parte da Ficologia, onde pude compartilhar diversos momentos incríveis.

À Universidade Federal de Viçosa, por toda a hospitalidade em me receber, a toda a infraestrutura presente nessa universidade que permitiu que esse trabalho fosse realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por todo o apoio e oportunidade.

Ao Departamento de Biologia Vegetal por toda a infraestrutura e apoio na realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
pelo financiamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),  
pelo financiamento.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento  
de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ALMEIDA, Allan Victor Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023. **Bases fisiológicas e moleculares em cianobactérias em resposta a presença de arsênio** Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientador: Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

As cianobactérias são bactérias gram-negativas, que realizam fotossíntese oxigênica e possuem uma grande variação morfológica. Elas ainda apresentam uma grande diversidade metabólica e fisiológica, permitindo que colonizem uma gama de habitats aquáticos e terrestres. Em muitos destes ambientes ocorre a presença e acúmulo de diversos metais pesados, bem como de outros elementos tóxicos, como o arsênio (As). O As é encontrado naturalmente no ambiente, mas, nos últimos anos, tem ocorrido um aumento em suas concentrações em decorrência predominantemente da mineração. Devido à sua diversidade metabólica, as cianobactérias são capazes de habitarem ambientes contaminados com As, e também participam do ciclo biogeoquímico desse elemento. Cumpre mencionar que, ao longo do processo evolutivo, as cianobactérias desenvolveram diversas estratégias de resistência e tolerância ao As, incluindo múltiplas biotransformações deste elemento. Alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas também estão envolvidas na resposta ao estresse por As. Neste contexto, o operon *ars* (*arsBHC*) responde pelo principal mecanismo de resistência ao As em cianobactérias: *arsC* codifica para uma redutase do arsenato, ao passo que *arsB* ou *acr3*, codificam uma permease do arsenito. Ressalta-se ainda que, dentre as diferentes morfologias apresentadas por cianobactérias, morfotipos filamentosos parecem possuir uma menor tolerância ao As quando comparadas a linhagens unicelulares. Porém, pouco se sabe sobre qual(is) fator(es) permitem às cianobactérias unicelulares apresentarem essa maior tolerância. Desta forma, o estudo de linhagens de cianobactérias diversas, incluindo as isoladas de ambientes contaminados por As, pode ajudar a elucidar alguns processos e também desvendar novos mecanismos relacionados a essa resistência/tolerância diferencial. Neste estudo, três organismos isolados de ambientes hostis foram identificados e classificados. Também se examinou o crescimento, as alterações metabólicas, fisiológicas e morfológicas de seis cianobactérias expostas a duas concentrações de arsenito. Destaca-se a notável flexibilidade desses organismos em colonizar ambientes contaminados com arsênio, evidenciando sua capacidade de resposta mesmo em altas concentrações desse elemento. Algumas linhagens conseguiram manter ou recuperar padrões de crescimento próximos às condições controle, ressaltando a presença de mecanismos eficientes na mobilização do arsênio. Percebe-se, também, que a produção de um polímero celular externo (EPS) e o aumento nos padrões de agregação celular e tricomas são respostas comuns à exposição ao arsenito, indicando um papel na redução da mobilidade e contato do arsênio com as células. Este estudo fornece *insights* sobre como o metabolismo desses organismos é afetado pelo arsênio, revelando padrões de resposta que podem

ser explorados em estudos futuros. A coleta, identificação e caracterização desses organismos isolados de ambientes contaminados são de grande importância, destacando o potencial uso biotecnológico dessas cianobactérias em ambientes afetados por arsênio. Além disso, o entendimento de seu metabolismo nessas condições contribui para diversas áreas científicas.

**Palavras-chave:** arsênio, cianobactérias, filogenia, metabolismo, morfologia.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Allan Victor Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2023. **Physiological and molecular basis of the response to the presence of arsenic in Cyanobacteria** Advisor: Wagner L. Araújo. Co-Advisor: Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Cyanobacteria, a group of Gram-negative bacteria capable of oxygenic photosynthesis, exhibit extensive morphological diversity and a broad range of metabolic and physiological adaptations, enabling colonization of diverse aquatic and terrestrial habitats. Many of these environments host elevated concentrations of heavy metals, including arsenic (As), a naturally occurring element that has increased in presence due to mining activities. Leveraging their metabolic diversity, cyanobacteria thrive in As-contaminated habitats and actively participate in the biogeochemical cycling of this element. Through evolutionary processes, cyanobacteria acquired diverse strategies, including morphological, physiological, and biochemical adjustments to resist and tolerate arsenic-induced stress. In this context, the *ars* operon (*arsBHC*) emerges as the primary mechanism conferring As resistance in cyanobacteria, where *arsC* encodes an arsenate reductase and *arsB* or *acr3* encodes an arsenite permease. Notably, among different cyanobacterial morphotypes, filamentous morphotypes exhibit lower As tolerance compared to unicellular strains. However, the factors contributing to the enhanced tolerance of unicellular cyanobacteria remain poorly understood. This study investigates diverse cyanobacterial strains, including those isolated from As-contaminated environments, shedding light on processes and unveiling novel mechanisms underlying this differential resistance/tolerance. Three organisms isolated from hostile environments were identified and classified. The growth, metabolic, physiological, and morphological changes of six cyanobacteria exposed to two arsenite concentrations were examined. These organisms displayed remarkable flexibility in colonizing arsenic-contaminated environments, showcasing their adaptive responses even in high arsenic concentrations. Some strains maintained or recovered growth patterns similar to control conditions, emphasizing the efficiency of arsenic mobilization mechanisms. Additionally, the production of an extracellular polymeric substance (EPS) and increased cellular and trichome aggregation were common responses to arsenite exposure, suggesting a role in reducing arsenic mobility and contact with cells. This study provides insights into how arsenic affects the metabolism of cyanobacteria, revealing response patterns that can be explored in future studies. The identification and characterization of these organisms isolated from contaminated environments are crucial, emphasizing the biotechnological potential of cyanobacteria in arsenic-affected habitats. Understanding their metabolism under these conditions contributes to various scientific fields.

**Keywords:** arsenic, cyanobacteria, phylogeny, metabolism, morphology.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1:

**Figura 1.** Prancha microfotográfica da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.

**Figura 2.** Prancha microfotográfica da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034.

**Figura 3.** Prancha microfotográfica da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035.

**Figura 4.** Reconstrução filogenética do gene 16S RNA ribossomal da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.

**Figura 5.** Reconstrução filogenética do gene 16S RNA ribossomal da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034.

**Figura 6.** Reconstrução filogenética do gene 16S RNA ribossomal da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035.

**Figura 7.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

**Figura 8.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e de linhagens relacionadas filogeneticamente.

**Figura 9.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

**Figura 10.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

**Figura 11.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

**Figura 12.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

### CAPÍTULO 2:

**Figura 1.** Taxa de sobrevivência celular (%) nas linhagens de cianobactéria em estudo.

**Figura 2.** Curvas de crescimento das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 3.** Curvas de crescimento das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 4.** Curvas de crescimento das linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.

**Figura 5.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 6.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 7.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.

**Figura 8.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 9.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

**Figura 10.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.

**Figura 11.** Quantificação dos conteúdos de glicogênio das linhagens em estudo em meio suplementado com arsenito.

**Figura 12.** Quantificação do arsênio total no sobrenadante das amostras coletadas durante a curva de crescimento

**Figura 13.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 14.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 15.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *L. platensis* PCC7345 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 16.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 17.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 18.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

**Figura 19.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens unicelulares (*Synechocystis* sp. PCC6803 e CCM-UFV039)

**Figura 20.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens homocitadas (*L. platensis* sp. PCC7345 e *A. terrestris* CCM-034).

**Figura 21.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens heterocitadas (*Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035).

**Figura 22.** Prancha de microfotografias das linhas unicelulares coradas com Nanquim.

**Figura 23.** Diâmetro da camada de EPS das linhagens unicelulares (*Synechocystis* spp.).

**Figura 24.** Prancha de microfotografias das linhagens homocitadas coradas com Nanquim.

**Figura 25.** Prancha de microfotografias das linhagens heterocitadas coradas com Nanquim.

**Figura 26.** Prancha de fotografias das linhagens heterocitadas expostas ao arsenito.

### **CAPÍTULO 3:**

**Figura 1.** Reconstrução filogenética do peptídeo traduzido do gene *acr3* para os produtos obtidos nesse trabalho.

**Figura 2.** Reconstrução filogenética do peptídeo traduzido do gene *acr3* para os produtos obtidos nesse trabalho.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1:

**Tabela 1.** Códigos, local de isolamento e porcentagem de identidade das sequências para o gene 16S rRNA de linhagens selecionadas, comparadas com aquelas depositadas no GenBank.

**Tabela 2.** Características morfológicas das linhagens utilizadas neste estudo.

**Tabela 3.** Tamanho da região 16S-23S ITS das linhagens em estudo.

### CAPÍTULO 2:

**Tabela 1.** Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens unicelulares (*Synechocystis*).

**Tabela 2.** Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens homocitadas (Oscillatoriales).

**Tabela 3.** Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens heterocitadas (Nostocales).

### CAPÍTULO 3:

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes *acr3* e *arsM* nas linhagens em estudo.

**Tabela 2.** Tamanho das amplificações geradas para os genes *acr3* e *arsM* nas linhagens em estudo.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	17
REFERÊNCIAS .....	20
CAPÍTULO 1 .....	24
TÍTULO: Caracterização de cianobactérias isoladas de ambientes salinos e contaminados por arsênio .....	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT .....	27
1. INTRODUÇÃO .....	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1 Seleção das linhagens .....	32
2.2 Caracterização morfológica e morfométrica.....	32
2.3 Extração do DNA genômico e amplificação do 16-23S rRNA.....	32
2.4 Sequenciamento dos fragmentos obtidos nas PCR.....	32
2.5 Reconstruções filogenéticas das linhagens em estudo.....	33
2.6 Dobramento da estrutura secundária da região ITS .....	33
3. RESULTADOS .....	34
3.1 Local de isolamento e dados ecológicos das linhagens <i>em estudo</i> .....	34
3.2 Caracterização morfológica e morfométrica das linhagens em estudo .....	35
3.3 Caracterização filogenética das linhagens nativas em estudo .....	38
3.3.1 A linhagem unicelular Chroococcales, <i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039; .....	39
3.3.2 A linhagem homocitada, Oscillatoriales, <i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034;.....	41
3.3.3 A linhagem heterocitada, Nostocales, <i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035;.....	43
3.4 Estrutura da região 16-23S ITS;.....	45

3.4.1 A linhagem unicelular, Chroococcales, <i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039;	45
3.4.2 A linhagem homocitada, Oscillatoriales, <i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034;	48
3.4.3 A linhagem heterocitada, Nostocales, <i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035;...	50
4. DISCUSSÃO .....	52
4.1 Caracterização ecológica, morfológica e filogenética da linhagem <i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039 .....	52
4.2 Caracterização ecológica <i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034 e <i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035 .....	53
4.2.1 Caracterização morfológica e filogenética da linhagem <i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034 .....	53
4.2.2 Caracterização morfológica e filogenética da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035 .....	55
4.3 Dobramento das estruturas secundárias da região do ITS .....	56
4.3.1 Estrutura secundária do ITS da linhagem <i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039.....	56
4.3.2 Estrutura secundária do ITS da linhagem <i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034 .....	57
4.3.3 Estrutura secundária do ITS da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035 .....	58
5. CONCLUSÕES .....	59
6. REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 2 .....	65
TÍTULO: Impactos do arsenito na fisiologia e morfologia de diferentes linhagens de cianobactérias .....	65
RESUMO.....	66
ABSTRACT .....	67
1. INTRODUÇÃO.....	68

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1 Seleção das linhagens .....	73
2.2 Condições de cultivo do pré-inóculo .....	73
2.3 Seleção das concentrações de arsenito para o trabalho .....	73
2.4 Curvas de crescimento sob diferentes concentrações de Arsênio.....	74
2.5 Análises bioquímicas .....	74
2.6 Quantificação de arsênio total no sobrenadante .....	75
2.7 Análises de microscopia .....	76
2.7.1 Microscópio eletrônico de varredura (SEM).....	76
2.7.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS).....	76
2.7.3 Microscopia óptica de luz com coloração de Nankin .....	77
2.8 Análise estatística dos dados.....	77
3.RESULTADOS .....	78
3.1 Concentração apropriada de arsenito .....	78
3.2 Curva de crescimento e dados cinéticos das linhagens submetidas as concentrações de arsenito selecionadas .....	79
3.2.1 Linhagens unicelulares, <i>Synechocystis</i> spp. PCC6803 e CCM-UFV039 .....	79
3.2.2 Linhagens homocitadas, <i>L. platensis</i> PCC7345 e <i>A. terrestris</i> sp. CCM- UFV034.....	81
3.2.3 Linhagens heterocitadas, <i>Nostoc</i> sp. PCC7120 e <i>T. flavodiazotum</i> CCM- UFV035.....	83
3.3 Análises bioquímicas .....	84
3.3.1 Quantificação das clorofilas totais .....	84
3.3.2 Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais.....	88
3.3.3 Glicogênio.....	93
3.4 Quantificação do As total no sobrenadante .....	95

3.5 Análises de microscopia .....	96
3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	96
3.5.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) .....	102
3.5.2 Análise óptica de luz com coloração de Nanquim .....	107
4. DISCUSSÃO .....	111
4.1 Crescimento e cinética são alterados pela presença de As .....	111
4.1.1 Linhagens unicelulares ( <i>Synechocystis</i> ).....	112
4.1.2 Linhagens homocitadas ( <i>Oscillatoriales</i> ) .....	113
4.1.3 Linhagens heterocitadas ( <i>Nostocaceae</i> ).....	114
4.2 Análises bioquímicas .....	115
4.2.1 Clorofilas totais .....	115
4.2.2 Proteínas e aminoácidos solúveis totais; .....	117
4.2.3 Glicogênio.....	119
4.3 Análises de microscopia .....	122
4.3.1 Linhagens unicelulares ( <i>Synechocystis</i> spp. PCC6803 e CCM-UFV039) .....	122
4.3.2 Linhagens homocitadas ( <i>L. platensis</i> PCC7345 e <i>A. terrestris</i> CCM- UFV034) .....	123
4.3.3 Linhagens Heterocitadas ( <i>Nostoc</i> sp. PCC7120 e <i>T. flavodiazotum</i> CCM- UFV035) .....	124
5. CONCLUSÕES .....	127
6. REFERÊNCIAS.....	130
CAPÍTULO 3 .....	141
TÍTULO: Filogenia comparativa entre genes <i>ars</i> e 16S rRNA em Cianobactérias morfologicamente distintas;.....	141
RESUMO.....	142
ABSTRACT .....	143

1. INTRODUÇÃO .....	144
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	148
2.1 Seleção das linhagens .....	148
2.2 Amplificação dos genes <i>acr3</i> e <i>arsM</i> .....	148
2.3 Sequenciamento dos fragmentos de PCR .....	149
2.4 Construção das árvores filogenéticas .....	149
3.RESULTADOS .....	150
3.1 Estrutura dos genes amplificados .....	150
3.2 Filogenia para o gene <i>acr3</i> (bomba de efluxo de arsenito) .....	150
3.3 Filogenia para o gene <i>arsM</i> (metiltransferase do arsenito) .....	152
4. DISCUSSÃO .....	155
4.1 Filogenia do gene <i>acr3</i> .....	155
4.2 Filogenia do gene <i>arsM</i> .....	156
5. CONCLUSÕES .....	158
6. REFERÊNCIAS .....	159
CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	164

## INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias (domínio *Bacteria*, filo *Cyanobacteria*) são bactérias gram-negativas, que realizam fotossíntese oxigênica, e que possuem uma grande variação morfológica, apresentando desde formas unicelulares a filamentosas heterocitadas (Komárek and Kaštovský, 2003). Em adição a isso, elas apresentam uma grande diversidade metabólica e fisiológica, permitindo-as colonizarem uma variada gama de habitats aquáticos e terrestres (de Alvarenga et al., 2018; Obuekwe et al., 2019; Schirrmeister et al., 2013). Como indivíduos fotossintéticos, as cianobactérias são afetados pela disponibilidade e qualidade de luz (Thurotte et al., 2015; Xu et al., 2012). Nesses organismos, a coleta de luz é realizada pelos ficobilissomos (análogo ao complexo antena de plantas) (Mullineaux, 2008), que transferem a energia da luz para a clorofila *a* presente no centro de reação dos fotossistemas I (PSI) e II (PSII) (Liu et al., 2013). Várias espécies de cianobactéria também possuem a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Esteves-Ferreira et al., 2017; Postgate, 1982), tornando esses organismos importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono (C) e do nitrogênio (N) (Vitousek and Howarth, 1991; Zhang et al., 2018).

Morfologicamente, as cianobactérias são comumente divididas em três grandes grupos, as unicelulares, as filamentosas homocitadas e as filamentosas heterocitadas (Anagnostidis, 1985). Os membros das ordens filamentosas possuem diferentes níveis de diferenciação celular e morfológica (Komárek et al., 2014). Os membros das ordens filamentosas possuem diferentes níveis de diferenciação celular e morfológica (Komárek et al., 2014). Neste contexto, espécies da ordem Nostocales possuem dois tipos de células especializadas: os heterócitos, células com um microambiente anóxico especializado para a ocorrência da FBN, e os acinetos, células dormentes e envelopadas com paredes mais grossas, que funcionam como esporos de resistência (Flores and Herrero, 2010; Komárek and Anagnostidis, 1989; Meeks et al., 2002).

Devido a sua grande diversidade metabólica as cianobactérias são capazes de habitar uma ampla gama de ambientes (Schirrmeister et al., 2013; Taton et al., 2006). Em muitos destes ambientes, como rios e lagos, ocorre a presença e acúmulo de diversos metais pesados, como Fe, Mg, Al, entre outros. Adicionalmente, como relatado por Figueiredo et al. (2007a) e Huertas et al. (2014), o arsênio (As) também tem sido acumulado nestes ambientes. O As é um metalóide, que ocorre principalmente em formas inorgânicas, sendo as mais prevalentes o arsenato [As(V)]

e o arsenito [As(III)] (Zhu et al., 2014). Em condições naturais no solo, o As apresenta diferentes formas e estados oxidativos, sendo esses influenciados pelo comportamento da fase no qual ele se encontra (De Andrade et al., 2008), e por condições abióticas como pH e condutividade elétrica (P. Wang et al., 2014). No Brasil, a contaminação por As é conhecida em locais específicos. Na região sudeste, por exemplo, destaca-se o Quadrilátero Ferrífero, onde grandes quantidades de As foram lançadas em drenagens, solos e atmosfera, como resultado da mineração de ouro que vem ocorrendo nos últimos três séculos (Figueiredo et al., 2007; Obuekwe et al., 2019). Adicionalmente, contaminação por As também é observada na região amazônica, onde o As está associado aos minérios de manganês extraídos nos últimos 50 anos (Figueiredo et al., 2007).

As cianobactérias, como mencionado acima, podem habitar vários ambientes, incluindo aqueles contaminados com As, como por exemplo, corpos de água doce, que servem de efluentes de resíduos de mineração (Obuekwe et al., 2019). Além disso, sabe-se que esses microrganismos também participam de etapas do ciclo biogeoquímico desse elemento (Yang et al., 2018). Ao longo do processo evolutivo, as cianobactérias desenvolveram diversas estratégias de resistência e tolerância a esse elemento, incluindo mais comumente a oxidação ou metilação de arsenito [As(III)] em espécies menos tóxicas, bem como a extrusão ativa desta forma da célula (Achour et al., 2007). Diversos registros de cianobactérias isoladas de ambientes contaminados existem na literatura, como *Synechocystis*, *Synechococcus* (Miyashita et al., 2016a), *Oscillatoria* (Kulp et al., 2008), *Tolypothrix* (Susana G. Ferrari et al., 2013), *Phormidium*, *Anabaena* (Bhattacharya and Pal, 2011), *Pseudanabaena*, *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Kamptonema*, *Anagnostidinema* (Çelekli and Lekesiz, 2021; Obuekwe et al., 2019), *Hydrocoleum*, *Microchaete* (Maeda et al., 1987), entre outros.

A presença desse metal no ambiente também impacta grandemente a utilização dos recursos contaminados, como água e solo, sendo as cianobactérias organismos capazes de lidar com esses contaminantes, e até, metaboliza-los (Miyashita et al., 2016a). Como já demonstrado por alguns trabalhos, as cianobactérias, além de suas comunidades microbianas associadas, possuem uma capacidade de não só crescer na presença do As, mas de oxidar, metilar e volatilizar esse elemento, diminuindo sua concentração efetiva no solo (Mestrot et al., 2011; Yin et al., 2011; Zanganeh et al., 2021).

Em cianobactérias, alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, bem como genômicas (expressão e regulação) e proteômicas estão envolvidas na resposta ao estresse por As (Huertas et al., 2014; Pandey et al., 2013; Srivastava et al., 2009). Além disso, várias cianobactérias mostraram ser capazes de acumular e resistir ao As por meio de múltiplas biotransformações deste elemento (Huang et al., 2012; Wang et al., 2013). Por exemplo, em *Synechocystis* sp. PC6803, que é a linhagem de cianobactéria mais bem caracterizada quanto à resistência e metabolismo do As, o operon *ars* (*arsBHC*) responde pelo principal mecanismo de resistência ao arsênio (Huertas et al., 2014).

O estudo de linhagens diversas de cianobactérias pode ajudar a elucidar alguns processos, e também desvendar novos mecanismos de tolerância relacionados a essa resistência/tolerância diferencial. Sendo assim, o entendimento sobre os processos de metabolização e resistência à contaminantes pode ser extremamente importante para o desenvolvimento científico. Entender quais estratégias permitem esses organismos tolerar concentrações altas de arsênio, assim como suas diferenças que permitem tolerar de forma diferencial o As, pode permitir o desenvolvimento de diversas aplicações tecnológicas, a partir do entendimento desses processos em métodos biorremediadores (Chen et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

- Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P., 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.006>
- ANAGNOSTIDIS, K., Anagnostidis, Konstantinos; Komárek, J., 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes I-Introduction. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 38, 327–472. <https://doi.org/10.1214/09-aoas284>
- Bhattacharya, P., Pal, R., 2011. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *J. Appl. Phycol.* 23, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9617-4>
- Çelekli, A., Lekesiz, Ö., 2021. Limno-ecological assessment of lentic ecosystems in the western Mediterranean basin (Turkey) using phytoplankton indices. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 3719–3736. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10697-0>
- Chen, J., Sun, G.X., Wang, X.X., Lorenzo, V. De, Rosen, B.P., Zhu, Y.G., 2014. Volatilization of arsenic from polluted soil by *Pseudomonas putida* engineered for expression of the *arsM* arsenic(III) S-adenosine methyltransferase gene. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10337–10344. <https://doi.org/10.1021/es502230b>
- de Alvarenga, L.V., Vieira Vaz, M.G.M., Genuário, D.B., Esteves-Ferreira, A.A., Almeida, A.V.M., de Castro, N.V., Lizieri, C., Souza, J.J.L.L., Schaefer, C.E.G.R., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., 2018. Extending the ecological distribution of *Desmonostoc* genus: Proposal of *Desmonostoc salinum* sp. nov., a novel Cyanobacteria from a saline–alkaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 2770–2782. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002878>
- De Andrade, R.P., Santana Filho, S., De Mello, J.W.V., De Figueiredo, B.R., Dussin, T.M., 2008. Arsenic mobilization from sulfidic materials from gold mines in Minas Gerais State. *Quim. Nova* 31, 1127–1130. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500037>
- Esteves-Ferreira, A.A., Cavalcanti, J.H.F., Vaz, M.G.M.V., Alvarenga, L. V., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., 2017. Cyanobacterial nitrogenases: Phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. *Genet. Mol. Biol.* 40, 261–275. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0050>
- Ferrari, S.G., Silva, P.G., González, D.M., Navoni, J.A., Silva, H.J., 2013. Tolerancia a arsénico de cianobacterias con usos biotecnológicos. *Rev. Argent. Microbiol.* 45, 174–179. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70021-X)
- Figueiredo, B.R., Borba, R.P., Angélica, R.S., 2007. Arsenic occurrence in Brazil and

- human exposure. *Environ. Geochem. Health* 29, 109–118.  
<https://doi.org/10.1007/s10653-006-9074-9>
- Flores, E., Herrero, A., 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39–50.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2242>
- Huang, H., Zhu, Y., Chen, Z., Yin, X., Sun, G., 2012. Arsenic mobilization and speciation during iron plaque decomposition in a paddy soil. *J. Soils Sediments* 12, 402–410. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0461-1>
- Huertas, M., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A., Florencio, F., 2014. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms. *Life* 4, 865–886. <https://doi.org/10.3390/life4040865>
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of cyano-bacteria 4. Nostocales. *Arch Hydrobiol Algal Stud* 56, 247–345.
- Komárek, J., Kaštovský, J., 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 109, 305–325. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0305>
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86, 295–335.
- Kulp, T.R., Hoefft, S.E., Asao, M., Madigan, M.T., Hollibaugh, J.T., Fisher, J.C., Stolz, J.F., Culbertson, C.W., Miller, L.G., Oremland, R.S., 2008. Arsenic(III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science* (80-. ). 321, 967–970. <https://doi.org/10.1126/science.1160799>
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L., Blankenship, R.E., 2013. Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* (80-. ). 342, 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.1242321>
- Maeda, S., Wada, H., Kumeda, K., Onoue, M., Ohki, A., Higashi, S., Takeshita, T., 1987. Methylation of inorganic arsenic by arsenic-tolerant freshwater algae. *Appl. Organomet. Chem.* 1, 465–472. <https://doi.org/10.1002/aoc.590010512>
- Meeks, J.C., Campbell, E.L., Summers, M.L., Wong, F.C., 2002. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch. Microbiol.* 178, 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0476-5>
- Mestrot, A., Feldmann, J., Krupp, E.M., Hossain, M.S., Roman-Ross, G., Meharg, A.A.,

2011. Field fluxes and speciation of arsines emanating from soils. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1798–1804. <https://doi.org/10.1021/es103463d>
- Miyashita, S.I., Murota, C., Kondo, K., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., 2016. Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.* 13, 577–589. <https://doi.org/10.1071/EN15071>
- Mullineaux, C.W., 2008. Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 95, 175–182. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9249-y>
- Obuekwe, I.S., Vaz, M.G.M.V.M. V., Genuário, D.B., Castro, N.V. de, Almeida, A.V.M.M., Veloso, R.W., Pinto, G.N., Alvarenga, L. V., Mello, J. V., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., 2019. Arsenic-contaminated sediment from mining areas as source of morphological and phylogenetic distinct cyanobacterial lineages. *Algal Res.* 42, 101589. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101589>
- Pandey, S., Shrivastava, A.K., Rai, R., Rai, L.C., 2013. Molecular characterization of Alr1105 a novel arsenate reductase of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 and decoding its role in abiotic stress management in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 83, 417–432. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0100-x>
- Postgate, J.R., 1982. Biology {Nitrogen} {Fixation}: {Fundamentals}. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 296, 375–385.
- Schirrmeister, B.E., De Vos, J.M., Antonelli, A., Bagheri, H.C., 2013. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1791–1796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209927110>
- Srivastava, A.K., Bhargava, P., Thapar, R., Rai, L.C., 2009. Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress. *J. Basic Microbiol.* 49, 63–72. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800301>
- Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D.A., Piccardi, R., Biondi, N., Tredici, M.R., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F., Wilmotte, A., 2006. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains. *J. Phycol.* 42, 1257–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x>
- Thurotte, A., Lopez-Igual, R., Wilson, A., Comolet, L., Bourcier de Carbon, C., Xiao, F., Kirilovsky, D., 2015. Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection. *Plant Physiol.* 169, 737–747. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00843>
- Vitousek, P.M., Howarth, R.W., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How

- can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115. <https://doi.org/10.1007/BF00002772>
- Wang, N.X., Li, Y., Deng, X.H., Miao, A.J., Ji, R., Yang, L.Y., 2013. Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes. *Water Res.* 47, 2497–2506. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.034>
- Wang, P., Sun, G., Jia, Y., Meharg, A.A., Zhu, Y., 2014. A review on completing arsenic biogeochemical cycle: Microbial volatilization of arsines in environment. *J. Environ. Sci. (China)* 26, 371–381. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60432-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60432-5)
- Xu, K., Jiang, H., Juneau, P., Qiu, B., 2012. Comparative studies on the photosynthetic responses of three freshwater phytoplankton species to temperature and light regimes. *J. Appl. Phycol.* 24, 1113–1122. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9741-9>
- Yang, Y.P., Zhang, H.M., Yuan, H.Y., Duan, G.L., Jin, D.C., Zhao, F.J., Zhu, Y.G., 2018. Microbe mediated arsenic release from iron minerals and arsenic methylation in rhizosphere controls arsenic fate in soil-rice system after straw incorporation. *Environ. Pollut.* 236, 598–608. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.099>
- Yin, X.-X.X.X., Chen, J., Qin, J., Sun, G.X.G.-X., Rosen, B.P., Zhu, Y.-G.Y.G., 2011. Biotransformation and Volatilization of Arsenic by Three Photosynthetic Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 156, 1631–1638. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178947>
- Zanganeh, F., Sepehr, A., Rohani, A., 2021. Bioaugmentation and Bioaugmentation-Assisted Phytoremediation of Heavy Metals Contaminated Soil By a Synergistic Effect of Cyanobacteria Inoculation, Biochar, and *Purtolaca Oleracea* 1–30.
- Zhang, C.C., Zhou, C.Z., Burnap, R.L., Peng, L., 2018. Carbon/Nitrogen Metabolic Balance: Lessons from Cyanobacteria. *Trends Plant Sci.* 23, 1116–1130. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.008>
- Zhu, Y.G., Yoshinaga, M., Zhao, F.J., Rosen, B.P., 2014. Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 443–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060313-054942>

## CAPÍTULO 1

### **TÍTULO: Caracterização de cianobactérias isoladas de ambientes salinos e contaminados por arsênio**

Allan Victor Martins Almeida<sup>1</sup>, Jean Coutinho Oder<sup>1</sup>, Thamires Emídio Sateles<sup>1</sup>,  
Wagner L. Araújo<sup>1\*</sup>, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz<sup>1#</sup>,

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Brazil.

#Current address: BCCM/ULC Culture Collection, InBios-Centre for Protein Engineering, University of Liège, Liège B-4000, Belgium.

\*Autor correspondente: Wagner L. Araújo

Departamento de Biologia Vegetal

Universidade Federal de Viçosa 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Telefone: +55-31-3612-5357 Email: [wlaraujo@ufv.br](mailto:wlaraujo@ufv.br)

## RESUMO

As cianobactérias são bactérias gram-negativas capazes de realizar fotossíntese oxigênica. Esses organismos são influenciados pela disponibilidade e qualidade da luz, e algumas espécies também são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio, tornando-as importantes para os ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio. Cianobactérias apresentam ainda uma grande variedade metabólica e fisiológica, o que permite que colonizem diversos habitats aquáticos e terrestres. A classificação taxonômica das cianobactérias tem sido revista e atualizada ao longo dos anos com base em análises genômicas e filogenéticas, culminando, atualmente, com a divisão deste grupo em 20 ordens distintas. O gênero *Synechocystis* constitui um grupo de cianobactérias unicelulares amplamente estudado, utilizado como modelo em várias áreas de pesquisa, como fotossíntese, evolução e biotecnologia. Entretanto, estudos filogenéticos mostram que o gênero, em sua descrição meramente morfológica, é polifilético. O gênero *Ancylothrix*, composto de linhagens filamentosas homocitadas, amplamente distribuído em termos geográficos, foi recentemente descrito a partir de linhagens morfológicamente relacionadas ao gênero *Phormidium*, e tem sido pouco estudado. Já o gênero *Trichormus*, que apresenta linhagens filamentosas heterocitadas, tem causado discussões taxonômicas devido ao seu caráter polifilético. Algumas espécies desse gênero já mostram origem filogenética diferente do grupo tipo, e estudos aprofundados são necessários para classificar adequadamente linhagens morfológicamente identificadas como pertencentes a este gênero. A classificação precisa das cianobactérias é essencial para compreender seus papéis nos ecossistemas aquáticos e terrestres, bem como para avaliar os riscos associados a diferentes espécies, algumas das quais podem produzir toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Estudos mais aprofundados são necessários para entender a diversidade, ecologia e biologia dessas cianobactérias e explorar seu potencial biotecnológico para diversas aplicações. O presente trabalho buscou, portanto, caracterizar, em uma abordagem polifásica, linhagens morfológicamente e ecologicamente distintas, derivadas de ambientes hostis. A linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 demonstra diferenças substanciais em caráter filogenético, assim como seus dobramentos da estrutura secundária da região do ITS quando se comparada a outras linhagens próximas. Os dados obtidos aqui para a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 mostram que esse indivíduo tem características suficientes para sua classificação como *A. terrestris* CCM-UFV034. Seus padrões de dobramento da região ITS caem dentro do padrão esperado para linhagens dessa espécie, além de uma posição filogenética que corrobora com essa classificação. Esse trabalho também mostra que linhagens desse gênero podem habitar locais contaminados com arsênio, possuindo provavelmente mecanismos capazes de mitigar a exposição e o dano causado por esse elemento, e ampliam a diversidade ecológica desse gênero. Por outro lado, os resultados para a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 indicam que essa linhagem possui diferenças suficientes para uma classificação ao nível de espécie diferente das espécies já descritas dentro do gênero *Trichormus*, mesmo com uma % de identidade do 16S de 99,50% em relação à espécie *T. variabilis* (AJ630456). Nesse contexto, é proposto que a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 seja denominada *T. flavodiazotum* sp. nov. CCM-UFV035. É importante ressaltar que linhagens aqui descritas e caracterizadas apresentam um enorme potencial para estudos futuros, principalmente devido ao seu habitat de isolamento, abrindo possibilidades para a descoberta de novos mecanismos de tolerância a estresses abióticos. Com efeito, a caracterização dessas linhagens contribuiu significativamente para o avanço do conhecimento da biodiversidade

encontrada em países tropicais. Compreender a diversidade microbiana presente nesses ambientes é, portanto, essencial para a conservação e para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável desses ecossistemas.

**Palavras chave:** Cianobactérias, filogenia, taxonomia, *Synechocystis*, *Ancylothrix*, *Trichormus*, ambientes hostis.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are gram-negative bacteria capable of performing oxygenic photosynthesis. They exhibit a wide metabolic and physiological diversity, enabling them to colonize aquatic and terrestrial habitats. These organisms are influenced by the availability and quality of light, and some species are able to biologically fix nitrogen, making them important in the carbon and nitrogen biogeochemical cycles. The taxonomic classification of cyanobacteria has been revised and updated over the years based on genomic, phylogenetic, and molecular analyses. Currently, they can be divided into 20 distinct orders. The genus *Synechocystis* is a well-studied group of cyanobacteria, used as a model in various research fields such as photosynthesis, evolution, and biotechnology. However, phylogenetic studies have shown that the genus is paraphyletic. The genus *Ancylothrix*, composed of filamentous homocytous strains, has been recently described and is not extensively studied. It consists of species distributed in various continents. On the other hand, the genus *Trichormus*, comprising filamentous heterocytous strains, has caused taxonomic discussions due to its paraphyletic nature. Some species within this genus have shown a different phylogenetic origin from the type group, requiring further in-depth studies for accurate classification of these strains. Accurate classification of cyanobacteria is essential to understand their roles in aquatic and terrestrial ecosystems and to assess risks associated with different species, some of which may produce toxins harmful to human and animal health. More profound studies are necessary to comprehend the diversity, ecology, and biology of these cyanobacteria and to explore their biotechnological potential for various applications. This study aimed to characterize morphologically and ecologically distinct strains derived from hostile environments using a polyphasic approach. The *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 strains demonstrates substantial differences in phylogenetic character, as well as in the secondary structure folding of the ITS region compared to other closely related strains. Data obtained for the *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 strain show that this individual possesses sufficient characteristics for its classification as *Ancylothrix terrestris* CCM-UFV034. The ITS region folding patterns fall within the expected range for strains of this species, further corroborating this classification. This work also reveals that strains of this genus can inhabit arsenic-contaminated locations, likely possessing mechanisms to mitigate exposure and damage caused by this element. On the other hand, the results for the *Trichormus* sp. CCM-UFV035 strain indicate that it exhibits sufficient differences for classification at the species level, distinct from the species already described within the *Trichormus* genus. In this context, it is proposed that the *Trichormus* sp. CCM-UFV035 strain be named *Trichormus flavodiazotum* CCM-UFV035. It is essential to highlight that the described and characterized strains hold significant potential for future studies, especially due to their hostile habitat, offering possibilities for the discovery of new mechanisms of abiotic stress tolerance. In effect, characterizing these native strains significantly contributes to advancing knowledge of biodiversity found in tropical countries. Understanding the microbial diversity present in these environments is, therefore, crucial for conservation and the development of sustainable management strategies for these ecosystems.

**Keywords:** Cyanobacteria, filogeny, taxonomy, *Synechocystis*, *Ancylothrix*, *Trichormus*, hostile environments.

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são bactérias gram-negativas que realizam fotossíntese oxigênica e apresentam uma grande diversidade metabólica e fisiológica, permitindo-as colonizar uma variedade de habitats aquáticos e terrestres (Komárek & Kaštovský, 2003). Com efeito, as cianobactérias são afetadas pela disponibilidade e qualidade de luz (A. K. Singh et al., 2009). Além disso, várias espécies de cianobactéria são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio (FBN), tornando-as importantes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio (Esteves-Ferreira et al., 2017; Postgate, 1982). Morfologicamente, as cianobactérias são divididas em unicelulares, filamentosas homocitadas e filamentosas heterocitadas (Anagnostidis, 1985). As unicelulares podem ainda ser divididas em solitárias e coloniais, e as filamentosas heterocitadas, em ramificadas e não ramificadas (Rippka et al., 1979). Além disso, as linhagens filamentosas ramificadas ainda podem apresentar variações quanto às ramificações de acordo com o plano de divisão celular, sendo denominadas do tipo verdadeiro ou falso (pseudo-ramificação)(Gugger & Hoffmann, 2004).

Estudos taxonômicos mais recentes, no entanto, têm demonstrado que essa classificação/separação, baseada em critérios morfológicos, não se suporta quando analisada em um contexto filogenético/evolutivo (Hammerschmidt et al., 2021; Komárek et al., 2014). Em 2014, Komárek et al. conduziram uma importante revisão taxonômica do sistema de classificação de cianobactérias, abrangendo níveis hierárquicos de ordens e famílias. Essa revisão combinou clados/grupos/gêneros tradicionais com outros descritos recentemente, utilizando uma abordagem polifásica e envolveu também análises genômicas e filogenéticas. No entanto, na época, a cobertura dessas análises era relativamente limitada. Desde então, novos dados de genomas e sequências de alta qualidade se tornaram disponíveis, permitindo uma melhor compreensão das relações evolutivas entre esses organismos. Recentemente, novas perspectivas para esse assunto foram adicionadas, considerando dados de filogenia molecular, principalmente reconstruções baseadas no rRNA 16S e análises de genomas completos (Strunecký et al., 2022). Com base nesses dados, as cianobactérias podem ser divididas, atualmente, em 20 ordens distintas.

Strunecký et al., 2022 reforça a classificação de várias ordens já reconhecidas na literatura, incluindo Gloeobacterales (Cavalier-Smith, 2002), Chroococcales (Schaffner, 1922) e Chroococciopsidales (Komárek et al. 2014), com organismos unicelulares, Oscillatoriales (Schaffner, 1922), Pseudanabaenales (Komárek e

Anagnostidis, 1988), Synechococcales (Hoffmann et al. 2005) e Spirulinales (Komárek et al. 2014) com organismos tanto de morfotipo unicelular quanto filamentosos homocitados, e a ordem Nostocales (Borzi, 1914) com organismos unicamente filamentosos heterocitados. Além disso, duas novas ordens tiveram, nesse trabalho, sua classificação reforçada, Thermostichales (Komárek and Strunecký 2020), e Gloeomargaritales (Moreira et al. 2017), ambas com organismos unicelulares originários de ramos evolutivos mais basais. A revisão taxonômica de Strunecký et al., 2022 propõe ainda 10 novas ordens de cianobactérias, com o objetivo de agrupá-las em grupos monofiléticos e esclarecer algumas das relações evolutivas em clados hierárquicos superiores. Algumas dessas novas ordens incluem apenas um organismo representante, como Prochlorotrichales (*Prochlorothrix*) e Aegeococcales (*Aegeococcus*), enquanto outras atualizam a taxonomia e a nomenclatura de alguns grupos procariotos (Hugenholtz et al., 2021; Oren et al., 2022) e gêneros já descritos, que apresentavam uma resolução taxonômica em clados hierárquicos superiores pouco definida. É importante ressaltar que diversos gêneros ainda estão alocados provisoriamente em certas famílias, requerendo a necessidade de uma sistemática mais aprofundada (Strunecký et al., 2022). No entanto, essas novas ordens representam importantes avanços na classificação de cianobactérias, e ajudam a entender melhor a diversidade e evolução deste grupo.

Dentre as linhagens unicelulares, o gênero *Synechocystis* é um grupo de cianobactérias amplamente estudado, e possui uma grande importância em diversas áreas de pesquisa (Blanc-Garin et al., 2022; Muro-Pastor et al., 2005; Varman et al., 2013). (Guiry & Guiry, 2020; Jeong et al., 2021). Indivíduos desse gênero têm sido utilizados como modelos em estudos de fotossíntese (Yu et al., 2013), evolução, biotecnologia e biologia sintética (Liu & Pakrasi, 2018), tornando-se um clado de grande interesse científico. Essas cianobactérias são cosmopolitas, habitando locais tanto de água doce quanto salgada, além de ambientes terrestres. Filogeneticamente, *Synechocystis* pertence à ordem Chroococcales e à família Microcystaceae (Strunecký et al., 2022)

Os estudos filogenéticos moleculares indicam que o gênero *Synechocystis* é um grupo polifilético, composto por espécies distribuídas em diversos clados distintos. Atualmente, o cluster típico do gênero é designado como *Synechocystis* (Sauv. 1892), tendo *S. Aquatilis* como espécie-tipo, *Synechocystis* sp. PCC6803 como linhagem de referência (Komárek, 2010b; Korelusova et al., 2009). A utilização da sequência dessa

linhagem vem do fato de a linhagem tipo do gênero *Synechocystis* (*S. aquatilis*) não possuir sua sequência disponível. Com isso, a literatura adotou a sequência da linhagem modelo PCC6803 como referência do gênero, porém, não sendo o indivíduo holótipo do grupo (Komárek, 2010b). É importante ressaltar que, embora a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 seja um organismo de extrema importância para pesquisas em geral, esta linhagem nunca foi definida taxonomicamente ao nível de espécie (Juteršek et al., 2017). Com efeito, outros clados formados nas reconstruções filogenéticas com presença de sequências classificadas como *Synechocystis* em outros agrupamentos que não o tipo vem sendo revisadas, gerando a descrição de novos gêneros, como *Geminocystis* (Korelusova et al., 2009) e *Geminobacterium* (Brito et al., 2017). A compreensão da filogenia do gênero *Synechocystis* é importante para entender a diversidade genética e biológica dessas cianobactérias e seu papel nos ecossistemas aquáticos e suas diversas aplicações na pesquisa e biotecnologia. Junto a isso, a caracterização e estudo de cianobactérias nativas desse gênero mostra-se de importância na descoberta de mecanismos fisiológicos e moleculares, que podem ou não estar relacionados à posição filogenética dessa linhagem.

Já dentre as linhagens filamentosas homocitadas, podemos destacar aqui o gênero *Ancylothrix*. Sua descrição é recente (Martins et al., 2016) e poucos estudos foram realizados com indivíduos desse gênero, e além disso, apresenta, desde sua descrição, um caráter monofilético. É um gênero pertencente à ordem Oscillatoriales (Schaffner 1922) e à família Microcoleaceae (Komárek et al. 2014). O gênero *Ancylothrix* deriva de linhagens antes classificadas a nível de família como Phormidiaceae, possuindo uma morfologia similar a organismos desse grupo. Apenas duas espécies foram descritas até o momento, e são identificadas como *A. terrestris* e *A. rivularis* (Martins et al., 2016), em referência aos habitats desses indivíduos. Esse gênero possui como uma característica morfológica diacrítica a presença de uma curvatura na célula apical. Em relação aos caracteres ecológicos desse gênero, temos a presença de indivíduos isolados no Brasil, originalmente habitando solos, superfícies de árvore e corpos de água doce (Martins et al., 2016). Novas sequências classificadas como *Ancylothrix* vem sendo depositadas nos bancos de sequências genéticas, com origem em países como Portugal e Iraque, mostrando que essa linhagem também possui distribuição em outros continentes.

Em se tratando das linhagens heterocitadas, destaca-se o gênero *Trichormus*. Esse gênero foi pouco abordado em virtude da sua diversidade e dos indivíduos que

o compõe, pois seu caráter polifilético na descrição trouxe e traz muita discussão em torno das relações filogenéticas entre esses organismos (Komárek, 2010a; Rajaniemi et al., 2005). Especificamente, indivíduos dos gêneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Trichormus* entre outros (Nostocaceae), foram, a princípio, classificados morfologicamente em clados hoje observados como parafiléticos. Diversas espécies classificadas morfologicamente como *Trichormus* (e.g. *T. azollae* e *T. dolium*) já mostram uma origem filogenética diferente do grupo tipo (contendo a espécie *T. variabilis* (Rajaniemi et al., 2005). Autores que abordaram esse clado, e tentaram classificar a partir de uma abordagem polifásica esses indivíduos, trazem o grupo tipo de *Trichormus* dentro do clado que contém as sequências referências *T. variabilis* HINDAK (AJ630456) e *T. variabilis* GREIFSWALD (AJ630457) (Choi et al., 2012; Komárek, 2010a; Rajaniemi et al., 2005). Mesmo após o aprimoramento das técnicas de taxonomia e sistemática, linhagens classificadas como *Trichormus* que não estão no clado tipo ainda não possuem uma identificação mais apropriada, se tratando da descrição de novos gêneros a partir de linhagens *Trichormus-like*.

Tendo em vista as informações apresentadas acima, a classificação precisa de cianobactérias nativas e de ambientes pouco explorados é essencial para compreendermos os papéis desses organismos nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Ademais, tal classificação pode ajudar a avaliar os riscos associados a diferentes tipos de cianobactérias em ambientes distintos. Como algumas espécies podem produzir toxinas prejudiciais à saúde humana e animal, essa classificação pode ainda orientar ações de controle e prevenção. Neste contexto, estudos mais aprofundados são necessários para entender a diversidade, a ecologia e a biologia dessas cianobactérias, bem como seu potencial biotecnológico para diversas aplicações. O presente trabalho buscou, portanto, caracterizar, em uma abordagem polifásica, linhagens morfologicamente e ecologicamente distintas, derivadas de ambientes hostis. A caracterização dessas linhagens nativas contribui significativamente para o avanço do conhecimento da biodiversidade encontrada em países tropicais e subtropicais. Compreender a diversidade microbiana presente nesses ambientes é, portanto, essencial para a conservação e para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável desses ecossistemas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Seleção das linhagens

Três linhagens morfológica e ecologicamente distintas (Tabela 1), as quais estão mantidas na Coleção de Cianobactérias e Microalgas da Universidade Federal de Viçosa (CCM-UFV), foram selecionadas para este estudo. Essas linhagens foram previamente classificadas em três morfotipos: *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 (unicelular); *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 (filamentosa homocitada); e *Trichormus* sp. CCM-UFV035 (filamentosa heterocitada). As linhagens selecionadas foram então caracterizadas morfológica e filogeneticamente (com base em sequências do rRNA 16-23S).

### 2.2 Caracterização morfológica e morfométrica

Para caracterização morfológica, as linhagens foram crescidas em fotoperíodo 16/8h (claro/escuro), luminosidade de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 21 °C e agitação a 115 rpm. Durante a fase logarítmica (log) (culturas de 2 a 5 dias) foram coletados 2 mL de cultivo para observação em lâmina em microscópio ótico de luz (Microscópio Zeiss Axioskop 40). Também foram realizados registros fotomicrográficos (Sistema de imagem digital AxioVision LE 4.6) para as análises morfométricas, obtendo-se as dimensões celulares dos organismos analisados. Para os morfotipos unicelular e filamentoso homocitado foram medidos o diâmetro de células vegetativas (n=50), e para o morfotipo filamento heterocitado, para cada tipo celular, sendo essas célula vegetativa, heterócito e acinetos (n=20).

### 2.3 Extração do DNA genômico e amplificação do 16-23S rRNA.

A extração de DNA foi realizada a partir de 2 mL de biomassa coletada na fase log de crescimento. Para tal, foi utilizado o kit de Extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* [PROMEGA (A1125)], conforme descrição do fabricante. A amplificação da região do gene para o 16-23S rRNA foi realizada por PCR (Almeida et al., 2023).

### 2.4 Sequenciamento dos fragmentos obtidos nas PCR

Para sequenciamento dos fragmentos gênicos relativos às sequências do 16-23S rRNA, os produtos das amplificações do item 2.3 foram ligados em vetor plasmidial (*pGEM®-T Easy Vector*) de acordo com o fabricante, e transformados em

células competentes de *E. coli* Dh5 $\alpha$ . Posteriormente, a extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit StrataPrep Plasmid MiniPrep Kit (Agilent) e então enviados para sequenciamento pelo método de Sanger (ACTGene).

## 2.5 Reconstruções filogenéticas das linhagens em estudo

Foram realizadas reconstruções filogenéticas baseadas nas construções de árvores filogenéticas para cada uma das linhagens. Foram utilizados métodos diferentes para cada árvore de acordo com o *Best-Fit Model* (Tamura et al., 2021) sendo para a linhagem unicelular e heterocitada o método K2+G+I (Kimura, 1980), e para a linhagem homocitada o método GTR+G+I (Tavaré, 1986). Todas as árvores foram feitas com 1000 repetições amostrais (bootstrap=1000).

## 2.6 Dobramento da estrutura secundária da região ITS

Para ajudar a resolver o *status* infragenérico das linhagens em estudo, as regiões 16S-23S ITS foram usadas para dobramento das estruturas secundárias. As sequências completas do ITS 16S-23S de cada linhagem foram alinhadas e as regiões (D1–D1', D2, Box-B, V2 e V3) foram encontradas usando o software LocARNA-Alignment & Folding (Raden et al., 2018; Will et al., 2012, 2007), considerando suas sequências relativas mais próximas. Os genes de RNA de transferência (tRNA) foram encontrados usando o software tRNAscan-SE 2.0 (Lowe e Chan 2016). As estruturas secundárias (D1–D1, V2, Box-B e V3) foram dobradas usando o software Mfold WebServer com as condições padrão, exceto a aplicação de correção para o loop (*untangle loop fix*) (Zuker 2003).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Local de isolamento e dados ecológicos das linhagens *em estudo*

Considerando o local de amostragem (características ecológicas e geográficas), as linhagens aqui analisadas foram isoladas de ambientes relativamente hostis (Tabela 1). Para a linhagem unicelular, *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, sua origem geográfica é o lago salino-alcálico, Laguna Amarga, Torres del Paine National Park (50° 29' 00" S e 72°45' 00" W), Chile. Na amostragem, a temperatura da água era de cerca de 6 °C, e o valor de pH aproximadamente 9,5, com uma concentração de sódio de 28,77 g.L<sup>-1</sup> (equivalente a 1,25 M). As demais características físico-químicas e método utilizado para a quantificação desses parâmetros na amostragem foram previamente descritos (Alvarenga et al. 2018).

**Tabela 1.** Linhagens/Códigos, local de isolamento e porcentagem de identidade das sequências para o gene 16S rRNA de linhagens selecionadas, comparadas com aquelas depositadas no GenBank.

Linhagem	Local de isolamento (Localização)	Tamanho (pb)	Organismo mais relacionado no GenBank (número de acesso)	C(%)*	I(%)**			
<i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039	Superfície de rochas (Laguna Amarga- Torres Del Paine, Chile)	1457	<i>Synechocystis</i> sp. CHAB QH201702.1 (MT488061)	100	99.58			
			<i>Cyanobacterium</i> UTEX B 3003 (KP762345)	100	99.58			
			<i>Cyanobacterium</i> UTEX B 3001 (KP762344)	100	99.51			
			<i>Synechocystis</i> sp. CHAB QH201701 (MT488060)	100	99.44			
			<i>Cyanobacterium</i> UTEX B 3004 (KP762346)	100	99.44			
			<i>Synechocystis</i> sp. LEGE 06079 (HM217076)	99	98.72			
			<i>Synechocystis</i> sp. IPPAS B-1465 (CP028094)	100	98.03			
			<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (CP073017)	100	98.03			
			<i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034	Tanque de descarte de resíduos de arsênio (Viçosa-MG, Brasil)	1463	<i>Ancylothrix terrestris</i> 10PC (KT819199)	100	99.86
						<i>Ancylothrix terrestris</i> 11PC (KT819200)	100	99.86
<i>Ancylothrix</i> sp. WZU154 (OM237454)	100	99.86						
<i>Ancylothrix terrestris</i> 12PC (KT819201)	100	99.79						
<i>Ancylothrix terrestris</i> strain BEA0843B (ON803474)	99	99.79						
<i>Ancylothrix terrestris</i> 13PC (KT819202)	100	99.43						
<i>Ancylothrix rivularis</i> strain 8PC (KT819197)	100	95.83						

<i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035	Tanque de descarte de resíduos de arsênio (Viçosa-MG, Brasil)	1462	<i>Trichormus</i> sp. WUC1775 (ON685858)	96	100
			<i>Trichormus variabilis</i> HINDAK 2001/4 (AJ630456)	100	99.50
			<i>Anabaena</i> sp. Ms2 (HM573452)	100	99.29
			<i>Anabaena catenula</i> SAG 1403-1 (MK953012)	100	99.01
			<i>Anabaena</i> sp. KVSF7 (EU022720)	100	98.80
			<i>Trichormus variabilis</i> strain KCTC AG10180 (DQ234832)	100	98.80
			<i>Trichormus variabilis</i> GREIFSWALD (AJ630457)	100	98.80

C\*: cobertura, I\*\*: identidade.

Em relação às linhagens filamentosas, ambas, *Ancyllothrix* sp. CCM-UFV034 e *Trichormus* sp. CCM-UFV035, foram isoladas a partir de um tanque de descarte de resíduos de arsênio, localizado na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), DBV, na Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Os parâmetros físico-químicos desse ambiente não foram descritos no momento da amostragem.

### 3.2 Caracterização morfológica e morfométrica das linhagens em estudo

As características morfológicas apresentadas pelas linhagens estudadas estão descritas nas Figuras 1, 2 e 3, e na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características morfométricas das linhagens utilizadas neste estudo.

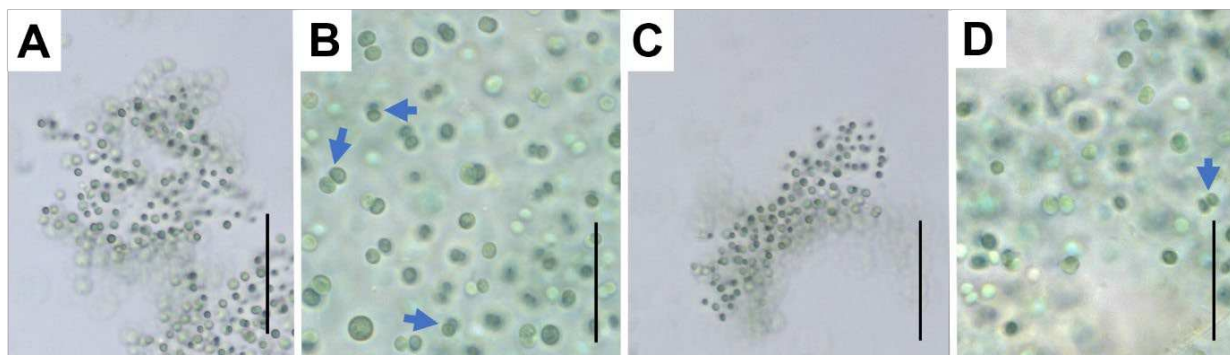
Linhagem	Célula vegetativa		Heterócito		Acineto	
	Média comprimento (desvio)	Média largura (desvio)	Média comprimento (desvio)	Média largura (desvio)	Média comprimento (desvio)	Média largura (desvio)
<i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039	2.55(±0.34)	-	-	-	-	-
<i>Ancyllothrix</i> sp. CCM-UFV034	2.10(±0.48)	4.08(±0.49)	-	-	-	-
<i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035	4.44(±0.52)	4.34(±0.40)	6.51(±0.65)	4.78(±0.65)	10.23(±1.07)	6.41(±0.58)

Todos os valores estão em µm. Pelo menos 50 réplicas foram usadas para células vegetativas e 20 para heterócitos e acinetos.

A linhagem unicelular *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresenta células arredondas a ovaladas (Figura 1), com diâmetro de  $2.55 \pm 0.34$  µm (Tabela 2). Nas observações, durante a fase logarítmica, as células dessa linhagem costumam se associar a uma matriz mucilaginosa, formando uma espécie de “microcolônia”, com uma baixa a média densidade celular (Figura 1A e 1C). Tais agregados celulares

possuem diâmetro de 5 a 40  $\mu\text{m}$ . As células dessa linhagem se dividem por fissão binária (Figura 1B e 1D) e foi observado nos registros microscópios que, após a divisão, algumas células se mantinham unidas pela mucilagem (setas azuis – Figura 1). A mucilagem foi também observada em células solitárias.

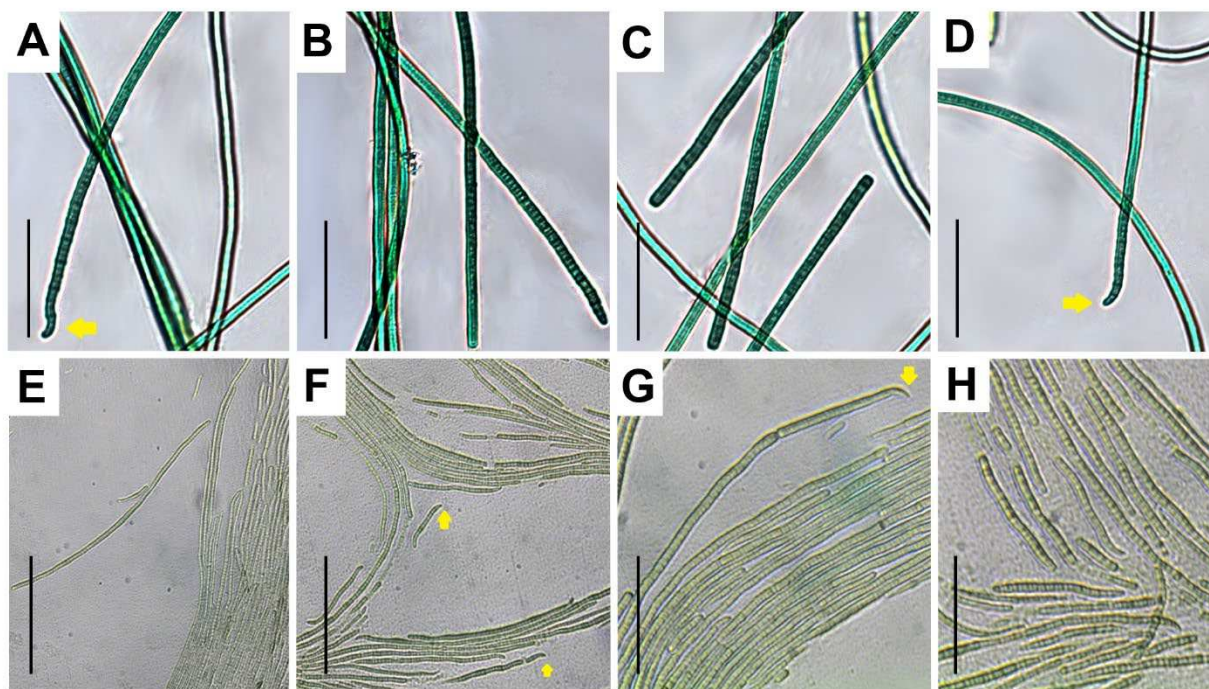
**Figura 1.** Prancha microfotográfica da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.



As escalas das figuras 1A e C representam 20  $\mu\text{m}$ , e as escalas 1B e D, 50  $\mu\text{m}$ . Setas azuis indicam células em divisão.

A linhagem filamentosa homocitada, *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, apresentou longos tricomas, com células achatadas (mais largas do que longas) e empilhadas (Figura 2) com comprimento de  $2.10 \pm 0.48 \mu\text{m}$  e largura de  $4.08 \pm 0.49 \mu\text{m}$ . Com efeito, a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 possui uma característica morfológica bem distinta, diacrítica do gênero *Ancylothrix*, que é a formação de uma curvatura na célula terminal do tricoma (Figura 2A, D, F e H, setas amarelas). Também foi observada uma alta motilidade nessa linhagem, com grande movimentação dos tricomas durante as observações. Os tricomas estão normalmente associados em emaranhados, paralelamente ou não (Figure 2G), com as pontas dos tricomas externas a esse emaranhado.

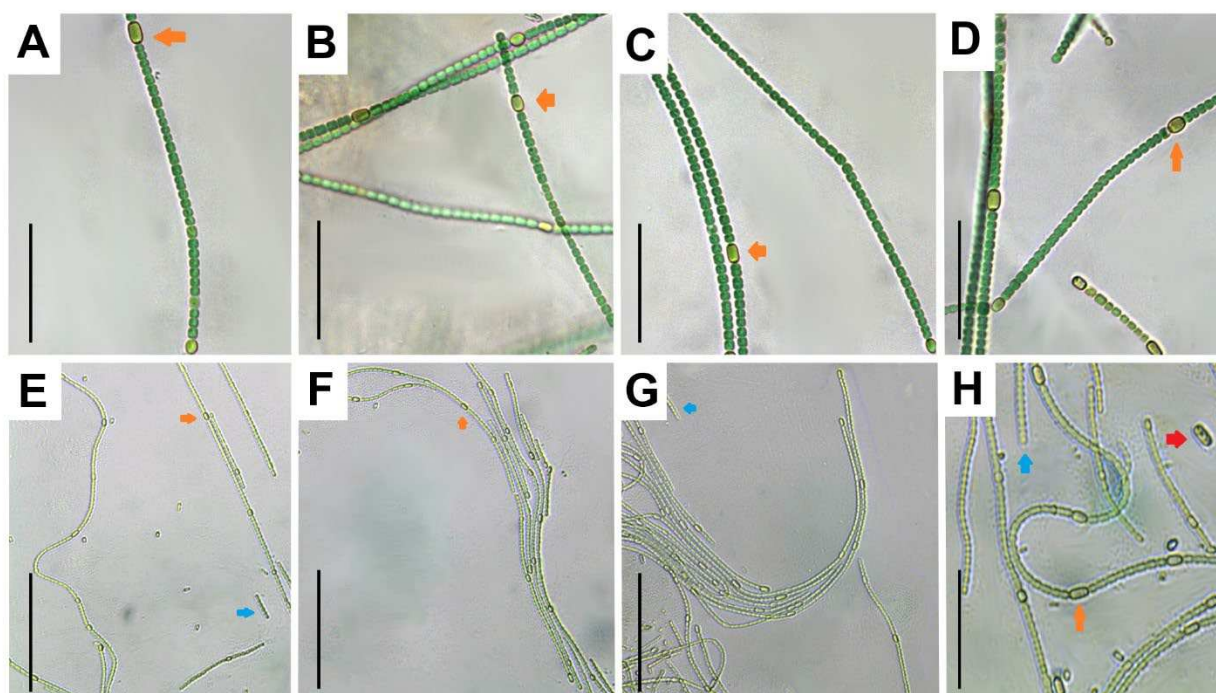
**Figura 2.** Prancha microfotográfica da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034.



As escalas das figuras 2A, B, C e D representam 20  $\mu\text{m}$ . As escalas 1E, F e G representam 80  $\mu\text{m}$  e a escala 1H, 40  $\mu\text{m}$ . As setas amarelas indicam as células terminais.

Para a linhagem heterocitada, *Trichormus* sp. CCM-UFV035, observamos um padrão típico descrito para o gênero *Trichormus*. É possível observar a formação de colônias, com agregados de tricomas. Suas células são mais compridas que largas, ovaladas e com as bordas arredondadas, em formato quadrático e possuem comprimento de  $4.44 \pm 0.52 \mu\text{m}$  e  $4.34 \pm 0.40 \mu\text{m}$  de largura (Tabela 2). Os heterócitos possuem uma cor amarelada, com comprimento de  $6.51 \pm 0.65 \mu\text{m}$  e  $4.78 \pm 0.65 \mu\text{m}$  de largura, sendo maiores que as células vegetativas. Apenas heterócitos terminais estão presentes nos tricomas vegetativos. Considerando os heterócitos, os terminais são diferenciados durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos tricomas (*early-log*), enquanto os heterócitos intercalares formados posteriormente. Hormogônios também foram observados, principalmente na fase logarítmica (Figura 3H). Os acinetos têm um comprimento de  $10.23 \pm 1.07 \mu\text{m}$  de largura de  $6.41 \pm 0.58 \mu\text{m}$ , sendo mais frequentes na fase estacionária e quase ausentes na fase logarítmica. O aspecto microscópico das colônias, formadas por um conjunto de tricomas emaranhados, é visível em todos os estágios de desenvolvimento (Figura 3G), porém mais presente nos estágios finais do crescimento.

**Figura 3.** Prancha microfotográfica da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035.



As escalas das figuras 2A, B, C e D representam 20  $\mu\text{m}$ . As escalas 1E e F representam 80  $\mu\text{m}$  e as escalas 1G e H, 40  $\mu\text{m}$ . As setas azuis, laranja e vermelhas indicam respectivamente os hormogônios, heterócitos e acinetos.

### 3.3 Caracterização filogenética das linhagens nativas em estudo

As sequências codificantes para o RNA ribossomal (rRNA) 16-23S recuperadas das linhagens *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e *Trichormus* sp. CCM-UFV035 apresentaram tamanho de 1852 a 2048 pb. Considerando apenas a região codante para a subunidade 16S, as sequências apresentam um tamanho entre 1457 e 1462 pb (Tabela 1). Foi possível recuperar e identificar não apenas a região da subunidade 16S rRNA, mas também a região para o *Internal Transcribed Spacer* (ITS). O tamanho da sequência codante para a região do ITS foi de 402 a 576 pb e o tamanho das suas regiões internas estão descritos na Tabela 3.

Devido a distância filogenética entre as linhagens aqui investigadas, foi realizada uma árvore filogenética com base na sequência do gene para o 16S rRNA para cada morfotipo aqui abordado, unicelular, homocitado e heterocitado. Além das sequências desse trabalho, foram utilizadas sequências obtidas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e que são próximas hierarquicamente (a nível de gênero, família e ordem) para construção da árvore filogenética.

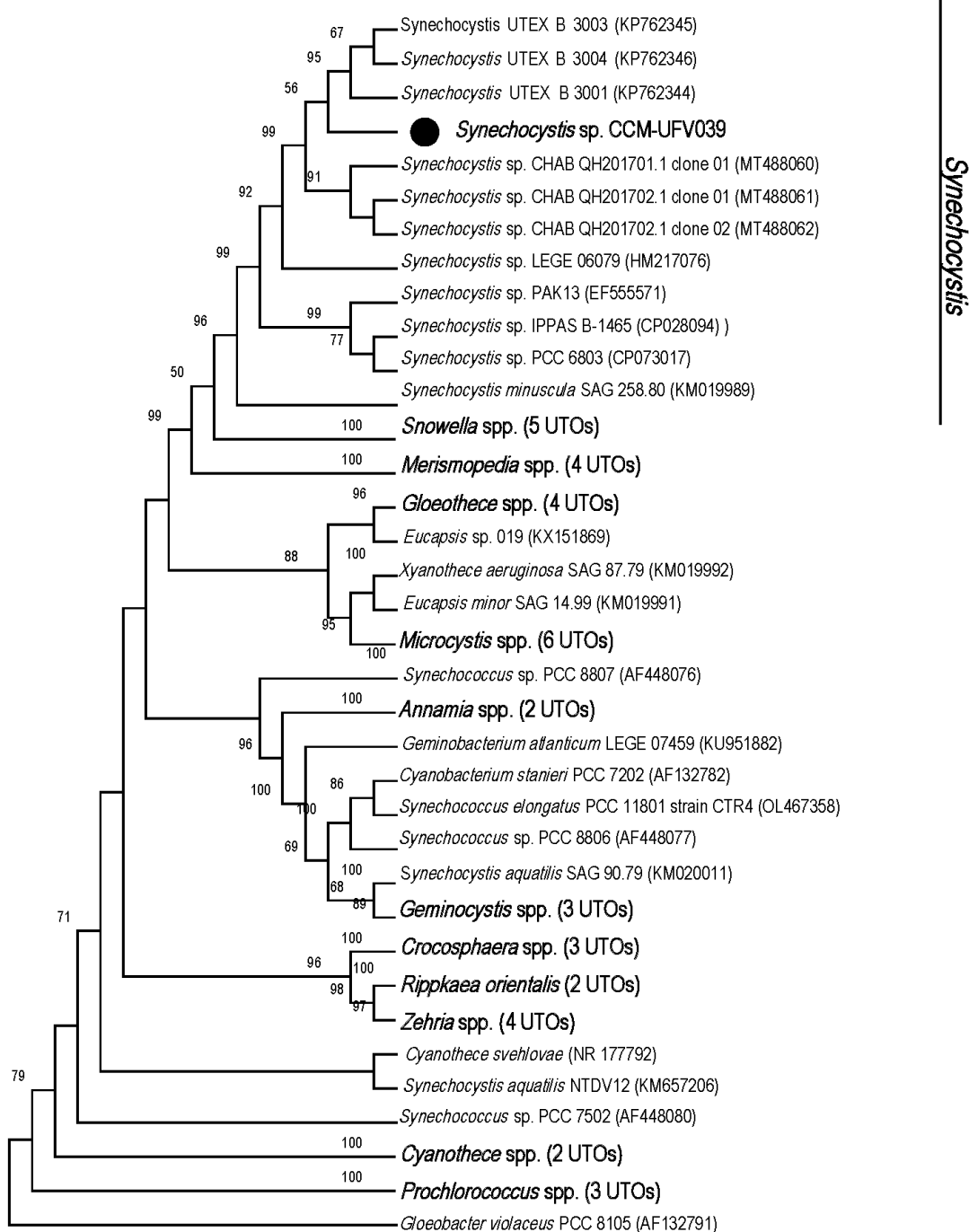
Linhagem	ITS completo (pb)	Tamanho das regiões do ITS 16S-23S (pb)							
		D1-D1'	tRNA <sup>Ile</sup>	V2	tRNA <sup>Ala</sup>	Box-B	Box-A	D4	V3
<i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039	553	64	74	-	-	34	11	6	98
<i>Ancylothrix</i> sp. CCM-UFV034	576	54	74	21	76	34	11	6	52
<i>Trichormus</i> sp. CCM-UFV035	402	65		-	-	25	11	6	91

**Tabela 3.** Tamanho da região 16S-23S ITS das linhagens em estudo.

### 3.3.1 A linhagem unicelular Chroococcales, *Synechocystis* sp. CCM-UFV039;

Na reconstrução filogenética para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, foi gerada uma matriz de 1487 pb, com 138 sequências (Figura 4). A topologia obtida mostra um posicionamento da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UV039 (MT708207) próximo de outras linhagens descritas genericamente como *Synechocystis* (Figura 4), em um cluster filogeneticamente robusto (96 bootstrap). Foi também possível observar que na nossa reconstrução, o grupo *Merismopedia/Synechocystis* está apresentado sendo possível separar as linhagens desses gêneros a partir das sequências do gene 16s rRNA disponíveis. O agrupamento descrito como *Snowella* também encontra-se evidente na nossa reconstrução, com uma relação mais próxima ao grupo *Synechocystis*.

**Figura 4.** Reconstrução filogenética com base em sequências do gene 16S rRNA. Nesta reconstrução ênfase foi dada para sequências obtidas de linhagens unicelulares, para melhor resolução do posicionamento da sequência da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.



Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada nas sequências do gene 16S rRNA de linhagens cianobactérias da ordem Chroococcales e outras ordens próximas filogeneticamente. A sequência recuperada da linhagem estudada está destacada em negrito com um círculo preto preenchido. Um teste de bootstrap envolvendo 1.000 reamostragens foi realizado e valores de bootstrap > 50% estão dispostos nos nós relevantes. O grupo de interesse está destacado com uma barra lateral.

A linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 é a linhagem referência do gênero *Synechocystis* (Komárková et al., 2010). A sequência obtida da linhagem CMM-UFV039 se agrupou próximo à sequência da linhagem de referência e dentro do grupo

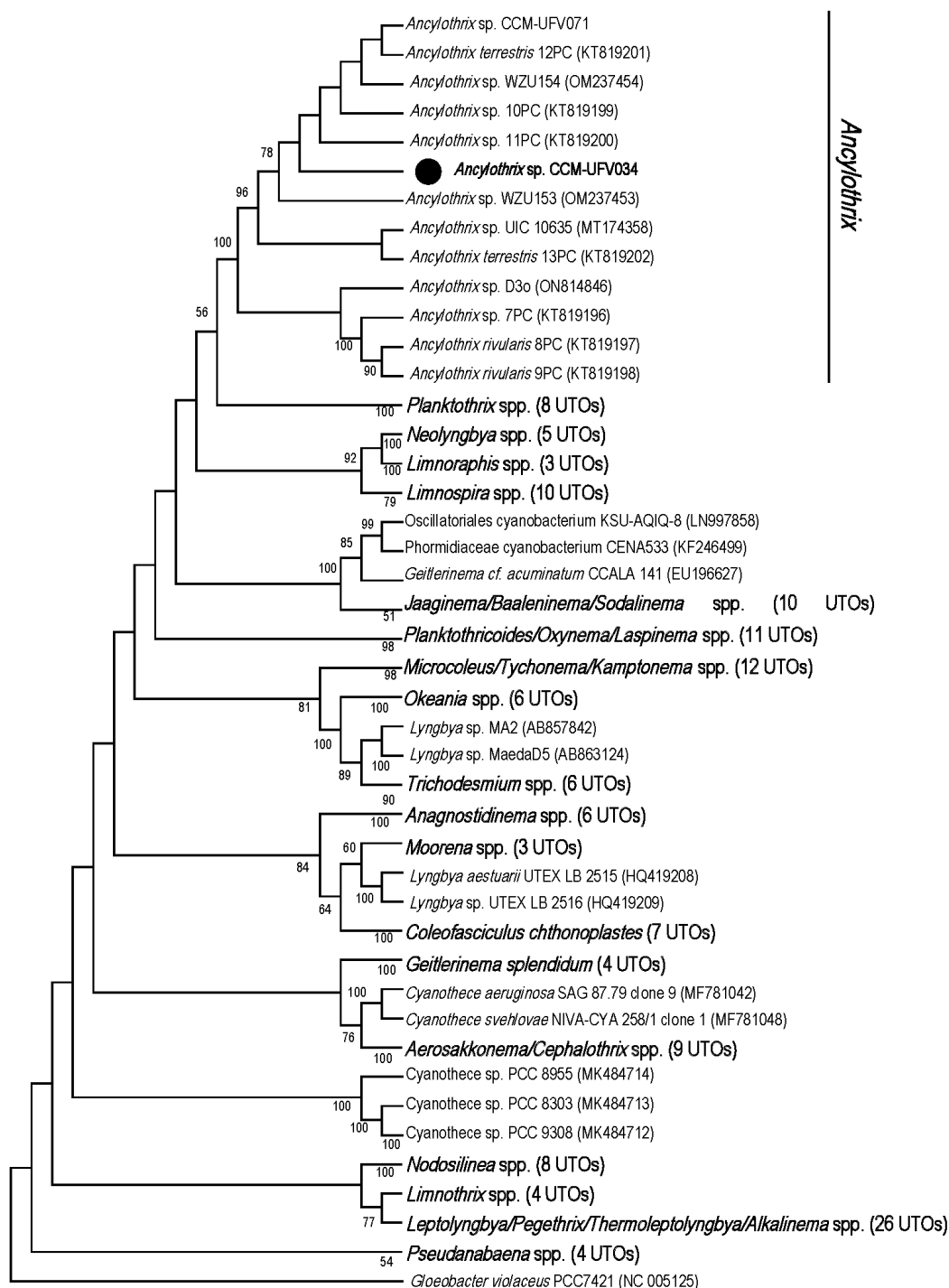
tipo para o gênero. Também podemos observar que a sequência da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 se agrupou, de forma mais próxima, a dois grupos de sequências classificadas como *Synechocystis* sp. UTEX B 3001,3003 e 3004, e às sequências *Synechocystis* sp. CHAB QH201701.1 e QH201702.1. Em relação aos valores de porcentagem de identidade (% ID) obtidos contra sequências derivadas dos bancos de dados, observa-se que as maiores correspondências se deram contra essas linhagens relacionadas na reconstrução filogenética, com valores entre 99,58% para sequência *Synechocystis* sp. CHAB QH201702.1 a 99,46% para sequência *Synechocystis* sp. QH201701.1 (Tabela 1). Em relação à sequência referência, *Synechocystis* sp. PCC6803, um valor de 98,03% de % ID foi obtido (Tabela 1).

É possível observar também a formação de outros grupos característicos da ordem Chroococcales, como os gêneros *Microcystis*, *Cyanobacterium*, *Zehria*, *Crocospaera* e *Geminocystis*. Se relacionando de uma forma mais próxima do grupo *Synechocystis/Merismopedia* (ambos da família Microcystaceae) (Figura 4), encontramos os clados que agrupam sequências do gênero *Gloeothoece*, *Microcystis* e *Eucapsis*, todos também da família Microcystaceae (Strunecký et al., 2022).

### **3.3.2 A linhagem homocitada, Oscillatoriales, *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034;**

Na reconstrução filogenética para a sequência da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, foi gerada uma matrix de 1527 nt. Essa reconstrução agrupou 175 sequências (Figura 5). A linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 se posicionou dentro do grupo monofilético descrito para o gênero *Ancylothrix* (Figura 5) (Martins et al., 2016), corroborando com a prévia identificação morfológica. Esse agrupamento genérico se formou com uma reamostragem (*bootstrap*) de 99 %, explicitando o caráter monofilético desse gênero. Cumpre registrar que dentro desse cluster foram descritas apenas duas espécies até o momento, *A. terrestris*, e *A. rivularis* (Martins et al., 2016). A sequência para o gene do 16S rRNA da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 se agrupou de forma mais próxima às sequências das linhagens *Ancylothrix* sp. WZU153 (OM237453), *Ancylothrix* sp. WZU154 (OM237454) e ao agrupamento contendo sequências de linhagens da espécie *A. terrestris* [*A. terrestris* 11PC (KT819200), *A. terrestris* 10PC (KT819199) e *A. terrestris* 12PC (KT819201)]. Além disso, se referindo às porcentagens de identidade (%ID), a sequência da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 apresentou valores de 99,79 a 99,86% contra as sequências descritas anteriores (Tabela 1).

**Figura 5.** Reconstrução filogenética com base em sequências do gene 16S rRNA. Nesta reconstrução ênfase foi dada para sequências obtidas de linhagens filamentosas homocitadas, para melhor resolução do posicionamento da sequência da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034.



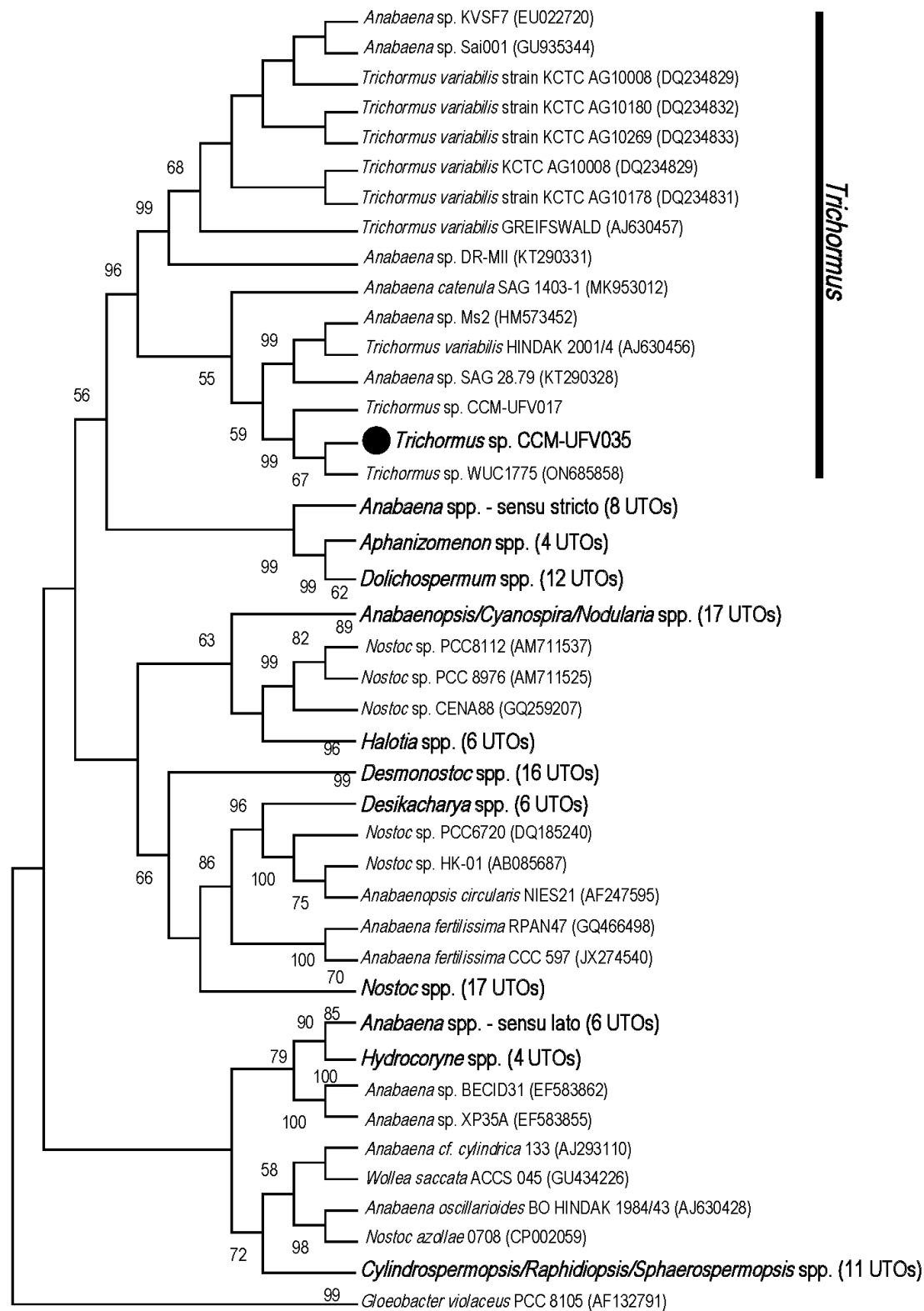
Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada nas sequências do gene 16S rRNA de linhagens cianobactérias da ordem Oscillatoriales e outras ordens próximas filogeneticamente. A sequência recuperada da linhagem estudada está destacada em negrito com um círculo preto preenchido. Um teste de bootstrap envolvendo 1.000 reamostragens foi realizado e valores de bootstrap > 50% estão dispostos nos nós relevantes. O grupo de interesse está destacado com uma barra lateral.

Como cluster mais próximo ao agrupamento *Ancylothrix*, se formou um agrupamento com sequências classificadas como *Planktothrix*, com uma amostragem de 54%. Como grupo irmão ao agrupamento *Ancylothrix/Planktothrix* foi possível observar um cluster com os gêneros *Neolyngbya*, *Limnoraphis* e *Limnospira*, todos pertencentes à ordem Oscillatoriales. Mais externo a esses dois grupos, observa-se a presença de um clado com sequências para linhagens do gênero *Baaleninema*, *Sodalinema* (Oscillatoriales) e *Jaaginema* (Leptolyngbyales). Esse último agrupamento se relacionou com 3 sequências, classificadas como Oscillatoriales cyanobacterium KSU-AQIQ-8 (LN997858), Phormidiaceae cyanobacterium CENA533 (KF246499) e *Geitlerinema cf. acuminatum* CCALA 141 (EU196627). Foi também observado na árvore a presença de outros diversos gêneros, de ordens como Leptolyngbyales (*Leptolyngbya*, *Alkalinema*) e Coleofasciculales (*Coleofasciculus*, *Moorena* e *Anagnostidinema*).

### **3.3.3 A linhagem heterocitada, Nostocales, *Trichormus* sp. CCM-UFV035;**

Na reconstrução filogenética baseada em sequências de 16S rRNA de membros da ordem Nostocales, para a avaliação do posicionamento da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035, foi gerada uma matrix de 1521 pb com 138 sequências (Figura 6). Essa reconstrução mostra a sequência dessa linhagem se agrupando com outras sequências derivadas dos gêneros *Trichormus* e *Anabaena* (Figura 6), também corroborando com a identificação morfológica. Esse grupo formado por sequências derivadas de linhagens do gênero *Trichormus* e *Anabaena* é descrito como o grupo tipo do gênero, no qual as sequências *T. variabilis* HINDAK 2001/4 e GREIFSWALD/92 são consideradas sequências referência para o gênero (Rajaniemi, Komárek, et al., 2005). Na reconstrução aqui obtida o grupo descrito como *Trichormus* se formou com uma reamostragem de 96 % (*bootstrap*).

**Figura 6.** Reconstrução filogenética com base em sequências do gene 16S rRNA. Nesta reconstrução ênfase foi dada para sequências obtidas de linhagens filamentosas heterocitadas, para melhor resolução do posicionamento da sequência da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035.



Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada nas sequências do gene 16S rRNA de linhagens cianobactérias da ordem Nostocales e outras ordens próximas filogeneticamente. A sequência recuperada da linhagem estudada está destacada

em negrito com um círculo preto preenchido. Um teste de bootstrap envolvendo 1.000 reamostragens foi realizado e valores de bootstrap > 50% estão dispostos nos nós relevantes. O grupo de interesse está destacado com uma barra lateral.

A sequência mais proximamente relacionada à sequência em estudo foi obtida da linhagem *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858). Também se relacionando de forma mais próxima dentro desse agrupamento para o gênero *Trichormus*, as sequências encontradas foram das linhagens *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012), *T. variabilis* HINDAK 2001/4 (AJ630456) e *Anabaena* sp. SAG 28.79 (KT290328). Ao se analisar os valores de %ID encontramos os maiores valores contra as sequências *T. variabilis* HINDAK 2001/4 (AJ630456), *Anabaena* sp. Ms2 (HM573452) e *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012), respectivamente 99,50%, 99,31% e 99,01%.

Como grupo mais próximo ao *Trichormus*, vemos a formação de um agrupamento com sequências classificadas nos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Dolichospermum*. Também é possível observar a formação de outros agrupamentos típicos da ordem Nostocales na reconstrução filogenética, como os gêneros *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Anabaena* e *Nodularia*.

### **3.4 Estrutura da região 16-23S ITS;**

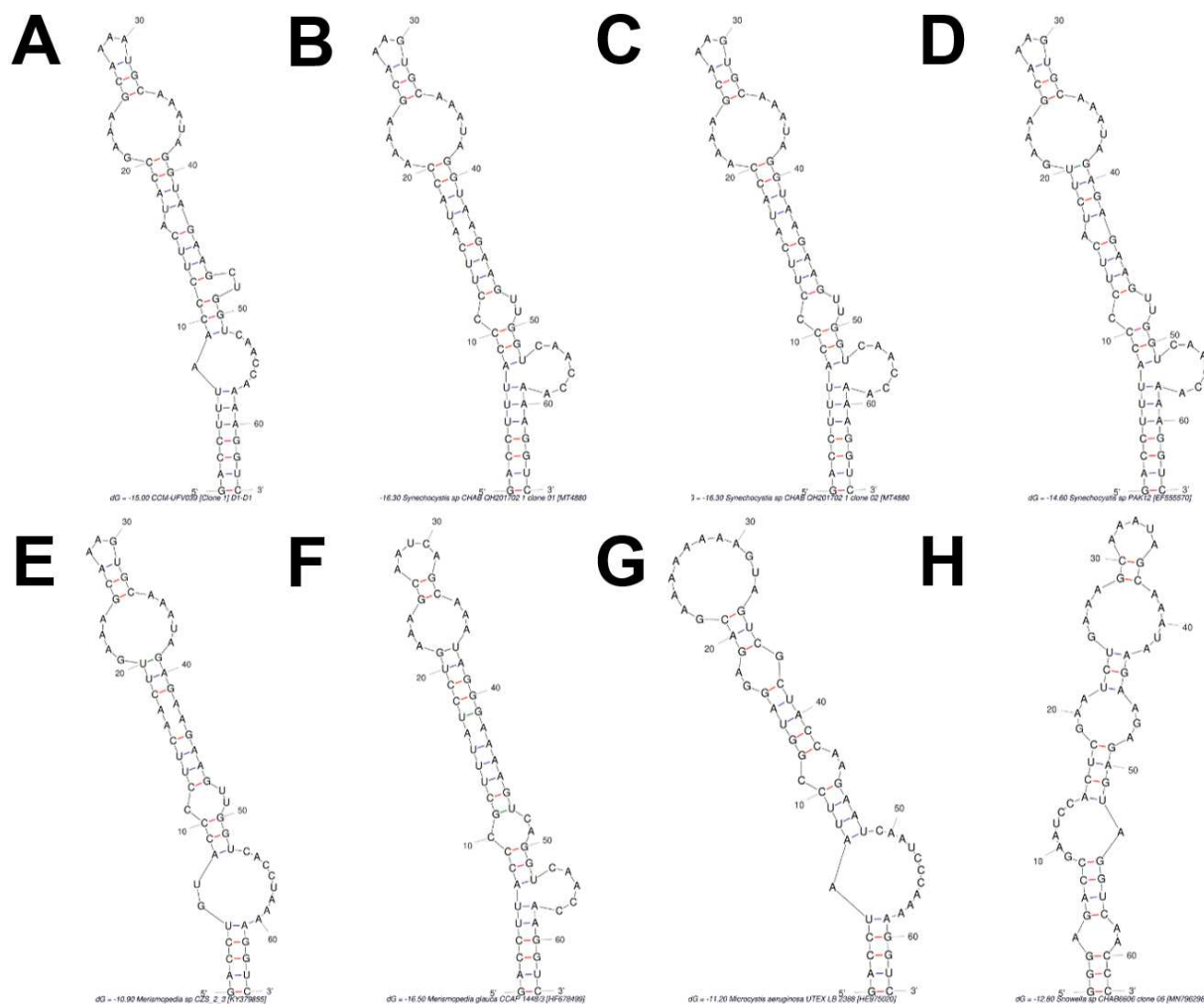
Todas as regiões internas do ITS foram identificadas (D1-D1', Box-B, V2, V3, D4, D5). O tRNA-Ile e Ala foram identificados apenas para linhagem *Ancyllothrix* sp. CCM-UFV034. No entanto, para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 não foi possível recuperar a região do tRNA Ala, nem a região separadora V2. Já para linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035, a região V2, assim como ambos tRNA não foram encontrados dentro da sequência 16S-23S ITS analisada. O tamanho de cada região interna do ITS das linhagens em estudo está descrito na Tabela 3 (página 40). Também foram realizados os dobramentos da estrutura secundária para as regiões D1-D1' e Box-B em todas as linhagens. A estrutura secundária das regiões internas do ITS das linhagens desse estudo foram então comparadas com as estruturas de linhagens próximas e disponíveis nos bancos de dados (NCBI).

#### **3.4.1 A linhagem unicelular, Chroococcales, *Synechocystis* sp. CCM-UFV039;**

O tamanho das regiões encontradas para as regiões do ITS dessa linhagem estão descritas na Tabela 3 (página 40). A estrutura secundária da região D1-D1' da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 mostra um dobramento com 5 bulbos, sendo um bulbo unilateral basal (1:6), um grande bulbo interno (4-5), um pequeno

bulbo unilateral terminal (5 nt), e dois pequenos bulbos, nas posições 17 e 47-48 (Figura 7A).

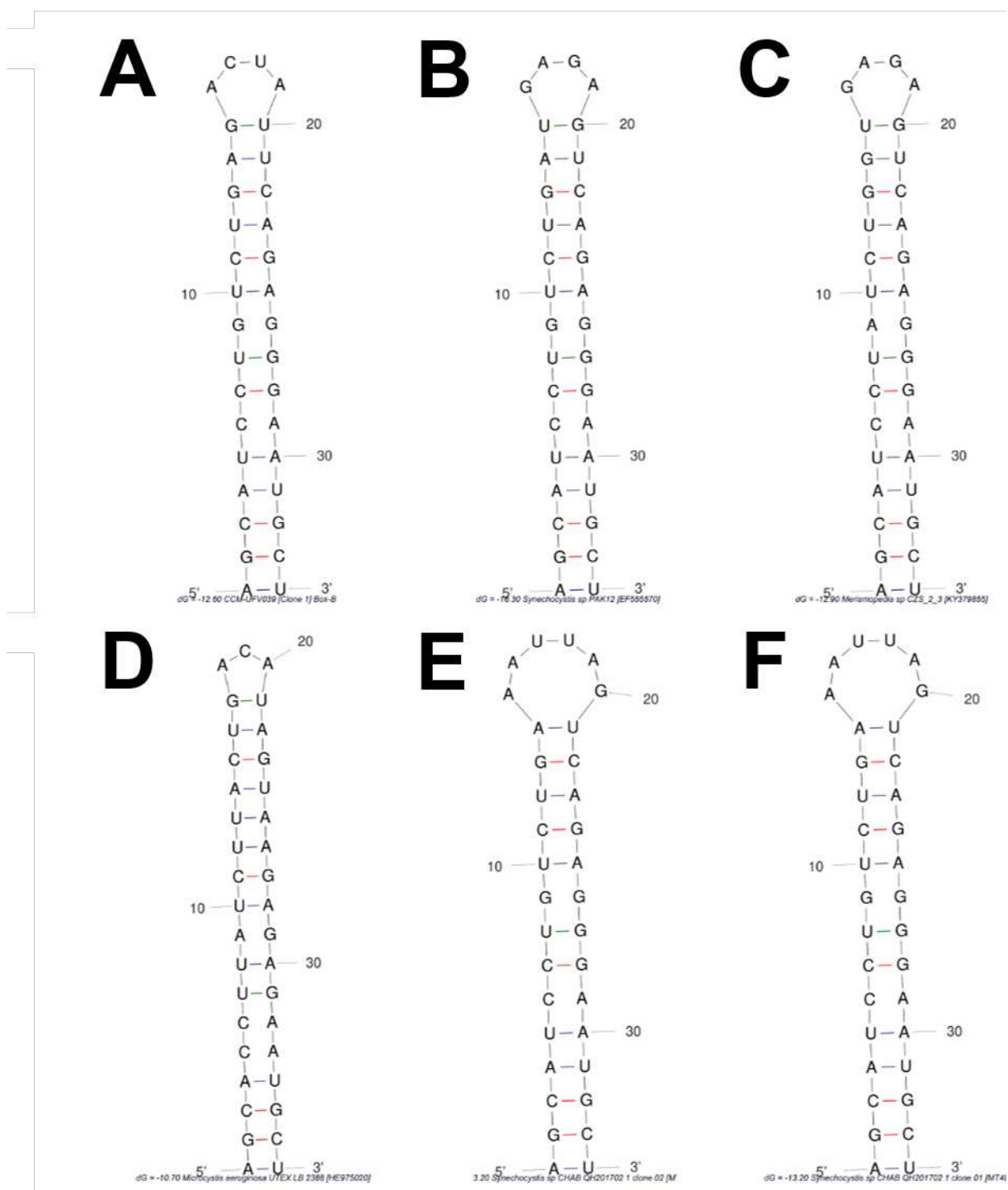
**Figura 7.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e linhagens relacionadas filogeneticamente.



**A:** *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, **B:** *Synechocystis* sp. CHAB QH201702.1 (MT488061), **C:** *Synechocystis* sp. CHAB QH201702.2 (MT488062), **D:** *Synechocystis* sp. PAK12 (EF555570), **E:** *Merismopedia* sp. CZS\_2\_3 (KY379855), **F:** *M. glauca* CCAP1448/3 (HF678499), **G:** *Microcystis aeruginosa* UTEX 'LB 2388' (HE975020), **H:** *Snowella* sp. CHAB6606 (MN796298).

O dobramento da região Box-B da linhagem trouxe uma estrutura semelhante a outras provindas de linhagens relacionadas filogeneticamente. Essa estrutura apresenta um longo talo, com um bulbo bilateral terminal, composto de 6 bases. A linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 se difere tanto na composição do talo quanto do bulbo terminal (Figura 8A) quando se comparado às estruturas de outras linhagens filogeneticamente próximas.

**Figura 8.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e de linhagens relacionadas filogeneticamente.

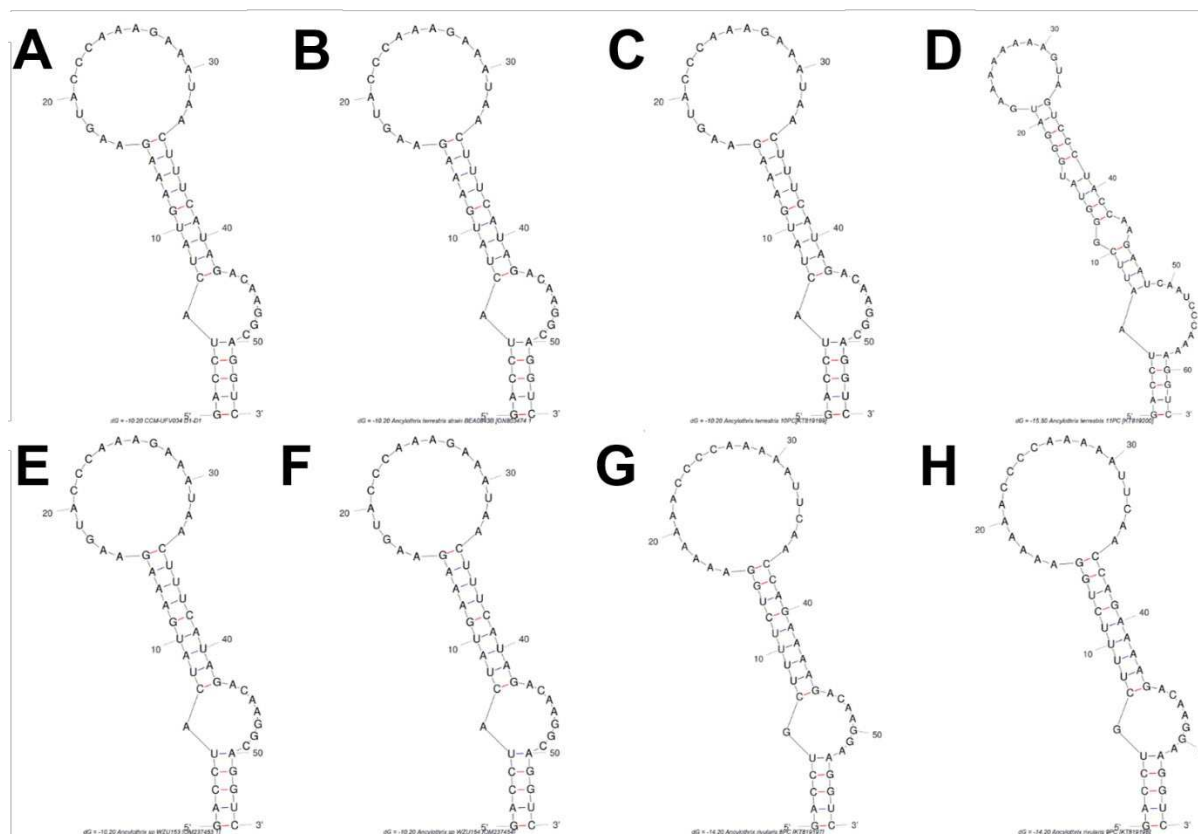


**A:** *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, **B:** *Synechocystis* sp. PAK12 (EF555570), **C:** *Merismopedia* sp. CZS\_2\_3 (KY379855), **D:** *M. aeruginosa* UTEX 'LB 2388' (HE975020), **E:** *Synechocystis* sp. CHAB QH201702.1 (MT488061), **F:** *Synechocystis* sp. CHAB QH201702.2 (MT488062).

### 3.4.2 A linhagem homocitada, Oscillatoriales, *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034;

O tamanho das regiões encontradas para as regiões do ITS dessa linhagem está descrito na tabela 3. A linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 apresentou uma estrutura secundária da região D1-D1' similar às descritas para o gênero *Ancylothrix* (Figure 9A), mais especificamente às linhagens *A. terrestris* 10PC (KT819199), *A. terrestris* BEA0843B (ON803474) e *Ancylothrix* sp. WZU153 (OM237453) e WZU154 (OM237454) (Figuras 9B, C, E e F). A estrutura comum entre essas linhagens é a de um bulbo unilateral basal (1-7), com uma Adenina (A) na posição esquerda do bulbo e um grande bulbo terminal (18).

**Figura 9.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

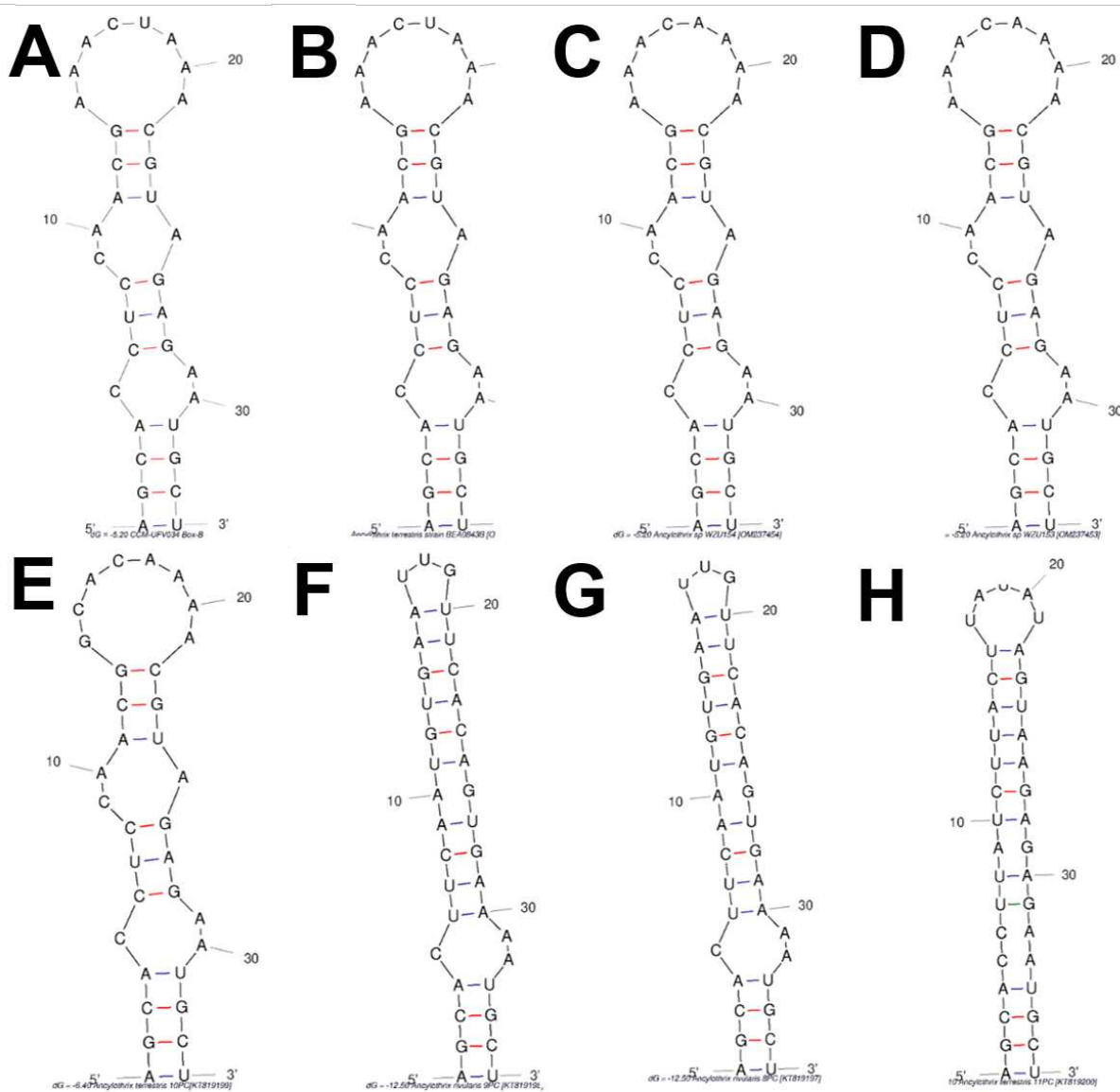


**A:** *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, **B:** *A. terrestris* strain BEA0843B (ON803474), **C:** *A. terrestris* 10PC (KT819199), **D:** *A. terrestris* 11PC (KT819200), **E:** *Ancylothrix* sp. WZU153 (OM237453), **F:** *Ancylothrix* sp. WZU154 (OM237454), **G:** *A. rivularis* 8PC (KT819197) **H:** *A. rivularis* 9PC (KT819198).

Para a região Box-B da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 foi encontrado um dobramento também semelhante ao previamente reportado para o gênero *Ancylothrix* (Figura 10A) (Martins et al., 2016), e novamente, para as linhagens *A.*

*terrestris* 10PC (KT819199), *A. terrestris* BEA0843B (ON803474) e *Ancylothrix* sp. WZU153 (OM237453) e WZU154 (OM237454) (Figuras 9B, C, D e E). A estrutura secundária Box-B encontrada é a de 3 bulbos, um basal (2-1), intermediário (1-2) e um bilateral terminal (10). As diferenças encontradas entre essas estruturas estão apenas na composição de nucleotídeos específicos no bulbo terminal (posições 14, 15 e 18).

**Figura 10.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e linhagens relacionadas filogeneticamente.

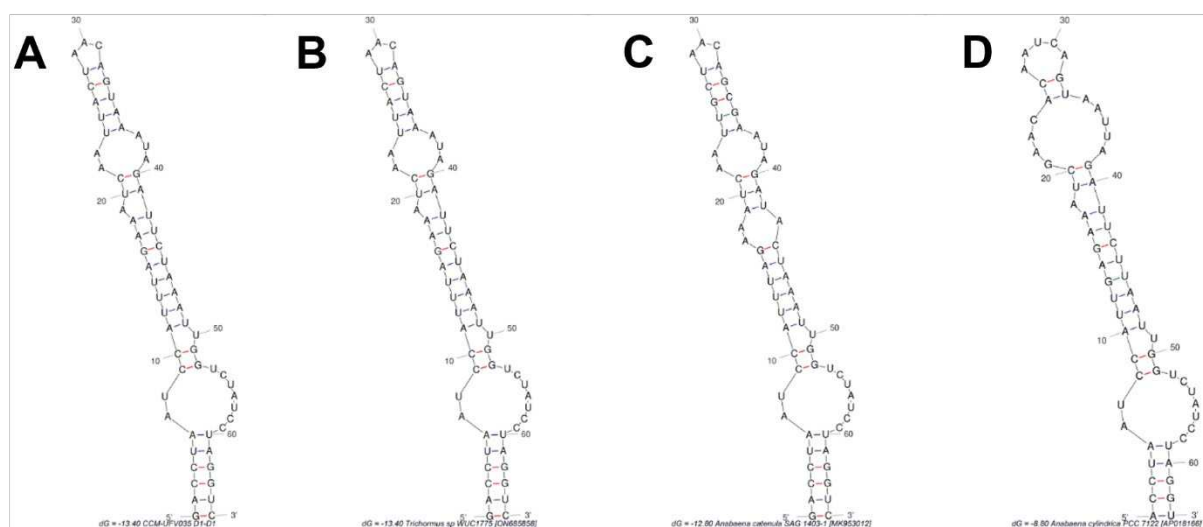


**A:** *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, **B:** *A. terrestris* strain BEA0843B (ON803474), **C:** *Ancylothrix* sp. WZU154 (OM237454), **D:** *Ancylothrix* sp. WZU153 (OM237453), **E:** *A. terrestris* 10PC (KT819199), **F:** *A. rivularis* 9PC (KT819198), **G:** *A. rivularis* 8PC (KT819197), **H:** *A. terrestris* 11PC (KT819200).

### 3.4.3 A linhagem heterocitada, Nostocales, *Trichormus* sp. CCM-UFV035;

Também foi realizado o dobramento da estrutura secundária do ITS para a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035. Observando apenas a região D1-D1', vemos um padrão semelhante a outras linhagens filogeneticamente próximas, idêntico à linhagem *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858) e *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012). Na estrutura secundária da região D1-D1' das linhagens recuperadas desse grupo, observa-se uma constância na posição esquerda do bulbo basal (U-A). Também é observado nas linhagens *Trichormus* spp. CCM-UFV035 e WUC1775 a presença de 2 calos (U e A) no talo e um bulbo médio intermediário. Na posição terminal de *Trichormus* spp. CCM-UFV035, WUC1775 (ON685858) e *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012) um loop terminal com 5nt foi observado.

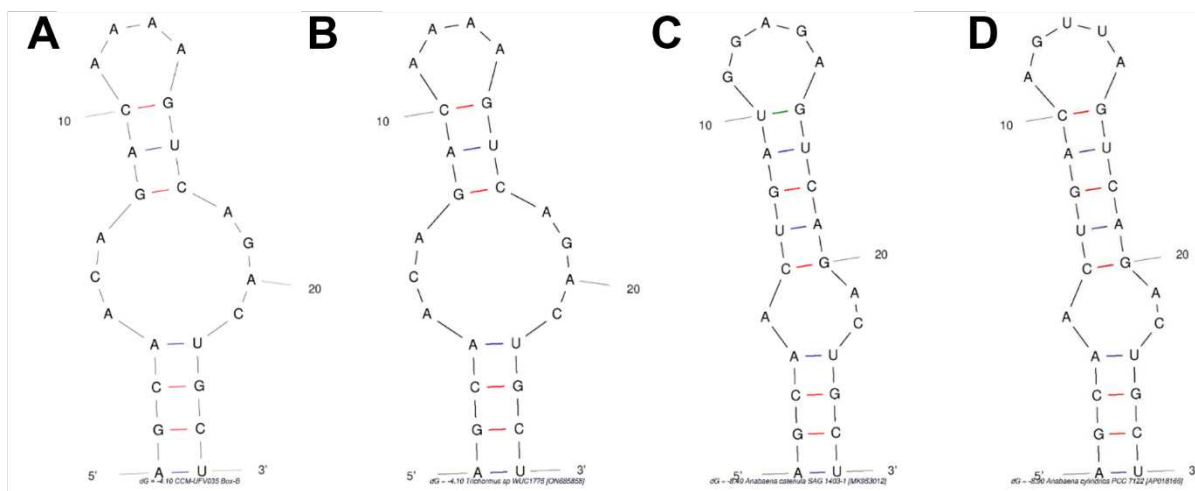
**Figura 11.** Dobramento da estrutura secundária D1-D1' da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e linhagens relacionadas filogeneticamente.



**A:** *Trichormus* sp. CCM-UFV035 **B:** *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858), **C:** *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012), **D:** *A. cylindrica* PCC7122 (AP018166)

Para região Box-B ITS, também observamos um dobramento idêntico à linhagem *Trichormus* sp. WUC1775, e diferente das outras linhagens comparadas. Essa estrutura possui 2 bulbos, sendo um bulbo bilateral e um bulbo terminal.

**Figura 12.** Dobramento da estrutura secundária Box-B da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e linhagens relacionadas filogeneticamente.



**A:** *Trichormus* sp. CCM-UFV035 **B:** *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858), **C:** *A. catenula* SAG 1403-1 (MK953012), **D:** *A. cylindrica* PCC7122 (AP018166).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização ecológica, morfológica e filogenética da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039

Linhagens de cianobactérias em ambientes salino-alcálinos já foram relatadas (de Alvarenga et al., 2018), inclusive com a presença de gêneros específicos à ambientes semelhantes, como *Alkalinema* e *Patanalinema* (Vaz et al., 2015) e *Halotia* (Genuário et al., 2015). Com efeito, a linhagem foi coletada em um ambiente com baixas temperaturas e um valor de pH elevado, além de uma alta concentração de sódio. Tais condições são desfavoráveis para a maioria dos organismos vivos. A linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresenta-se como uma potencial candidata para estudos envolvendo à adaptação a ambientes extremos, devido a essa origem ecológica. Neste contexto, o conhecimento acerca de características geográficas e ecológicas é fundamental para o entendimento de como tais organismos sobrevivem em ambientes tão hostis.

O tamanho celular encontrado para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 está dentro do encontrado para outras linhagens desse gênero (1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$ ) (Zavřel et al., 2017). Ademais, a observação de macrocolônias formadas por células associadas por uma matriz mucilaginosa, indicam que essa linhagem apresenta a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS). Tais EPS muito provavelmente permitem a essa linhagem se adaptar a condições ambientais adversas, como a alta concentração de sódio, encontrada no local de coleta. Em consonância, EPS apresentam-se como um importante fator na evitação ao dessecação e ao estresse salino em linhagens heterocitadas (de Alvarenga et al., 2020).

Considerando a posição filogenética da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 dentro do grupo *Synechocystis*, uma maior relação com as linhagens *Synechocystis* sp. UTEX B 3001, 3003 e 3004 é aparente. Foi possível ainda resgatar a origem ecológica das linhagens *Synechocystis* UTEX B 3003 e 3004 (<https://utex.org>) notando-se que elas foram coletadas de um tapete microbiano em fontes termais, em um ambiente com alta concentração de arsênio, salinidade moderada e fluxo de carbono baixo, na bacia do Middle Geyser de El Tatio, Geyser Field, Chile. Tais pontos mostram-se importante no entendimento da evolução e relação dessa linhagem com outras espécies, uma vez que a linhagem *Synechocystis*

sp. CCM-UFV039 tem sua origem também em um ambiente hostil, com condições relativamente semelhantes ao das linhagens UTEX B 3003 e 3004.

Os dados ecológicos, morfológicos e filogenéticos aqui descritos colocam a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 como uma linhagem pertencente ao grupo *Synechocystis sensu stricto*, com parâmetros morfométricos similares a outras linhagens desse grupo, e com um alto potencial de tolerância à alta salinidade, condição essa presente no seu ambiente de origem. Trabalhos futuros com essa linhagem devem, portanto, buscar entender melhor a resposta dessa linhagem a altas concentrações de sais.

#### **4.2 Caracterização ecológica *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e *Trichormus* sp. CCM-UFV035**

As linhagens filamentosas *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 e *Trichormus* sp. CCM-UFV035 foram isoladas a partir de um ambiente extremamente hostil, contaminado por resíduos de arsênio. O arsênio é um elemento altamente tóxico para muitas formas de vida. É plausível sugerir, portanto, que tais linhagens apresentam um grande potencial de adaptação e resistência a tais condições extremas. Não obstante, uma limitação a ser considerada é que os parâmetros físico-químicos do ambiente onde essas linhagens foram encontradas não foram descritos, o que pode dificultar, ao menos em parte, a compreensão da adaptabilidade dessas linhagens às condições específicas do ambiente em que foram encontradas. Também é possível supor que o habitat original dessas linhagens seja, muito provavelmente, ambientes próximos a esse onde elas foram isoladas, ambientes terrestres como solos ou superfícies (paredes e rochas).

##### **4.2.1 Caracterização morfológica e filogenética da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034**

Em relação à morfologia, as características típicas do gênero *Ancylothrix* foram observadas para a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, incluindo, a presença de curvatura na posição final do tricoma. Também é possível observar a presença do comportamento de motilidade nesta linhagem que, até o momento, não havia sido formalmente descrito para esse gênero. Quando comparada morfológicamente com as espécies já descritas, a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 apresentou uma semelhança maior a espécie *A. terrestris*, do que a espécie *A. rivularis*. Tais

semelhanças consistem na largura das células vegetativas, a espécie *A. rivularis* apresenta largura celular superior a 5,5 µm, enquanto *A. terrestris*, uma faixa de 4,0–6,5 µm, que engloba a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034. Em adição, ao se considerar a coloração dos tricomas, nota-se também uma maior semelhança com a espécie *A. terrestris*, no qual as células apresentam coloração verde mais clara e brilhante que a espécie *A. rivularis*.

Os resultados obtidos a partir das reconstruções filogenéticas, mostram que a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 se posiciona dentro do grupo monofilético descrito para o gênero *Ancylothrix*, corroborando com a sua identificação morfológica prévia. Com efeito, a análise filogenética revelou que a sequência de 16S da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 se agrupa, de maneira mais próxima, às sequências das linhagens *Ancylothrix* sp. WZU153 e *Ancylothrix* sp. WZU154, assim como às sequências de *A. terrestris*. Considerando que a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 está relacionada a outras linhagens classificadas como *A. terrestris* fornecem adicional suporte para a hipótese anteriormente levantada, do seu habitat original ser um ambiente próximo ao da sua coleta sendo, possivelmente, um ambiente terrestre. Em adição, ao se considerar os valores de identidade nota-se que a *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 possui uma maior porcentagem de identidade com as sequências *A. terrestris* 10PC (KT819199) *A. terrestris* 11PC (KT819200) e *Ancylothrix* sp. WZU154 (OM237454), todos 99,86% (Tabela 1), indicando a semelhança da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 com outros indivíduos da espécie *Ancylothrix terrestris*.

A análise filogenética também mostrou a formação de outros grupos a nível de ordem e família, que reforçam a estabilidade da reconstrução filogenética ora realizada. Também foi observado a presença de um agrupamento relacionado ao grupo contendo *Baaleninema*, *Sodalinema* (Oscillatoriales) e *Jaaginema*, com linhagens classificadas em diversos grupos, como *Oscillatoriales cyanobacterium* KSU-AQIQ-8, *Phormidiaceae cyanobacterium* CENA533 e *Geitlerinema cf. acuminatum* CCALA 141. Tomados em conjuntos, este agrupamento revela a necessidade de uma classificação mais apropriada para essas linhagens citadas que, muito provavelmente, seriam indivíduos de um gênero ainda não descrito. Ademais, tais resultados revelam também a complexidade da taxonomia desses organismos filamentosos. É plausível sugerir que a ordem Oscillatoriales seja um grupo taxonômico diverso e com várias ramificações evolutivas, que ainda necessitam de um maior aprofundamento, para uma resolução taxonômica mais robusta.

Adicionalmente, gêneros como *Ancylothrix* já mostram uma grande estabilidade em reconstruções filogenéticas mesmo com a adição de novas sequências de indivíduos classificados nesse grupo.

#### **4.2.2 Caracterização morfológica e filogenética da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035**

A caracterização morfométrica da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 corrobora com o que já se conhece sobre o gênero *Trichormus*, apresentando aspectos típicos da morfologia desses organismos (Rajaniemi et al., 2005). Neste contexto, a observação dos hormogônios, principalmente na fase logarítmica, sugere a presença de mecanismos de diferenciação celular e regulação do desenvolvimento dos tricomas. Além disso, a presença de acinetos em estágios mais avançados do crescimento é também uma característica comum de cianobactérias heterocitadas, sendo também encontrada nessa linhagem. No geral, os resultados apresentados oferecem informações importantes sobre a morfologia e desenvolvimento dessa linhagem, contribuindo para o conhecimento geral acerca de cianobactérias do gênero *Trichormus*.

Em relação as reconstruções filogenéticas, nossos resultados mostram que a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 está filogeneticamente relacionada com outras sequências classificadas como do gênero *Trichormus* e *Anabaena*, formando um grupo monofilético, que é descrito como o grupo tipo do gênero *Trichormus* (Rajaniemi et al., 2005). Cabe ressaltar que nesse grupo se encontram as sequências *T. variabilis* HINDAK 2001/4 e GREIFSWALD/92, consideradas sequências referência para o gênero (Rajaniemi et al., 2005). Assim, tais resultados confirmam, uma vez mais, a identificação morfológica desta linhagem.

A formação de agrupamentos típicos da ordem Nostocales (e.g., *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Anabaena*, *Halotia* e *Nodularia*), é um resultado esperado e fornece uma validação adicional para a reconstrução filogenética aqui apresentada (Figura 6). Além disso, a proximidade filogenética da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 com outras sequências de *Trichormus* e *Anabaena* sugere que esses gêneros estejam intimamente relacionados evolutivamente. Como previamente descrito, a relação desses grupos é complexa e gera diversas discussões; porém, o aprofundamento do estudo filogenético do gênero *Trichormus*, até o momento, foi pouco ou nada explorado (Choi et al., 2012; Rajaniemi et al., 2005). É interessante notar que a

linhagem mais próxima filogeneticamente à linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 é a linhagem *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858). Foi possível recuperar apenas informações de origem sobre a linhagem *Trichormus* sp. WUC1775, sendo essa uma linhagem de origem de solos e ambientes alagados (Singh et al., 2022). É possível que a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 também tenha como habitat original um ambiente terrestre, e que as linhagens *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e *Trichormus* sp. WUC1775 (ON685858), sejam indivíduos relacionados de forma relativamente próxima. Essa hipótese é reforçada pela alta identidade entre as sequências disponíveis desses indivíduos (100% de %ID, cobertura 96%).

### 4.3 Dobramento das estruturas secundárias da região do ITS

#### 4.3.1 Estrutura secundária do ITS da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039

Os resultados apresentados sobre a estrutura secundária das regiões internas do ITS D1-D1' e Box-B da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 são relevantes pois essas regiões são utilizadas como marcadores moleculares para estudos filogenéticos e taxonômicos em cianobactérias. A região D1-D1' da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 (Figura 7A) mostrou um dobramento bem distinto quando comparado a outras linhagens do mesmo grupo e mesmo grupos próximos, como *Merismopedia* e *Microcystis* (Figura 7B,C D, E, F e G). Esses resultados se mostram úteis na diferenciação entre essa linhagem e outras relacionadas filogeneticamente e, ainda mais importante, ressaltam suas singularidades.

Uma semelhança encontrada entre a sequência da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e as sequências depositadas para algumas outras linhagens classificadas como *Synechocystis*, é a ausência do tRNA-Ala. Esse resultado demonstra que a ausência do tRNA-Ala na região ITS possa ser uma característica perdida durante a evolução de linhagens do gênero *Synechocystis*, ressaltando as relações próximas entre esses organismos.

Já a estrutura secundária da região Box-B apresenta diferenças na composição do talo e do bulbo terminal em relação as outras linhagens (Figura 8A), o que indica uma possível maior variação dessa região dentro do gênero *Synechocystis*. Curiosamente, a estrutura do Box-B da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 se assemelhou mais com as linhagens *Synechocystis* sp. PAK 12 e *Merismopedia* sp. C\_Z\_S\_2\_3, do que com as linhagens mais próximas quando considerado a

identidade do gene ribossomal 16S (*Synechocystis* UTEX e CHBAB). Tomados em conjunto, tais resultados ressaltam a importância da análise detalhada da estrutura secundária das regiões do ITS para estudos filogenéticos e taxonômicos mais precisos ao mesmo tempo que indicam uma singularidade acerca dessas estruturas para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, com ambas as estruturas D1-D1' e Box-B apresentando dobramentos únicos.

#### 4.3.2 Estrutura secundária do ITS da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034

A separação das duas espécies descritas de *Ancylothrix* é também suportada pelas sequências da região 16S-23S ITS (Martins et al., 2016). *A. rivularis* possui, em relação ao tamanho e dobramento da estrutura secundária, uma estabilidade na sequência 16S-23S ITS (Figura 9G e H). Por outro lado, *A. terrestris* apresenta uma maior variação nessa região, para ambos tamanho e dobramento (Figura 9B, C e D). Nossos resultados mostram que a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 possui uma maior similaridade do dobramento da região D1-D1' com as linhagens descritas como *A. terrestris* 10PC (KT819199) e *A. terrestris* BEA0843B (ON803474).

Martins et al. 2016 discutiu também a possibilidade de que o habitat apresente influência sobre variação da região 16S-23S ITS. Neste contexto, ambientes aéreos, devido à maior variação em condições ambientais em comparação à ambientes aquáticos, seriam capazes de selecionar uma maior variação de mutações dentro dessa região. Isso também pode ser observado na linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034, uma vez que sua região apresenta tamanhos e dobramentos diferentes dos já descritos, porém, dentro de uma plasticidade esperada.

É possível que essas linhagens “colonizaram” o ambiente descrito a partir de ambientes próximos, muito provavelmente terrestres, como solo, ou superfícies epifíticas ou rochosas. Essa hipótese é reforçada pela identificação taxonômica da linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 como *A. terrestris* CCM-UFV034, baseada nas semelhanças nos dobramentos da região do ITS, bem como nos valores de %ID e nos dados filogenéticos. Ademais, é possível que essas linhagens isoladas desse ambiente possuam mecanismos de tolerância ao arsênio, explicitando a capacidade cosmopolita de linhagens de cianobactéria, especialmente ao gênero *Ancylothrix*, que ainda não havia sido relatado e merece estudos futuros.

#### 4.3.3 Estrutura secundária do ITS da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035

A quantidade de sequências completas já descritas para região do 16-23S ITS de linhagens do gênero *Trichormus* é limitada, tornando difícil a comparação a linhagens próximas filogeneticamente, se tratando especificamente da região ITS. Devido ao seu caráter parafilético o gênero *Trichormus* foi, por muito tempo, negligenciado. Assim, comparações da estrutura secundária das regiões do ITS foram possíveis com apenas poucas linhagens relacionadas no mesmo grupo filogenético, denominado *Trichormus* (*sensu strico*), além de grupos próximos como *Anabaena*.

Dentro do grupo *Trichormus* a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 apresentou um dobramento da estrutura secundária da região D1-D1' do ITS idêntico ao da linhagem *Trichormus* sp. WUC1775, e diferente da sequência classificada como *A. catenula* SAG1403-1 (que se agrupou no clado *Trichormus sensu strictu*). Além disso, a estrutura da linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 também se difere de outros gêneros (e.g., *Anabaena*, *Halotia*, *Nostoc* e *Desmonostoc*). Isso indica que o dobramento da região D1-D1' do ITS possa ser uma ferramenta adequada para a diferenciação de indivíduos semelhantes morfológicamente, em especial cujo valores de %ID sejam superiores ao valor estipulado de 97,5%, para delimitação de clados ao nível e gênero.

Além da semelhança na região D1-D1', a região Box-B ITS da linhagem é também idêntica à da linhagem *Trichormus* sp. WUC1775, e se difere de outras linhagens próximas, como *A. catenula* e *A. cylindrica*. Em função dos resultados anteriormente apresentados, e pela alta %ID compartilhada entre as sequências das linhagens *Trichormus* sp. CCM-UFV035 e *Trichormus* sp. WUC1775, é plausível que essas linhagens sejam indivíduos de uma mesma espécie e que ainda não foram sistematicamente descritas. Assim, essas linhagens possuem diferenças suficientes para uma classificação ao nível de espécie diferente de espécies descritas dentro do gênero *Trichormus*, especificamente, ao holótipo *Trichormus variabilis* (linhagem *T. variabilis* HINDAK 2001/4 (AJ630456)).

## 5. CONCLUSÕES

Para dois dos três organismos aqui analisados foi possível classificar as linhagens até o nível hierárquico de espécie. A linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 demonstra diferenças substanciais em caráter filogenético, assim como seus dobramentos da estrutura secundária da região do ITS quando se comparada a outras linhagens próximas. Não obstante, a ausência de uma análise que demonstre a disposição dos tilacóides, necessária no contexto de descrição de indivíduos unicelulares, impossibilita a denominação dessa linhagem como uma nova espécie. Todavia, os dados aqui apresentados demonstram a singularidade dessa linhagem que, potencialmente, apresenta-se como uma nova espécie dentro do gênero *Synechocystis*.

Os dados obtidos aqui para a linhagem *Ancylothrix* sp. CCM-UFV034 mostram que esse indivíduo tem características suficientes para sua classificação como *A. terrestris* CCM-UFV034. Seus padrões de dobramento da região ITS caem dentro do padrão esperado para linhagens dessa espécie, além de uma posição filogenética que corrobora com essa classificação. Em conjunto, suas características morfológicas se assemelham mais as de *A. terrestris* que *A. rivularis*. Esse trabalho também mostra que linhagens desse gênero podem habitar locais contaminados com arsênio, possuindo provavelmente mecanismos capazes de mitigar a exposição e o dano causado por esse elemento, e ampliam a diversidade ecológica desse gênero.

Por outro lado, os resultados para linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 indicam que essa linhagem possui diferenças suficientes para uma classificação ao nível de espécie diferente das espécies já descritas dentro do gênero *Trichormus*. Nesse contexto, é proposto que a linhagem *Trichormus* sp. CCM-UFV035 seja denominada *Trichormus flavodiazotum* CCM-UFV035, em razão da coloração amarela dos heterócitos.

É importante ressaltar que linhagens aqui descritas e caracterizadas apresentam um enorme potencial para estudos futuros, principalmente devido ao seu habitat hostil, abrindo possibilidades para a descoberta de novos mecanismos de tolerância a estresses abióticos. Com efeito, a caracterização dessas linhagens contribui significativamente para o avanço do conhecimento da biodiversidade encontrada em países tropicais. Compreender a diversidade microbiana presente nesses ambientes é, portanto, essencial para a conservação e para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável desses ecossistemas.

## 6. REFERÊNCIAS

- Almeida, A. V. M., Vaz, M. G. M. V., Castro, N. V. de, Genuário, D. B., Oder, J. C., Souza, P. A. M. de, Martins, S. B., Machado, M., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. (2023). How diverse a genus can be: An integrated multi-layered analysis into *Desmonostoc* (Nostocaceae, Cyanobacteriota). *Systematic and Applied Microbiology*, *46*(3), 126422. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126422>
- ANAGNOSTIDIS, K., & Anagnostidis, Konstantinos; Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes I-Introduction. *Algological Studies*, *38*(2), 327–472. <https://doi.org/10.1214/09-aos284>
- Blanc-Garin, V., Chenebault, C., Diaz-Santos, E., Vincent, M., Sassi, J. F., Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2022). Exploring the potential of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 for the photosynthetic production of various high-value terpenes. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02211-0>
- Brito, Â., Ramos, V., Mota, R., Lima, S., Santos, A., Vieira, J., Vieira, C. P., Kaštovský, J., Vasconcelos, V. M., & Tamagnini, P. (2017). Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *111*, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.006>
- Choi, G., Yoon, S., Kim, H., Ahn, C., Oh, H., & Anabaena, T. (2012). Morphological and Molecular Analyses of *Anabaena variabilis* and *Trichormus variabilis* (Cyanobacteria) from Korea. *환경생물*, *30*(1), 54–63.
- de Alvarenga, L. V., Lucius, S., Vaz, M. G. M. V., Araújo, W. L., & Hagemann, M. (2020). The novel strain *Desmonostoc salinum* CCM-UFV059 shows higher salt and desiccation resistance compared to the model strain *Nostoc* sp. PCC7120. *Journal of Phycology*, *56*(2), 496–506. <https://doi.org/10.1111/jpy.12968>
- de Alvarenga, L. V., Vieira Vaz, M. G. M., Genuário, D. B., Esteves-Ferreira, A. A., Almeida, A. V. M., de Castro, N. V., Lizieri, C., Souza, J. J. L. L., Schaefer, C. E. G. R., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. (2018). Extending the ecological distribution of *Desmonostoc* genus: Proposal of *Desmonostoc salinum* sp. nov., a novel Cyanobacteria from a saline–alkaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(9), 2770–2782. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002878>

- Esteves-Ferreira, A. A., Cavalcanti, J. H. F., Vaz, M. G. M. V., Alvarenga, L. V., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. (2017). Cyanobacterial nitrogenases: Phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1), 261–275. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0050>
- Genuário, D. B., Vieira Vaz, M. G. M., Hentschke, G. S., Sant'Anna, C. L., & Fiore, M. F. (2015). Halotia gen. Nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(2), 633–675. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070078-0>
- Gugger, M. F., & Hoffmann, L. (2004). Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(2), 349–357. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02744-0>
- Guiry, M.D. & Guiry, G. M. (2020). AlgaeBase. *World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway.*
- Hammerschmidt, K., Landan, G., Domingues Kümmel Tria, F., Alcorta, J., & Dagan, T. (2021). The Order of Trait Emergence in the Evolution of Cyanobacterial Multicellularity. *Genome Biology and Evolution*, *13*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa249>
- Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D. H., & Soo, R. M. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *ISME Journal*, *15*(7), 1879–1892. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>
- Jeong, Y., Hong, S. J., Cho, S. H., Yoon, S., Lee, H., Choi, H. K., Kim, D. M., Lee, C. G., Cho, S., & Cho, B. K. (2021). Multi-Omic Analyses Reveal Habitat Adaptation of Marine Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 7338. *Frontiers in Microbiology*, *12*(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667450>
- Juteršek, M., Klemenčič, M., & Dolinar, M. (2017). Discrimination between *synechocystis* members (cyanobacteria) based on heterogeneity of their 16S rRNA and ITS regions. *Acta Chimica Slovenica*, *64*(4), 804–817. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3262>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Komárek, J. (2010a). Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: A short review of genera. *Hydrobiologia*, *639*(1), 231–243.

- <https://doi.org/10.1007/s10750-009-0030-4>
- Komárek, J. (2010b). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*, 639(1), 245–259. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-0031-3>
- Komárek, J., & Kaštovský, J. (2003). Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies*, 109(1), 305–325. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0305>
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86(4), 295–335.
- Komárková, J., Jezberová, J., Komárek, O., & Zapomělová, E. (2010). Variability of *Chroococcus* (cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships. *Hydrobiologia*, 639(1), 69–83. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-0015-3>
- Korelusova, J., Kastovsky, J., & Komarek, J. (2009). Heterogeneity of the cyanobacterial genus *synechocystis* and description of a new genus, *geminocystis*. *Journal of Phycology*, 45(4), 928–937. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00701.x>
- Liu, D., & Pakrasi, H. B. (2018). Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0897-8>
- Martins, M. D., Rigonato, J., Taboga, S. R., & Branco, L. H. Z. (2016). Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of phormidiaceae (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(6), 2396–2405. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001044>
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83(2), 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2082-7>
- Oren, A., Mareš, J., & Rippka, R. (2022). Validation of the names *Cyanobacterium* and *Cyanobacterium stanieri*, and proposal of *Cyanobacteriota* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005528>

- Postgate, J. R. (1982). Biology {Nitrogen} {Fixation}: {Fundamentals}. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 296(1082,), 375–385. <http://www.jstor.org/stable/2395691>
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J., & Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 11–26. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63276-0>
- Rajaniemi, P., Komárek, J., Willame, R., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Hoffmann, L., & Sivonen, K. (2005). Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 117(October), 371–391. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0371>
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Singh, A. K., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Elvitigala, T., Ghosh, B., Aurora, R., & Pakrasi, H. B. (2009). A systems-level analysis of the effects of light quality on the metabolism of a cyanobacterium. *Plant Physiology*, 151(3), 1596–1608. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144824>
- Singh, Y., Singh, G., Singh, D. P., & Khattar, J. I. S. (2022). A checklist of blue-green algae (Cyanobacteria) from Punjab, India. *Journal of Threatened Taxa*, 14(3), 20758–20772. <https://doi.org/10.11609/jott.6754.14.3.20758-20772>
- Strunecký, O., Ivanova, A. P., & Mareš, J. (2022). An Updated Classification of Cyanobacterial Orders and Families Based on Phylogenomic and. *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Providence, R.I. American Mathematical Society.*, 57–86.
- Varman, A. M., Xiao, Y., Pakrasi, H. B., & Tang, Y. J. (2013). Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 for isobutanol production. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 79(3), 908–914. <https://doi.org/10.1128/AEM.02827-12>

- Vaz, M. G. M. V., Genuário, D. B., Andreote, A. P. D., Malone, C. F. S., Sant'Anna, C. L., Barbiero, L., & Fiore, M. F. (2015). Pantanalinema gen. nov. and Alkalinema gen. nov.: Novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 298–308. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070110-0>
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F. (2013). Development of synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, 11(8), 2894–2916. <https://doi.org/10.3390/md11082894>
- Zavřel, T., Očenášová, P., & Červený, J. (2017). Phenotypic characterization of Synechocystis sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLoS ONE*, 12(12), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189130>

## CAPÍTULO 2

### **TÍTULO: Impactos do arsenito na fisiologia e morfologia de diferentes linhagens de cianobactérias**

Allan Victor Martins Almeida<sup>1</sup>, Jean Coutinho Oder<sup>1</sup>, Thamires Emídio Sateles <sup>1</sup>,  
Cristiane do Carmo Cesário<sup>2</sup>, Wagner L. Araújo<sup>1\*</sup>, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Brasil.

<sup>2</sup>Núcleo de Microscopia e Microanálise, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário Universidade Federal de Viçosa, 36570-075, Brasil.

#BCCM/ULC Culture Collection, InBios-Centre for Protein Engineering, University of Liège, Liège B-4000, Belgium.

\*Autor correspondente: Wagner L. Araújo

Departamento de Biologia Vegetal

Universidade Federal de Viçosa 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Telefone: +55-31-3612-5357 Email: wlaraujo@ufv.br

## RESUMO

As cianobactérias exibem uma ampla diversidade metabólica que possibilita sua adaptação a ambientes diversos, incluindo aqueles ricos em metais pesados como chumbo (Pb) e antimônio (Sb), além de outros elementos metálicos como ferro (Fe) e alumínio (Al), comumente encontrados em corpos d'água. Este trabalho explora a capacidade desses microrganismos de prosperar em ambientes contaminados por arsênio (As). O aumento nas concentrações de arsênio, principalmente devido a processos de mineração, apresenta riscos ambientais, especialmente quando acumulado em reservatórios ou liberado em corpos d'água. O arsênio existe em várias formas influenciadas por fatores ambientais, tornando-se um elemento único. As concentrações naturais em lençóis freáticos variam amplamente, representando riscos para a saúde humana e o meio ambiente. As cianobactérias, conhecidas por sua adaptabilidade metabólica, desempenham um papel crucial no ciclo biogeoquímico do arsênio. Elas demonstram a capacidade de oxidar, metilar e volatilizar o arsênio, reduzindo sua concentração efetiva no solo. Enquanto o acúmulo de arsênio em bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas, tem sido extensivamente estudado, o comportamento das cianobactérias em concentrações realisticamente encontradas no ambiente ainda é pouco explorado. Compreender suas respostas a condições extremas pode informar sobre estressores ambientais naturais, potencialmente contribuindo para aplicações agronômicas e de fitorremediação. Aquaporinas e aquagliceroporinas, são proteínas que facilitam o transporte de vários substratos através de membranas biológicas. Essas proteínas, presentes em cianobactérias, desempenham um papel na entrada de arsênio nas células devido a similaridades estruturais com moléculas que normalmente transportam. O estudo destaca a necessidade de explorar como diferentes linhagens de cianobactérias respondem ao estresse por arsênio, oferecendo insights valiosos para o manejo ambiental e a prevenção de impactos adversos. Em conclusão, esta pesquisa investiga o impacto do arsenito em diversas linhagens de cianobactérias, proporcionando uma análise abrangente de seus parâmetros metabólicos, fisiológicos e morfológicos em resposta à exposição ao arsênio. A abordagem integrada oferece insights valiosos sobre a adaptação das cianobactérias ao arsênio, contribuindo para estratégias de manejo ambiental e remediação em áreas afetadas por contaminação por arsênio.

**Palavras-chave:** Cianobactérias, fisiologia, arsênio, metabolismo, microscopia, EPS.

## ABSTRACT

Cyanobacteria exhibit a broad metabolic diversity enabling their adaptation to diverse environments, including those rich in heavy metals such as lead (Pb) and antimony (Sb), as well as other toxic elements like iron (Fe) and aluminum (Al) commonly found in water bodies. This work explores their ability to thrive in arsenic (As)-contaminated environments. The rise in arsenic concentrations, primarily due to mining processes, poses environmental risks, especially when accumulated in reservoirs or released into water bodies. Arsenic exists in various forms influenced by environmental factors, making it a unique element sensitive to pH variations. Natural concentrations in groundwater vary widely, posing risks to human health and the environment. Cyanobacteria, known for their metabolic adaptability, play a crucial role in arsenic biogeochemical cycling. They demonstrate the ability to oxidize, methylate, and volatilize arsenic, reducing its effective concentration in soil. While arsenic accumulation in bacteria, both gram-positive and gram-negative, has been extensively studied, the behavior of cyanobacteria at environmentally realistic concentrations remains less explored. Insight into their responses to extreme conditions can inform our understanding of natural environmental stressors, potentially contributing to agronomic and phytoremediation applications. Aquaporins and aquaglyceroporins, proteins facilitating the transport of various substrates across biological membranes. These proteins, found in cyanobacteria, play a role in arsenic entry into cells due to structural similarities with molecules they typically transport. The study emphasizes the need to explore how different cyanobacterial strains respond to arsenic stress, offering valuable insights for environmental management and the prevention of adverse impacts. In conclusion, this research investigates the impact of arsenite on various cyanobacterial strains, providing a comprehensive analysis of their metabolic, physiological, and morphological parameters in response to arsenic exposure. The integrated approach yields valuable insights into cyanobacterial adaptation to arsenic, contributing to environmental management and remediation strategies in arsenic-affected areas.

**Keywords:** cyanobacteria, physiology, arsenic, metabolism, microscopy, EPS.

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias possuem uma ampla diversidade metabólica que permite sua adaptação a diferentes ambientes, incluindo aqueles com alta concentração de metais pesados, como chumbo (Pb) e antimônio (Sb) (Sousa, 2014), além de outros elementos tóxicos, como ferro (Fe) e alumínio (Al), que são frequentemente encontrados em cursos d'água (Schirmer et al., 2013; Taton et al., 2006). Além disso, esses microrganismos podem também habitar ambientes com elevada concentração de arsênio (As), um metaloide que ocorre principalmente nas formas inorgânicas de arsenato [As(V)] e arsenito [As(III)], como previamente relatado (Figueiredo et al. 2007a; Huertas et al. 2014). Com efeito, a presença de As em ambientes naturais pode ser extremamente tóxica para a maioria dos organismos; no entanto, as cianobactérias desenvolveram diversas estratégias para lidar com esse elemento, incluindo a oxidação ou metilação do As(III) em formas menos tóxicas, além da extrusão ativa de As da célula (Achour et al., 2007).

O As é encontrado naturalmente no meio ambiente; todavia, ao longo dos últimos anos, um aumento nas concentrações deste elemento tem ocorrido em decorrência, predominantemente, de processos antrópicos em especial a mineração (Eisler et al., 2004). Durante a extração e processamento do minério de ferro diversas etapas são realizadas para obtenção de um extrato mais concentrado (Segura et al., 2016). Desta forma, atividades relacionadas à mineração produzem grandes quantidades de rejeitos, os quais são acumulados, usualmente, em barragens, que apresentam um alto risco ambiental (Cordeiro et al., 2019; Segura et al., 2016). Esse risco decorre não só da quantidade em si de material produzido, mas também pela abundância de metais que podem ser tóxicos (e.g. As), cujas elevadas concentrações podem culminar em impactos ambientais nocivos (Aires et al., 2018).

Em solos naturais, as formas do As podem variar amplamente, sendo esses influenciados pelo comportamento da fase no qual ele se encontra (De Andrade et al., 2008), e por condições abióticas como pH e condutividade elétrica (Wang et al., 2014). Isso torna o As um elemento único dentro dos metaloides, por ser sensível a variação de pH tipicamente encontrada nos ambientes (Smedley, 2002). Em soluções aquosas, o arsenito [As(III)], na sua forma neutra  $H_3AsO_3$ , predomina em condições reduzidas, enquanto o arsenato [As(V)], majoritariamente disponível na forma de ânions  $H_2AsO_4^-$  e  $HAsO_4^{2-}$ , é o estado termodinamicamente estável em condições

óxicas (Rossa 2002). No Brasil, a contaminação por As é preocupante e se concentra em locais específicos. Na região Sudeste, o Quadrilátero Ferrífero é um exemplo de área na qual grandes quantidades de As são, usualmente, lançadas em drenagens, solos e atmosfera como resultado da mineração de ouro que segue ocorrendo nos últimos três séculos (Figueiredo et al., 2007; Obuekwe et al., 2019). Além disso, a região amazônica também apresenta contaminação por As, principalmente associada à extração de minérios de manganês (Mn) nos últimos 50 anos (Figueiredo et al., 2007). Neste contexto, tais contaminações representam riscos significativos para a saúde humana e para o meio ambiente, tornando-se um desafio para as autoridades e pesquisadores no desenvolvimento de estratégias de mitigação e remediação dessas áreas afetadas.

A faixa de concentrações de As normalmente encontrada em lençóis freáticos é ampla, dependendo das condições geológicas do local, variando desde menos de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  até valores superiores a  $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Abiye and Bhattacharya, 2019). As concentrações encontradas em ambientes de água doce costumam estar abaixo de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e frequentemente menores que  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Smedley, 2002). Em regiões com uma intensa ação antrópica (e.g., drenagens de mineração), a concentração de As pode chegar a  $850.000 \mu\text{g L}^{-1}$ , como registrado em *Iron Mountain Mines*, Califórnia, EUA (Nordstrom and Alpers, 1999). Com efeito, registros feitos na região de Paracatu, Minas Gerais, Brasil, apresentam concentrações de As superiores a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  nos corpos d'água, e até  $10.000 \text{mg kg}^{-1}$  em sedimentos próximos (Obuekwe et al., 2019).

Por ser um análogo estrutural do fosfato, o arsenato [As(V)] pode causar danos em todos os organismos vivos (Figueiredo et al., 2007). Essa semelhança entre o fosfato e o arsenato pode levar a um desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibir a atividade da ATPase, além de inibir mecanismos de reparo do DNA (Santos et al., 2006). Já o arsenito [As(III)] pode reagir com os grupos funcionais com radicais nitrogênio e enxofre, presentes nas cisteínas e histidinas que compõem algumas proteínas (Rosen, 2002). Desta forma, a incorporação de As(III) leva a inativação de uma série de enzimas que possuem estes resíduos.

Em função de sua ampla diversidade metabólica, a adaptação de cianobactérias é facilitada em diversos ambientes, incluindo aqueles contaminados com As, como corpos de água doce, que frequentemente recebem efluentes de resíduos de mineração (Obuekwe et al., 2019). Em adição, esses microrganismos

desempenham um papel importante no ciclo biogeoquímico do As (Yin et al., 2011). Diversos registros de cianobactérias isoladas de ambientes contaminados com As são existentes, incluindo espécies pertencentes aos gêneros *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Oscillatoria*, *Tolypothrix*, *Phormidium*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Kamptanema*, *Anagnostidinema*, *Hydrocoleum* e *Microchaete* (Ferrari et al., 2013; Maeda et al., 1987; Obuekwe et al., 2019; Pérez-Portilla et al., 2021). A presença de As no ambiente afeta grandemente a utilização dos recursos contaminados, como água e solo (Obuweke et al., 2019.). As cianobactérias e suas comunidades microbianas associadas são capazes de lidar com esses contaminantes e até metabolizá-los, com a capacidade de oxidar, metilar e volatilizar o As, diminuindo sua concentração efetiva no solo (Qin et al., 2006).

O acúmulo de As já foi demonstrado não apenas em bactérias gram-positivas (Ordóñez et al., 2005) e gram-negativas (Fekih et al., 2018), mas também em cianobactérias (Achour et al., 2007; Yin et al., 2011). Normalmente, os estudos de acúmulo desse elemento em cianobactéria são feitos em concentrações extremamente altas de As (Ferrari et al., 2013; Srivastava et al., 2009), de forma que o comportamento desses organismos em concentrações ambientalmente realísticas é, até o momento, pouco entendido, embora já tenha sido explorado (Huang et al., 2016). Não obstante, o entendimento de como esses organismos lidam com situações extremas pode nos ajudar a compreender as respostas desses frente aos estresses no ambiente natural, por revelar suas capacidades metabólicas e genéticas (Chen et al., 2014; Dhankher et al., 2002; Huang et al., 2015; Singh et al., 2011). É plausível sugerir que, tais informações possam ainda contribuir com o desenvolvimento de aplicações agronômicas e fitorremediativas.

Aquaporinas e aquagliceroporinas formam uma família de proteínas que facilita e otimiza o transporte de uma gama de substratos e solutos por membranas biológicas (King et al., 2004). As aquagliceroproteínas participam ativamente na regulação osmótica da célula e são pequenas proteínas de 21 a 34 kD que, além de transportar primariamente água, podem também transportar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glicerol e até CO<sub>2</sub> (Wegner, 2017). Algumas aquagliceroporinas encontradas em mamíferos são permeáveis tanto para glicerol e ureia quanto para As(III), devido a similaridade estrutural deste ao glicerol quando em pH neutro (Liu et al., 2002; Rosen, 2002). Em *Escherichia coli*, a entrada de As(III) por aquaporinas se deve à proteína GlpF (Rosen, 2002), pequena aquagliceroporina que catalisa a difusão transmembrana de glicerol, e que também

possui certa permeabilidade à água e a pequenas moléculas não carregadas, como poliálcoois (Fu et al., 2000). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o transporte de As(III) ocorre pela aquagliceroporina Fps1p, funcionando bidirecionalmente (Maciaszczyk-Dziubinska et al., 2010). A deleção do gene que codifica para Fps1p confere resistência ao As(III) em *S. cerevisiae* (Wysocki et al., 2001), indicando seu papel no transporte desse elemento. Em cianobactérias, o arsenito entra de forma passiva, por meio de uma diferença de gradiente de concentração. Todavia, evidências de transporte também realizado pelas aquagliceroporinas também existem (Wang et al., 2014), devido à similaridade estrutural do As(III) a moléculas normalmente transportadas por essas proteínas, como certos poliálcoois (Kalia and Joshi, 2009). O conteúdo intracelular de As é geralmente determinado pela diferença entre a taxa de influxo de As e a taxa de efluxo (Garbinski et al., 2019; Yang et al., 2012). Em geral, algumas bactérias possuem capacidade de reduzir o As(V) a As(III), para, em seguida, realizar o efluxo do mesmo (Miyashita et al., 2016a), a partir de proteínas permeases (ArsB e ArsA) podendo haver ou não gasto de energia (Garbinski et al., 2019).

Em cianobactérias, alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, bem como genômicas (expressão e regulação) e proteômicas já foram observadas em resposta ao estresse por As (Huertas et al., 2014; Pandey et al., 2013; Srivastava et al., 2009). Não obstante, pouco ou nada se sabe acerca de como linhagens morfológica e ecologicamente distintas de cianobactérias respondem à presença de As no meio de cultivo. O estudo de tais alterações pode ajudar a entender como cianobactérias lidam com a presença de As de um ponto de vista fisiológico e molecular. A compreensão desses processos mostra-se fundamental para o manejo adequado de solos e ou corpos d'água contaminados com As, assim como a prevenção e/ou mitigação de impactos ambientais adversos, gerados pela presença do As no ambiente.

No contexto da contaminação por As no ambiente e seus riscos significativos para a saúde humana, são impostos desafios cruciais para autoridades e pesquisadores na busca por estratégias de mitigação e remediação. Antes disso, também se faz necessário a investigação de organismos que possam lidar com esse contaminante de forma eficiente, se tratando de uma possível aplicabilidade biotecnológica. Considerando a ampla diversidade metabólica das cianobactérias e sua adaptação a ambientes contaminados, este estudo se propõe a avaliar o impacto do arsenito em linhagens desses microrganismos, em busca de entender como alguns

de seus parâmetros metabólicos, fisiológicos e morfológicos se comportam nesse contexto. Foi possível discutir que a presença de estratégias moduladoras do metabolismo em cianobactérias as permite lidar com a exposição ao arsenito. Além disso pudemos investigar a variação na tolerância ao As em linhagens unicelulares em comparação com filamentosas, e também a diferença na tolerância ao As em cianobactérias isoladas de ambientes contaminados em comparação com aquelas de ambientes não contaminados. No capítulo anterior deste trabalho, foram descritas linhagens de cianobactérias morfológicamente, ecologicamente e filogeneticamente distintas. Agora, foi possível avaliar o impacto do arsenito no crescimento, metabolismo, fisiologia e morfologia dessas linhagens. Também foram obtidos parâmetros cinéticos e metabólicos, além de dados morfológicos em um contexto de exposição arsenito. Essa abordagem integrada visa proporcionar *insights* valiosos sobre a adaptação das cianobactérias ao arsenito, contribuindo para estratégias de gestão ambiental e remediação em áreas impactadas por contaminação por arsênio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Seleção das linhagens

Foram selecionadas seis linhagens morfológica e ecologicamente distintas, classificadas em três morfotipos: *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, morfotipo unicelular; *Limnospira platensis* PCC7345 e *Ancylothrix terrestris* CCM-UFV034, morfotipo filamentosos homocitados; e *Nostoc* sp. PCC7120 e *Trichormus flavodiazotum* CCM-UFV035, morfotipo filamentosos heterocitados. Para cada morfotipo, há uma linhagem modelo (PCC) e outra provinda da Coleção de Cianobactérias e Microalgas da Universidade Federal de Viçosa (CCM-UFV). As linhagens selecionadas para estudo encontram-se disponíveis na CCM-UFV e foram previamente caracterizadas (Capítulo 1).

### 2.2 Condições de cultivo do pré-inóculo

As culturas para pré-inóculo foram crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer de 2.000 mL (contendo 1.000 mL de meio BG-11<sub>0</sub>, ou BG-11, a depender da capacidade de realizar a FBN da linhagem). Os frascos, uma vez inoculados, foram mantidos em sala de cultivo para atingirem biomassa suficiente para realização dos experimentos, nas seguintes condições: fotoperíodo 16/8h (claro/escuro), luminosidade de 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 21 °C e agitação a 115 rpm. Após o crescimento, a biomassa foi centrifugada por 10 minutos a 10.000  $\times g$ , a temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. A biomassa residual foi então inoculada aos meios de cultivo correspondentes aos tratamentos com diferentes concentrações de As.

### 2.3 Seleção das concentrações de arsenito para o trabalho

Para a determinação das concentrações de arsenito, curvas de crescimento em resposta ao arsenito foram realizadas com 10 concentrações de As(III), disponível a partir da fonte arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ) (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50; 100; e 500 mM). As curvas foram conduzidas em microplacas de 96 poços, sendo que a cada poço foram adicionados de 250 a 280  $\mu\text{L}$  de meio específico suplementado ou não (condição controle) com as concentrações de As(III) descritas acima, e 20 a 50  $\mu\text{L}$  de inóculo, tendo duração de 7 dias, nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. O volume de inóculo a ser utilizado dependerá da linhagem e deverá ser suficiente para se atingir uma densidade óptica em comprimento de onda de 750 nm ( $D_{750\text{nm}}$ ) inicial de 0,2.

O crescimento foi avaliado em intervalos de aproximadamente 12 horas, por meio determinação da densidade óptica (absorbância) em comprimento de onda de 750 nm ( $D.O_{750nm}$ ). As concentrações de As(III) ideais de trabalho foram escolhidas a partir do impacto no crescimento, buscando por reduções de aproximadamente 50 % na  $OD_{750nm}$  de ao menos uma das duas linhagens do mesmo morfotipo.

#### **2.4 Curvas de crescimento sob diferentes concentrações de Arsênio**

A partir das concentrações de arsenito previamente selecionadas no tópico 2.3., foram realizadas curvas de crescimento para as seis linhagens. Desta forma, foram obtidos os perfis e parâmetros de crescimento, bem como biomassa para análises futuras. Os experimentos foram conduzidos em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio para os 3 primeiros pontos amostrais, e 125 mL contendo 60 mL de meio para os demais pontos, os quais foram mantidos nas condições descritas anteriormente. O crescimento das linhagens foi mensurado por meio de densidade óptica por espectrofotômetro em comprimento de onda de 750 nm ( $DO_{750nm}$ ) durante 5 dias, sendo a  $DO_{750nm}$  inicial (ponto 0) = 0,2. As aferições foram feitas diariamente e em quadruplicatas. Após leitura no espectrofotômetro, 10 mL de cultura de cada amostra foram separados, filtrados em membrana de nitrocelulose previamente secas e pesadas (poro de 0,22  $\mu m$ ). As membranas contendo as biomassas filtradas foram em seguida secas e pesadas para obtenção da massa seca e produtividade.

#### **2.5 Análises bioquímicas**

Para as análises bioquímicas, a biomassa presente em cada repetição de cada tratamento foi centrifugada a  $13.000 \times g$ , a 4°C. O sobrenadante foi reservado para quantificação do As, e o pélete transferido para microtubos de 2 mL. Em seguida, o material foi congelado em nitrogênio líquido e seco em liofilizador. Após liofilização, as biomassas foram pesadas em balança de precisão e aliqüotadas (4 a 9 mg) em microtubos de 2,0 mL.

Para a extração metanólica, aos microtubos com biomassa foram adicionados 700  $\mu L$  de metanol (100 %), os quais foram aquecidos a 80 °C sob agitação de 500 rpm por 20 minutos (adaptado de Liseć et al. 2006). O extrato metanólico foi centrifugado a  $19.000 \times g$  por 10 minutos, a 4°C. A partir do sobrenadante foram

quantificados clorofila *a* e aminoácidos. Já o pélete foi usado para quantificação de proteínas totais e glicogênio.

Para a determinação de clorofila *a*, 100  $\mu\text{L}$  de metanol foram acrescentados a 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. Em seguida, determinou-se a densidade óptica deste extrato nos comprimentos de onda 653 e 666 nm ( $\text{DO}_{653\text{nm}}$  e  $\text{DO}_{666\text{nm}}$ ) em leitor de microplacas (Versa max, Molecular Devices) (Porra et al., 1989). O volume restante foi lavado (para retirada de pigmentos) com a adição de 375  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 750  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Em seguida, o material foi centrifugado a  $19.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , levando a formação de um novo pélete. A fase aquosa formada (na qual se encontram os metabólitos de interesse) foi posteriormente transferida para outro microtubo de 1,5 mL para quantificação de aminoácidos. Para tal quantificação, 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram transferidos para poços individuais em microplaca de 96 poços, aos quais foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio (1 M e  $\text{pH} = 5,2$ ) + ascorbato 0,02 % e 100  $\mu\text{L}$  de niidrina. As microplacas foram seladas e aquecidas a  $90^\circ\text{C}$  por 20 minutos e em seguida resfriadas a temperatura ambiente, tendo então sua absorbância determinada a 570 nm ( $\text{DO}_{570\text{nm}}$ ) em leitor de microplacas (Versa max, Molecular devices) (Cross et al., 2006).

Por sua vez, o pélete obtido para quantificação de proteínas totais e glicogênio, foi lavado com 1 mL de etanol (70 %), com a subsequente adição de NaOH (0,1 M) e aquecido a  $95^\circ\text{C}$  para extração de proteínas. Nos poços das microplacas foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de solução Bradford acrescentados de 5  $\mu\text{L}$  de amostra de suspensão de proteínas, sendo a absorbância determinada a 595 nm ( $\text{DO}_{595\text{nm}}$ ) em leitor de microplacas (Versa max, Molecular devices) (Bradford, 1976). Para a quantificação de glicogênio, procedeu-se com a neutralização da amostra, com a adição de ácido acético (1M) ao pélete residual. Em seguida a suspensão teve a sua absorbância determinada em comprimento de onda 340 nm (Ferne et al., 2001).

## **2.6 Quantificação de arsênio total no sobrenadante**

Para a quantificação do arsênio total no meio de cultivo, o sobrenadante das amostras coletadas para as análises metabólicas foi reservado, filtrado em membrana de nitrocelulose (poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) e mantido a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente o filtrado foi acidificado com HCl 12 N (Ácido clorídrico P.A - A.C.S – 37%) na proporção de 10  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de amostra. Essa amostra foi então submetida a um espectrômetro de absorção atômica (modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation) para a quantificação

realizada no software AAPc (Curva de calibração 0 - 50 mg·L<sup>-1</sup>), no Laboratório de Biofísica Ambiental (UFV).

## **2.7 Análises de microscopia**

Para a avaliação de possíveis impactos e alterações na morfologia nas células expostas ao arsenito, além da quantificação desse elemento nas amostras, foram realizadas observações em Microscópio eletrônico de varredura (SEM) e análises de Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), essas sendo realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV). Também, foi avaliado a produção de Exopolissacarídeos (EPS) pelas linhagens a partir de observações em microscópio ótico de luz (Zeiss Axioskop 40), com lâmina coradas com Nankin.

Para as análises de SEM e EDS, 40 mL do cultivo das culturas das linhagens expostas aos tratamentos de arsenito foram centrifugados a 13.000 × *g* por 5 minutos a 4 °C, e os péletes celulares liofilizados. Essas amostras foram coletadas no momento do inóculo, com 72h e 120h de duração dos experimentos.

### **2.7.1 Microscópio eletrônico de varredura (SEM)**

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, os péletes celulares liofilizados foram secados em liofilizador (CoolSafe), cobertos com carbono (15 nm de espessura) (Quorum, Q150RS, United Kingdom) (Berger et al., 2016), e analisados no microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP (Carl Zeiss, United Kingdom) a 20 kV.

### **2.7.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)**

Para avaliar a distribuição química dos elementos nas amostras durante os experimentos, e mais precisamente da proporção de As associado às células, a biomassa liofilizada das linhagens foi coberta com carbono (15nm de espessura) em um evaporador (Quorum Q150T-E, United Kingdom) e analisada com uma microsonda de raios-X (X-EDS, IXRF Systems, USA) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP (Carl Zeiss, United Kingdom). A distribuição dos elementos foi normalizada pela distribuição de carbono, oxigênio e nitrogênio (Ladeira et al., 2020).

### **2.7.3 Microscopia óptica de luz com coloração de Nankin**

A análise de microscopia óptica de luz com coloração de Nankin foi utilizada para avaliar a produção de EPS (Exopolissacarídeo). Inicialmente, as linhagens foram cultivadas em condições padrões como descritos anteriormente. Após o período de crescimento, uma alíquota da cultura foi coletada ao fim das curvas de crescimento e as lâminas foram então coradas com Nankin. Por fim, as preparações foram observadas em um microscópio óptico de luz (Zeiss Axioskop 40). Para as linhagens unicelulares, também foi mensurado o diâmetro da camada de EPS ao redor das células.

### **2.8 Análise estatística dos dados**

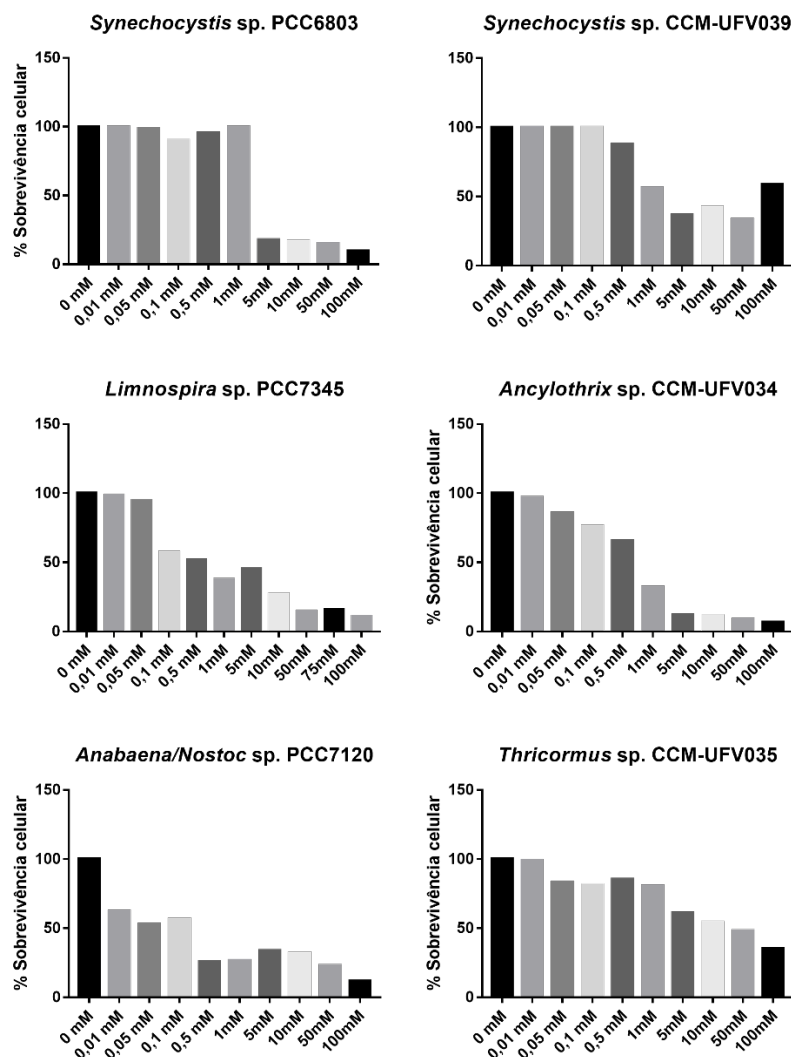
Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições em cada tratamento. Os dados foram examinados estatisticamente usando o teste Tukey, e testados quanto a diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) usando o teste t. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de bibliotecas Rbio, do software R. v4.3.1.

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Concentração apropriada de arsenito

Através das curvas de crescimento geradas no experimento em microplacas com as seis linhagens submetidas à dez concentrações de arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ) (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50; 100; e 500 mM), foi realizada uma análise de porcentagem de sobrevivência celular (Figura 1). De forma simplificada, o valor de  $\text{DO}_{750\text{nm}}$  dos controles foram divididos pelo valor dos demais tratamentos da mesma placa, sendo o valor de 100% de sobrevivência celular o próprio controle. Essa análise mostrou que as linhagens aqui utilizadas possuem diferentes faixas de tolerância ao arsenito, tanto para diferentes morfotipos, quanto dentro de um mesmo morfotipo.

**Figura 1.** Taxa de sobrevivência celular (%) nas linhagens de cianobactéria em estudo.



No eixo X, as concentrações de arsenito (mM) utilizadas no trabalho. No eixo Y, a % de sobrevivência celular calculada como descrito (Tópico 2.3).

Em relação às linhagens unicelulares, a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 mostrou uma alta tolerância a suplementação de arsenito apresentando sobrevivência celular (entre 90% e 100%) até a concentração de 1mM arsenito de sódio, caindo drasticamente (~17,9%) na concentração de 5mM. Já para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, foi possível observar uma relação linear entre a concentração de arsenito e a de sobrevivência celular, especificamente na faixa de 0,1mM a 1mM de arsenito, onde a concentração 1mM atingiu um valor próximo a 50% redução de sobrevivência celular (56,3%), sendo 1,6mM a concentração máxima escolhida para as próximas análises entre as linhagens unicelulares.

Para as linhagens homocitadas e heterocitadas, a redução da  $DO_{750nm}$  em relação às concentrações de arsenito foi mais visível para as linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *L. platensis* PCC7345, onde observou-se redução de aproximadamente 50% nos valores e  $DO_{750nm}$  próximo às concentrações de 0,05mM e 0,1mM de arsenito; assim, a concentração máxima de 0,1mM de arsenito foi escolhido para as análises subsequentes entre as linhagens heterocitadas.

Junto às concentrações máximas estipuladas (1,6mM para as cianobactérias unicelulares e 0,1mM para as filamentosas), foi também utilizada uma concentração equivalente a 10% de arsenito em relação às concentrações máximas, 0,16mM e 0,01mM para as linhagens unicelulares e filamentosas, respectivamente, onde se buscava pouco ou nenhum efeito do arsenito sobre a  $D.O_{750nm}$ . Neste contexto, buscava-se investigar possíveis alterações metabólicas/fisiológicas dentro de uma concentração “tolerável” de arsenito, na qual efeitos sobre a  $D.O_{750nm}$  não fossem tão pronunciados.

### **3.2 Curva de crescimento e dados cinéticos das linhagens submetidas as concentrações de arsenito selecionadas**

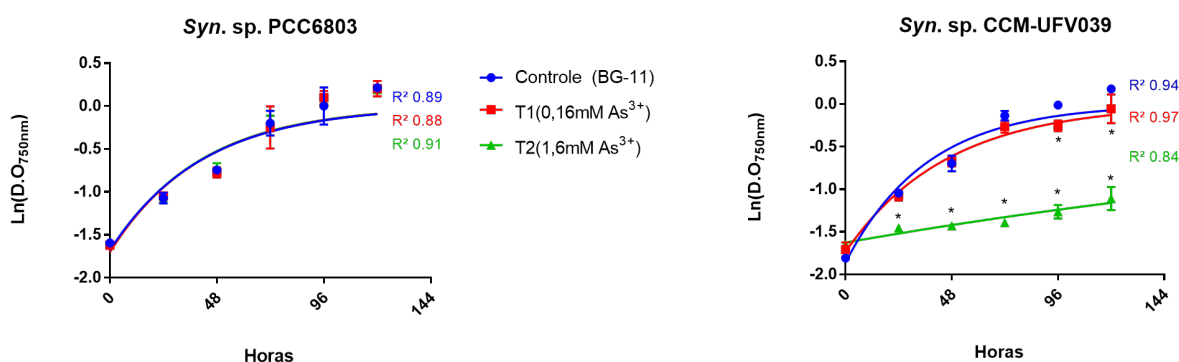
Com as concentrações definidas, foram realizadas curvas de crescimento para as linhagens em estudo, para a obtenção de parâmetros cinéticos de crescimento e produção de biomassa para as análises metabólicas e de microscopia.

#### **3.2.1 Linhagens unicelulares, *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039**

As curvas de crescimento para as linhagens unicelulares apresentaram uma duração de 6 dias. Não foi possível observar uma fase lag característica nas curvas geradas. Ambas linhagens apresentaram uma fase logarítmica de aproximadamente 3 dias. As linhagens unicelulares apresentaram um padrão bem similar de

crescimento, exceção essa ao tratamento com a maior concentração de arsenito (Tratamento 2 – 1,6mM) o qual apresentou uma resposta bem distinta entre às linhagens a essa exposição (Fig. 2). Para a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803, não houve diferenças na  $DO_{750nm}$  entre nenhum dos tratamentos; porém, para linhagem *Synechocystis* sp CCM-UFV039, foram encontradas diferenças significativas na  $DO$  nos dois últimos pontos amostrais do tratamento 1 (Tratamento 1 - 0,16mM), e em todos pontos do tratamento 2 (T2 - 1,6mM) em relação ao controle. A concentração de 1,6mM de arsenito levou a reduções significativas do crescimento da linhagem *Synechocystis* sp CCM-UFV039.

**Figura 2.** Curvas de crescimento das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.



No eixo Y, os valores da  $\text{Ln}(D.O_{750nm})$ . No eixo X, a duração do experimento em horas (h). Os pontos no gráfico se referem à medição da  $D.O_{750nm}$ . A linha foi gerada a partir de uma curva de ajuste do modelo não linear de crescimento exponencial. As leituras estatisticamente diferentes ( $p=0,05$ ) estão destacadas com um asterisco (\*).

A partir da curva de crescimento em resposta ao arsenito, foram também extraídos dados cinéticos de crescimento (tempo de duplicação celular) e produtividade, os quais apresentaram diferenças significativas entre as duas linhagens unicelulares (Tabela 1), especificamente para a linhagem *Synechocystis* sp CCM-UFV039, uma vez mais, no tratamento de 1,6mM de arsenito.

Tabela 1. Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens unicelulares (*Synechocystis*).

	Tempo de duplicação (horas)	
	<i>Synechocystis</i> sp PCC6803	<i>Synechocystis</i> sp CCM-UFV039
Controle	28.85	25.61
Tratamento 1 (0,16mM)	28.51	31.92
Tratamento 2 (1,6mM)	28.25	246.25
produtividade final (mg/mL)		
Controle	0,15 ( $\pm 0,02$ )	0,47 ( $\pm 0,08$ )
Tratamento 1 (0,16mM)	0,17 ( $\pm 0,06$ )	0,33 ( $\pm 0,08$ )
Tratamento 2 (1,6mM)	0,13 ( $\pm 0,01$ )	0,11 ( $\pm 0,04$ )
produtividade diária (mg/mL/dia)		
Controle	0,03 ( $\pm 0,01$ )	0,09 ( $\pm 0,02$ )
Tratamento 1 (0,16mM)	0,03 ( $\pm 0,01$ )	0,07 ( $\pm 0,02$ )
Tratamento 2 (1,6mM)	0,03 ( $\pm 0,01$ )	0,02 ( $\pm 0,01$ )

Os valores e tempo de duplicação (TD) foram gerados a partir dos dados da curva de ajuste, do modelo não linear de crescimento exponencial, onde  $TD = \ln(2)/K$ , sendo K a constante de crescimento.

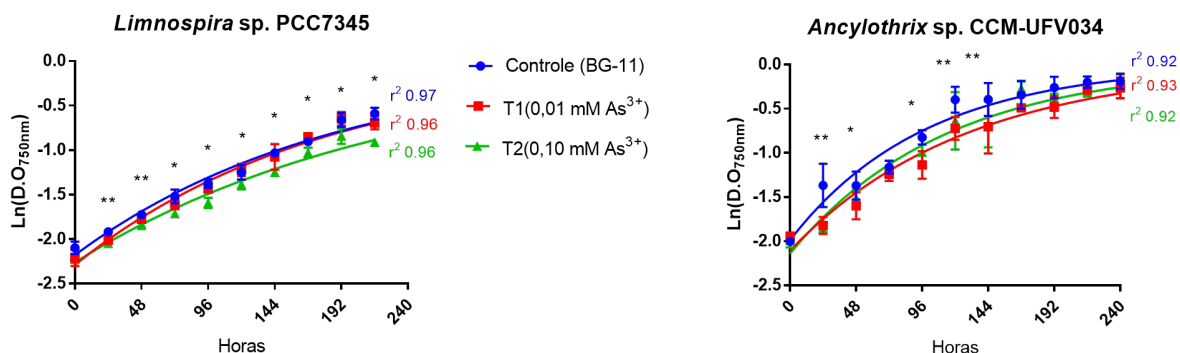
A produtividade encontrada para as linhagens também diferiu em ambas produtividades diárias e totais. Para produtividade total foram encontrados valores na faixa de 0,13 a 0,17 mg/mL para a linhagem *Synechocystis* sp. PCC8603 e 0,11 a 0,47 mg/mL para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039. A maior produtividade foi observada na condição controle para *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, e a menor produtividade na maior concentração de arsenito, para a mesma linhagem.

### 3.2.2 Linhagens homocitadas, *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* sp. CCM-UFV034

Para ambas linhagens homocitadas, a curva de crescimento apresentou uma duração de 10 dias, e também não foi observado uma fase lag (Figura 2). A fase logarítmica apresentou uma duração de aproximadamente 5 dias para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 e 7 dias para a linhagem *L. platensis* PCC7345.

Em se tratando dos efeitos do arsenito no crescimento dessas linhagens, foram observadas alterações menos drásticas em todos tratamentos, para ambas linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034. Foi possível observar também uma redução da D.O durante todo experimento com a adição do arsenito, que se iniciou a partir do segundo dia de experimento, para ambas linhagens. Essa redução da D.O foi observada até o fim do experimento para linhagem *L. platensis* PCC7345, ao passo que para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 observamos uma recuperação da D.O<sub>750nm</sub> em relação ao controle somente ao fim do experimento.

**Figura 3.** Curvas de crescimento das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris*. CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.



No eixo Y, os valores da  $\ln(D.0.750nm)$ . No eixo X, a duração do experimento em horas (h). Os pontos no gráfico se referem à medição da D.0.750nm. A linha foi gerada a partir de uma curva de ajuste do modelo não linear de crescimento exponencial. As leituras estatisticamente diferentes ( $p=0,05$ ) estão destacadas com um asterisco (\*).

Ao se analisar os parâmetros cinéticos, especificamente o tempo de duplicação, valores na faixa de 125-156 horas para linhagem *L. platensis* PCC7345 e 68 a 89 horas para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 foram encontrados (Tabela 2). Em relação à produtividade total, foram obtidos valores na faixa de 0,18 a 0,51mg/mL para a linhagem *L. platensis* PCC7345 e 0,40 a 0,44mg/mL para *A. terrestris* CCM-UFV034, tendo a linhagem modelo, *L. platensis*, apresentado maiores efeitos sobre a produtividade na maior concentração de arsenito (T2).

**Tabela 2.** Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens homocitadas (Oscillatoriales).

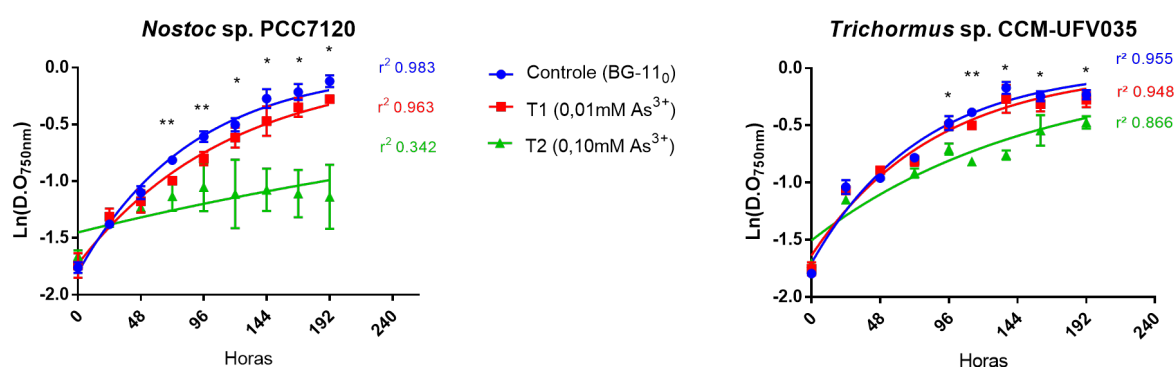
	Tempo de duplicação (horas)	
	<i>L. platensis</i> PCC7345	<i>A. terrestris</i> CCM-UFV034
Controle	130.08	68.30
Tratamento 1 (0,01mM)	125.88	89.04
Tratamento 2 (0,1mM)	159.98	78.29
	produtividade final (mg/mL)	
Controle	0,50 ( $\pm 0,10$ )	0,44 ( $\pm 0,04$ )
Tratamento 1 (0,01mM)	0,51 ( $\pm 0,09$ )	0,40 ( $\pm 0,07$ )
Tratamento 2 (0,1mM)	0,18 ( $\pm 0,05$ )	0,44 ( $\pm 0,06$ )
	produtividade diária (mg/mL/dia)	
Controle	0,06 ( $\pm 0,01$ )	0,05 ( $\pm 0,04$ )
Tratamento 1 (0,01mM)	0,06 ( $\pm 0,01$ )	0,04 ( $\pm 0,08$ )
Tratamento 2 (0,1mM)	0,02 ( $\pm 0,01$ )	0,05 ( $\pm 0,07$ )

Os valores e tempo de duplicação (TD) foram gerados a partir dos dados da curva de ajuste, do modelo não linear de crescimento exponencial, onde  $TD = \ln(2)/K$ , sendo K a constante de crescimento.

### 3.2.3 Linhagens heterocitadas, *Nostoc sp. PCC7120* e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035

Para as linhagens heterocitadas, a curva de crescimento apresentou uma duração de 9 dias. A fase lag não foi observada na maioria dos tratamentos, embora para a linhagem *Nostoc sp. PCC7120* na maior concentração de arsenito (T2), a fase logarítmica apresentou uma duração de 4 a 6 dias.

**Figura 4.** Curvas de crescimento das linhagens *Nostoc sp. PCC7120* e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.



No eixo Y, os valores da Ln(D.0750nm). No eixo X, a duração do experimento em horas (h). Os pontos no gráfico se referem à medição da D.0750nm. A linha foi gerada a partir de uma curva de ajuste do modelo não linear de crescimento exponencial. As leituras estatisticamente diferentes ( $p=0,05$ ) estão destacadas com um asterisco (\*).

Observando os padrões cinéticos de crescimento obtidos das curvas geradas, encontramos valores de duplicação celular de 60 a 348 horas (Tabela 3). Conforme esperado, o menor tempo de duplicação celular foi encontrado no meio sem suplementação de arsenito (Controle) e o maior para o tratamento suplementado com a maior concentração de arsenito (T2).

**Tabela 3.** Tempo de duplicação celular, produtividade diária e total das linhagens heterocitadas (Nostocales).

	Tempo de duplicação (horas)	
	<i>Nostoc sp. PCC7120</i>	<i>T. flavodiazotum</i> CCM-UFV035
Controle	60.07	53.08
Tratamento 1 (0,01mM)	79.58	60.26
Tratamento 2 (0,1mM)	348.24	106.99
	produtividade final (mg/mL)	
Controle	1,68 ( $\pm 0,40$ )	0,46 ( $\pm 0,05$ )
Tratamento 1 (0,01mM)	0,94 ( $\pm 0,16$ )	0,52 ( $\pm 0,06$ )
Tratamento 2 (0,1mM)	0,24 ( $\pm 0,12$ )	0,07 ( $\pm 0,04$ )

	produtividade diária (mg/mL/dia)	
Controle	0,19 ( $\pm 0,04$ )	0,05 ( $\pm 0,01$ )
Tratamento 1 (0,01mM)	0,11 ( $\pm 0,02$ )	0,06 ( $\pm 0,01$ )
Tratamento 2 (0,1mM)	0,03 ( $\pm 0,01$ )	0,01 ( $\pm 0,01$ )

Os valores e tempo de duplicação (TD) foram gerados a partir dos dados da curva de ajuste, do modelo não linear de crescimento exponencial, onde  $TD = \ln(2)/K$ , sendo K a constante de crescimento.

A produtividade total das linhagens heterocitadas, ao fim do experimento, esteve entre 0,24 a 1,68 mg/mL para linhagem *Nostoc* sp. PCC7120, e 0,07 a 0,52 mg/mL para a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. Para produtividade diária, foram encontrados valores entre 0,03 e 0,19 mg/mL/dia para *Nostoc* sp. PCC7120 e 0,01 a 0,06 mg/mL/dia para *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. As maiores produtividades totais e diárias foram obtidas para *Nostoc* sp. PCC7120 no meio sem suplementação de arsenito, e os menores valores de produtividades foram encontrados no tratamento com a maior concentração de arsenito, para *T. flavodiazotum* CCM-UFV035.

### 3.3 Análises bioquímicas

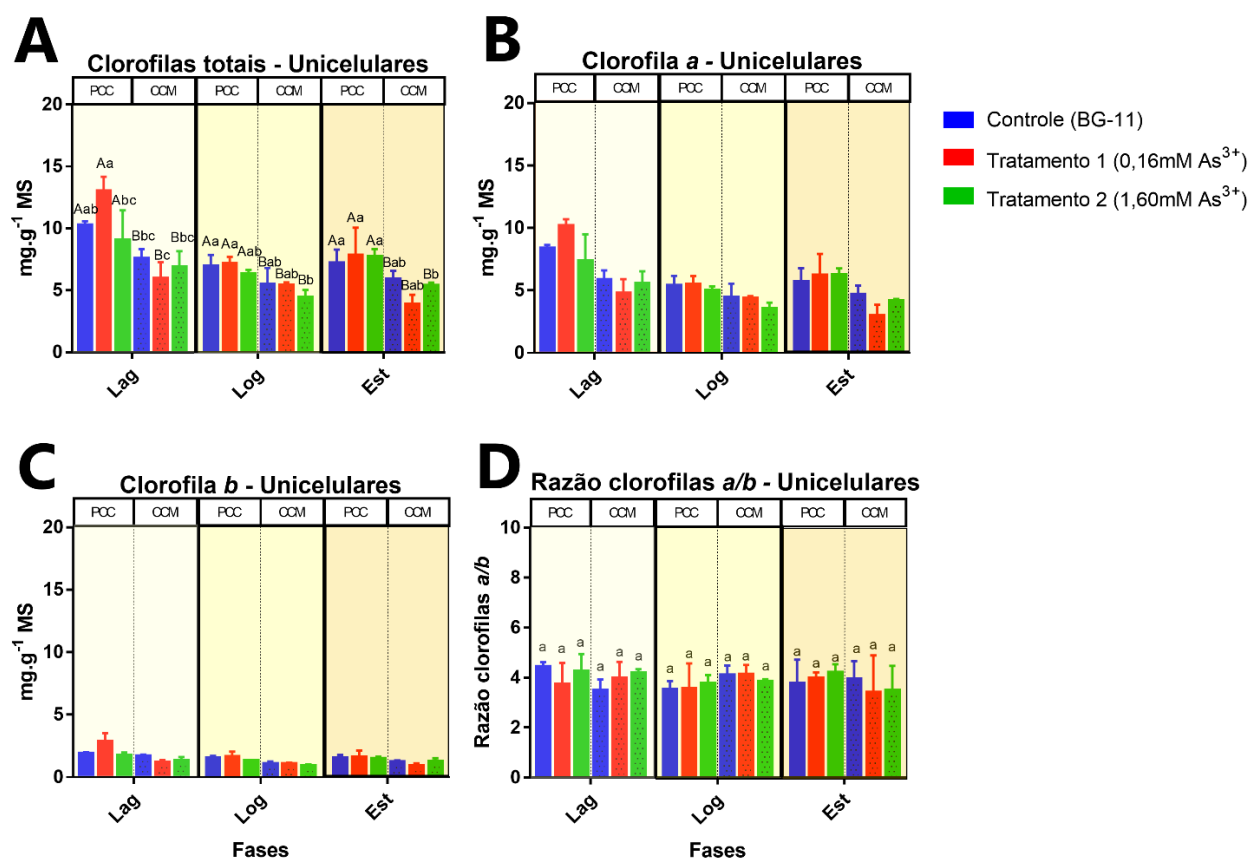
As análises bioquímicas foram realizadas em três pontos amostrais ao longo das curvas de crescimento, mais especificamente os pontos iniciais (0h), chamado de fase Lag (fase inicial/de aclimatação), fase logarítmica (Log) e no início da fase estacionária (Est). Cada morfotipo celular teve estes pontos de análise (fase logarítmica e estacionária) escolhidos de acordo com as respectivas curvas de crescimento. Para as linhagens unicelulares, os pontos respectivos às fases Lag, Log e Est foram de 0h, 48h e 120h. Para as linhagens homocitadas, os pontos de 0h, 120h e 206h e para as linhagens heterocitadas, 0h, 96h e 192h. Todas as coletas foram realizadas ao meio do período luminoso (16:8).

#### 3.3.1 Quantificação das clorofilas totais

A quantificação das clorofilas durante o experimento em meio suplementado com arsenito revelou padrões diferentes para cada morfotipo aqui analisado, assim como a fase de crescimento analisada (Lag, Log e Est). Em se tratando das linhagens unicelulares, *Synechocystis* sp. PCC6803 apresentou maiores conteúdos de clorofilas totais que *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, em todas as fases analisadas (Lag, Log e Est). Os conteúdos de clorofilas totais para linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803

ficaram na faixa de 7,10 a 10,27 mg g<sup>-1</sup> MS para a fase Lag, 6,33 a 7,12 mg g<sup>-1</sup> MS para fase Log (48h) e 7,22 a 7,82 mg g<sup>-1</sup> MS para fase Est (120h) (Figura 5A). Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* variaram de forma proporcional às clorofilas totais para essa linhagem, não sendo encontradas diferenças nas razões clorofilas *a/b* (Figura 5B, C e D).

**Figura 5.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.



No eixo Y dos gráficos, a concentração de clorofilas em mg.g<sup>-1</sup> MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag,Log,Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens. PCC (*Synechocystis* spp. PCC6803) e CCM (*Synechocystis* sp. CCM-UFV039) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

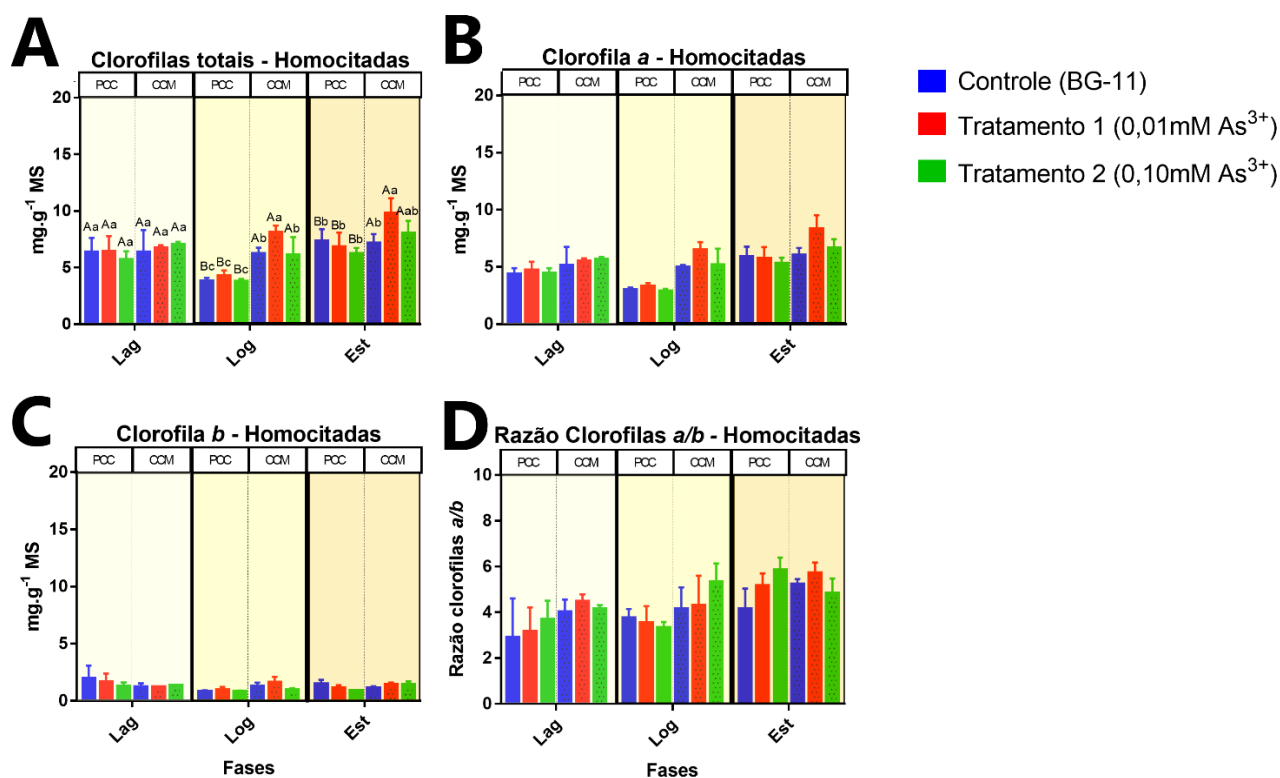
Para *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 os valores de clorofilas totais encontrados ficaram entre 5,94 a 7,56 mg g<sup>-1</sup> MS para a fase Lag, 4,43 a 5,52 mg g<sup>-1</sup> MS para a fase Log e 3,87 a 5,87 mg g<sup>-1</sup> MS para fase Est (Figura 5A). Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* também variaram de forma proporcional às clorofilas totais para essa linhagem (Figura 5B e C) e também não foram observadas diferenças nas razões

clorofilas *a/b* (Figura 5D). Além disso, não foram encontradas diferenças nos conteúdos de clorofilas para essas linhagens nos tratamentos com adição de arsenito.

Já para as linhagens homocitadas, foi possível observar um padrão de conteúdo de clorofilas diferente do observado nas linhagens unicelulares. Junto a isso, foi também observado padrões de alteração distintos para cada espécie de linhagem homocitada. Foi possível observar que as linhagens apresentaram diferenças no conteúdo de clorofilas totais quando comparadas entre si apenas na fase Log e Est, tendo a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 apresentado maiores conteúdos de clorofilas totais nessas fases (Figura 6A).

Para a linhagem *L. platensis* PCC7345, foram encontrados valores na faixa dos 5,69 a 6,38 mg g<sup>-1</sup> MS de clorofilas totais para a fase Lag, 3,75 a 4,26 mg g<sup>-1</sup> MS para fase Log (120h) e 6,23 a 7,35 mg g<sup>-1</sup> MS para fase Est (216h) (Figura 6A). Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* variaram, de forma proporcional, às clorofilas totais para essa linhagem, não sendo observados diferenças nas razões clorofilas *a/b*. (Figura 6B e C). Também, não foram observadas diferenças nos conteúdos de clorofilas totais nos tratamentos com arsenito para essa linhagem (Figura 6D).

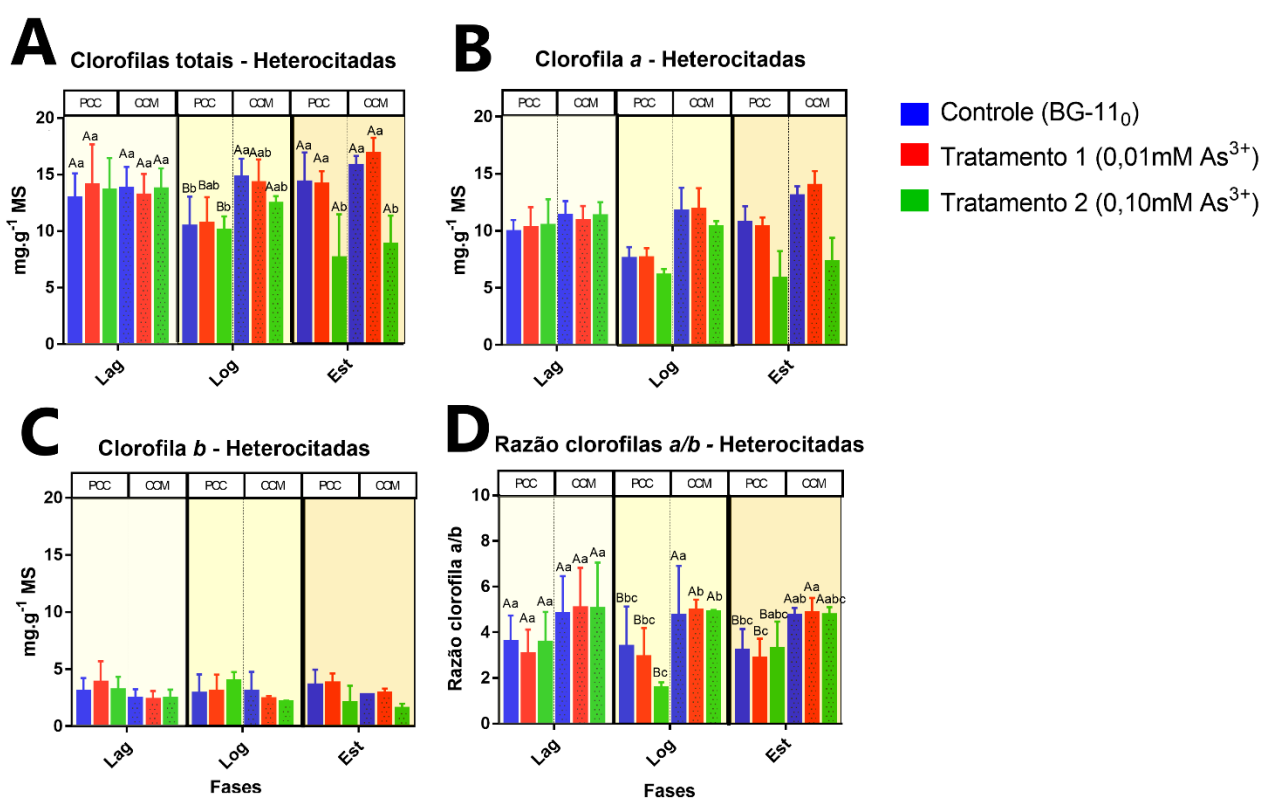
**Figura 6.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.



No eixo Y dos gráficos, a concentração de clorofilas em  $\text{mg.g}^{-1}$  MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag, Log, Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens. PCC (*L. platensis* PCC7345) e CCM (*A. terrestris*. CCM-UFV034) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

Para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034, os valores de clorofilas totais variaram entre 6,37 e 7,02  $\text{mg g}^{-1}$  MS para o ponto inicial (0h), 6,10 a 8,09  $\text{mg g}^{-1}$  MS para o a fase logarítmica(120h), e 7,16 a 9,77  $\text{mg g}^{-1}$  MS para a fase estacionária (216h) (Figura 6A). Foi possível observar que a presença do arsenito culminou em incrementos no conteúdo de clorofilas totais para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034, porém, apenas no Tratamento 1. Esse aumento foi observado tanto na fase Log quanto na fase Est. Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* também variaram, de forma proporcional, às clorofilas totais para essa linhagem, não sendo observados diferenças nas razões clorofilas *a/b*. (Figura 6D).

**Figura 7.** Quantificação das clorofilas totais (*a* e *b*) das linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.



No eixo Y dos gráficos, a concentração de clorofilas em  $\text{mg.g}^{-1}$  MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag,Log,Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens. PCC (*Nostoc* sp. PCC7120) e CCM (*T. flavodiazotum* CCM-UFV035) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

Já para as linhagens heterocitadas, foi possível observar que quando se comparada as médias dos conteúdos de clorofilas totais entre elas, encontramos diferenças apenas na fase Log, tendo a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 apresentado maiores conteúdos de pigmentos. A linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou valores de clorofilas totais de 12,97 a 14,11 mg g<sup>-1</sup> MS para o ponto inicial (0h), 10,09 a 10,69 mg g<sup>-1</sup> MS para fase logarítmica (96h) e 7,63 a 14,35 mg g<sup>-1</sup> MS para fase estacionária (192h) (Figura 7A). Considerando a presença do arsenito no meio de cultivo, foi possível observar reduções nos níveis de clorofilas totais na fase Est para essa linhagem, especificamente no Tratamento 2. Além disso, foi possível observar uma tendência a redução da razão clorofila *a/b* na fase Log para essa linhagem no Tratamento 2.

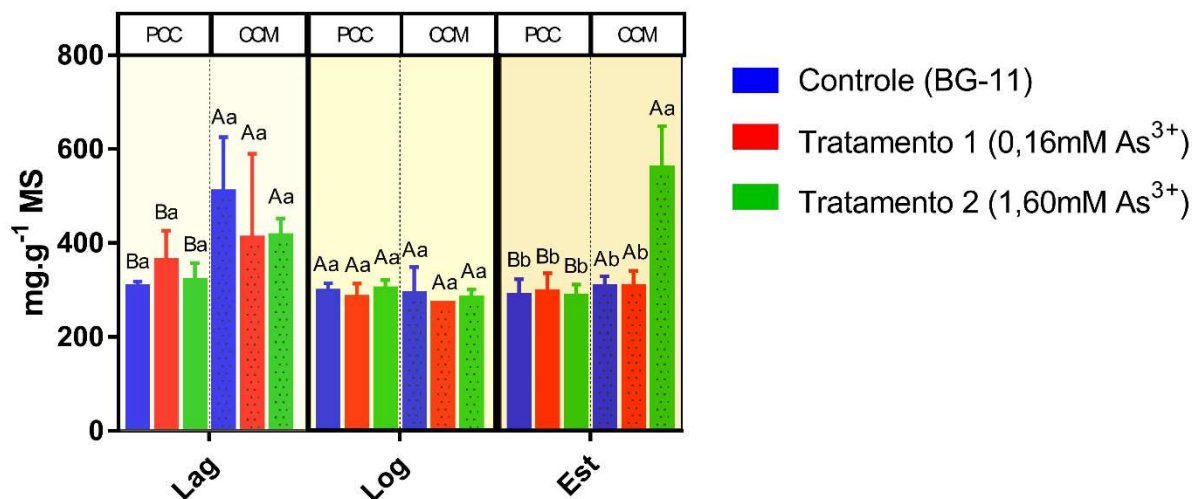
Para linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 foram encontrados valores de clorofilas totais de 13,19 a 13,80 mg g<sup>-1</sup> MS para o ponto inicial (0h), 12,45 a 14,80 mg g<sup>-1</sup> MS para fase logarítmica (96h) e 8,85 a 15,87 mg g<sup>-1</sup> MS para fase estacionária (192h) (Figura 7B). É possível perceber também que para essa linhagem também foi observado uma redução nos conteúdos de clorofilas com a presença do arsenito, no tratamento 2 na fase Est. Não foram observadas alterações nas razões clorofila *a/b* para essa linhagem.

### **3.3.2 Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais**

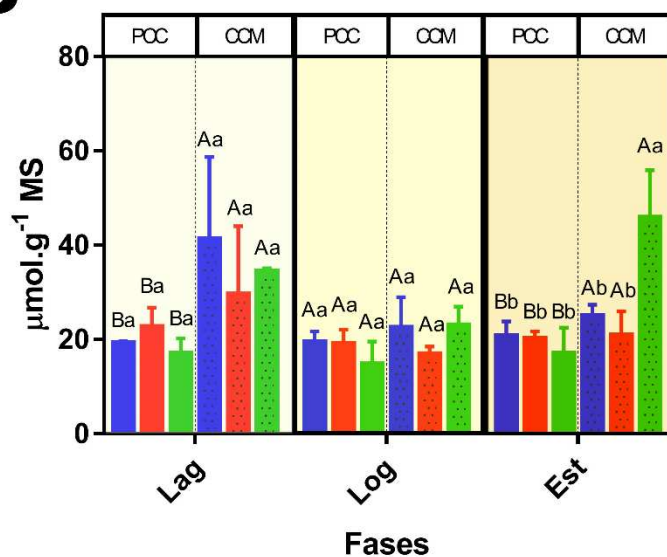
Em relação aos conteúdos de proteínas e aminoácidos, foram também observados valores e padrões distintos para cada uma dos morfotipos celulares aqui estudados.

**Figura 8.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

## A Proteínas solúveis totais - Unicelulares



## B Aminoácidos solúveis totais - Unicelulares



No eixo Y dos gráficos, a concentração das proteínas e aminoácidos solúveis totais, em µmol.g<sup>-1</sup> MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag, Log, Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens PCC (*Synechocystis* spp. PCC6803) e CCM (*Synechocystis* sp. CCM-UFV039) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

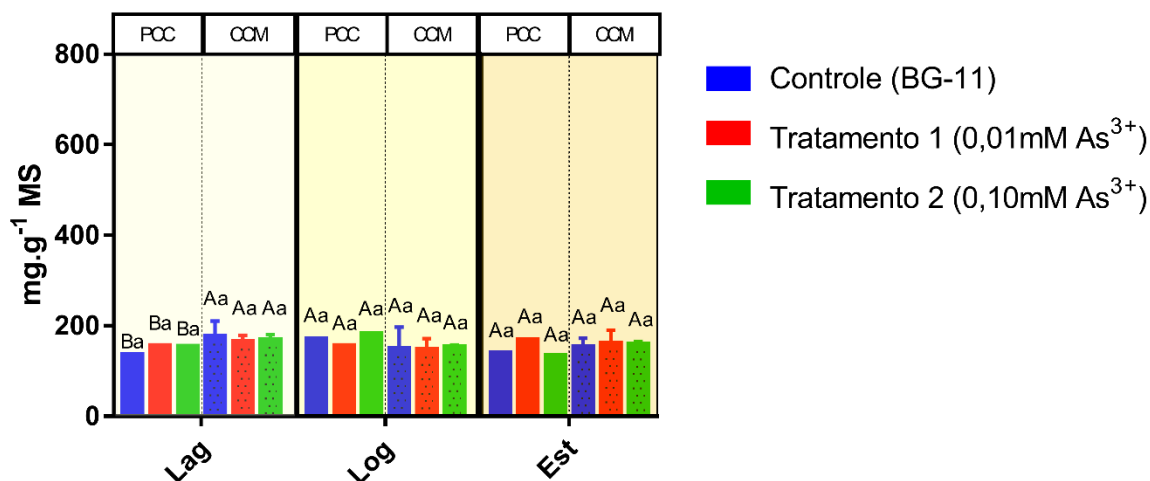
Para as linhagens unicelulares, podemos observar concentrações de proteínas na faixa de 305 a 361 mg g<sup>-1</sup> MS para a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803, em todos os pontos amostrais e tratamentos (Figura 8A). Já para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, uma maior variação nos conteúdos de proteínas totais foi observada, com valores de 271 a 559 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 8A). Para as fases Lag e Est,

a linhagem *Synechocystis*. sp. CCM-UFV039 apresentou maiores conteúdos de proteínas solúveis totais. Analisando a presença do arsenito, observamos um aumento nos conteúdos proteicos para a linhagem *Synechocystis*. sp. CCM-UFV039 na fase Est, no Tratamento 2. Já os conteúdos de aminoácidos encontrados ficaram próximos a 20  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS para *Synechocystis* sp. PCC6803 e de 20 a 40  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS para *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 (Figura 8B). As tendências encontradas para a variação dos conteúdos de aminoácidos solúveis totais foram similares às encontradas para as proteínas, em ambas linhagens, tendo a linhagem *Synechocystis*. sp. CCM-UFV039 apresentado maiores conteúdos de aminoácidos na fase Lag e Est que *Synechocystis*. sp. PCC6803, além de um aumento nos níveis desse metabólito com a presença do arsenito no Tratamento 2 na fase Est.

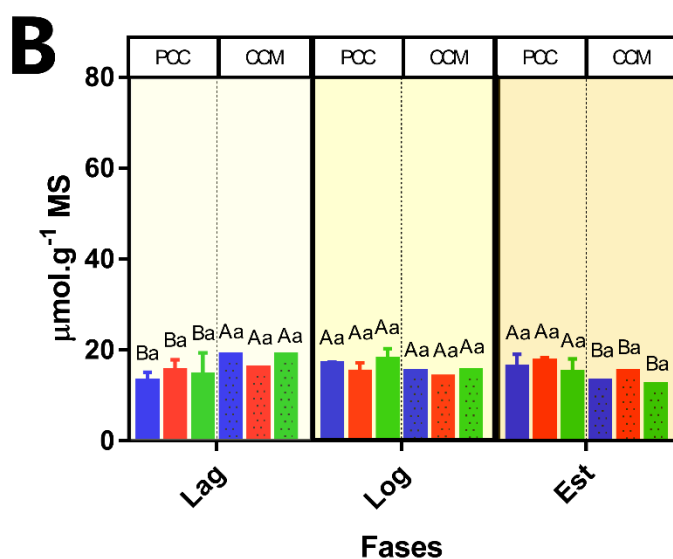
Em relação as linhagens homocitadas, foram encontrados teores de proteínas de 134 a 182  $\text{mg g}^{-1}$  MS para *L. platensis* PCC7345 e de 147 a 176  $\text{mg g}^{-1}$  MS para *A. terrestris* CCM-UFV034 (Figura 9A). Diferenças entre os conteúdos de proteínas entre essas linhagens foram observados apenas na fase Lag. Além disso, não foram observadas diferenças no conteúdo de proteínas solúveis totais na presença de arsenito para essas linhagens.

**Figura 9.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestres* CCM-UFV034 em meio BG-11 suplementado com arsenito.

### A Proteínas solúveis totais - Homocitadas



### B Aminoácidos solúveis totais - Homocitadas

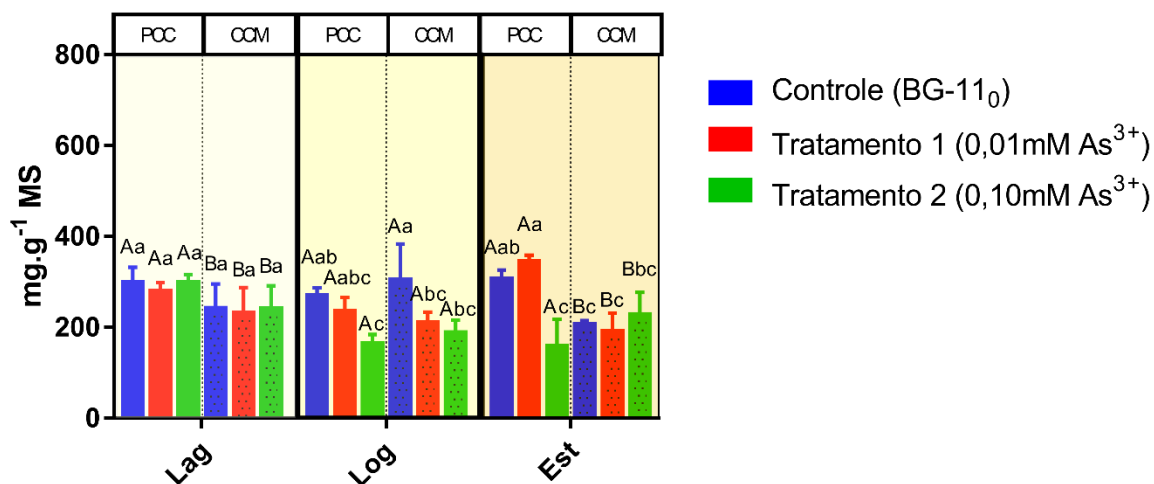


No eixo Y dos gráficos, a concentração das proteínas e aminoácidos solúveis totais, em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag, Log, Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens: PCC (*L. platensis* PCC7345) e CCM (*A. terrestris*, CCM-UFV034) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

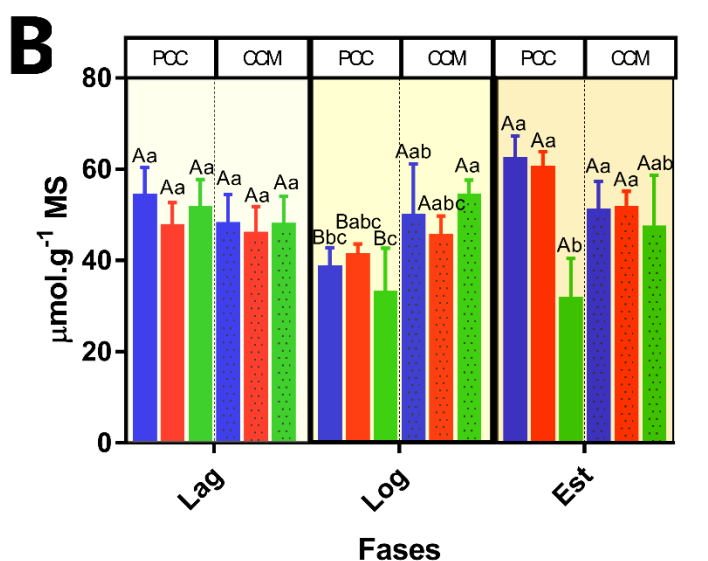
Ao se analisar o conteúdo de aminoácidos solúveis totais, valores similares foram observados para ambas linhagens homocitadas, na faixa de 12 a 18  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS (Figura 9b). Diferenças entre as linhagens foram observadas para a fase Lag e Est, ao passo que não foram encontradas alterações nos tratamentos com adição de arsenito.

**Figura 10.** Quantificação das proteínas e aminoácidos solúveis totais das linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em meio BG-11<sub>0</sub> suplementado com arsenito.

## A Proteínas solúveis totais - Heterocitadas



## B Aminoácidos solúveis totais - Heterocitadas



No eixo Y dos gráficos, a concentração das proteínas e aminoácidos solúveis totais, em μmol.g<sup>-1</sup> MS. No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag, Log, Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens. PCC (*Nostoc* sp. PCC7120) e CCM (*T. flavodiazotum* CCM-UFV035) respectivamente. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

Para as linhagens heterocitadas, os conteúdos de proteínas solúveis totais ficaram na faixa de 157 a 344 mg g<sup>-1</sup> MS para linhagem *Nostoc* PCC7120 e 187 a 303 mg g<sup>-1</sup> MS para *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 (Figura 10A). Foi possível observar também que a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou conteúdos superiores de proteínas solúveis totais que a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, em todas

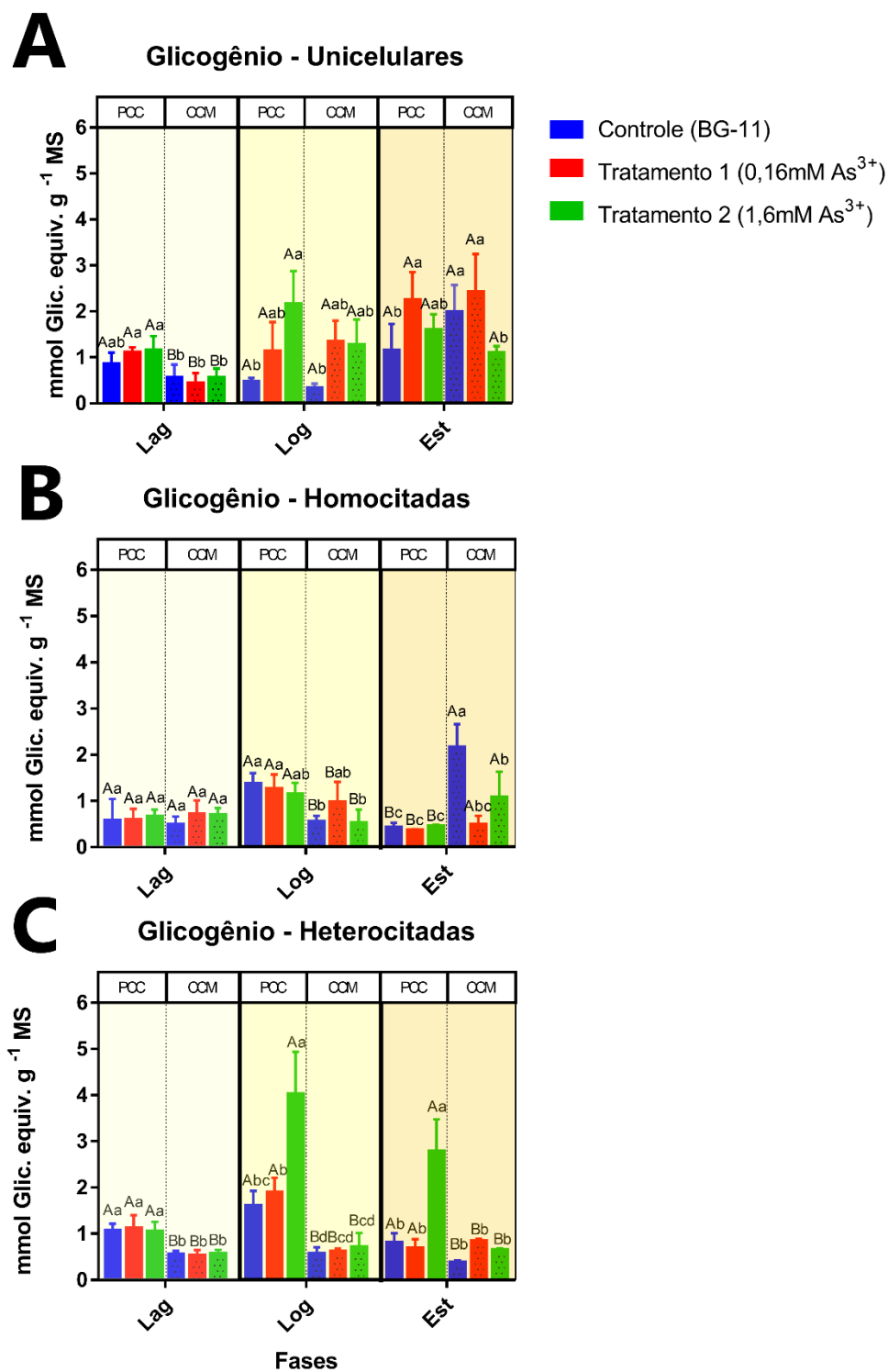
fases de crescimento (Lag, Log e Est). Em adição, foi possível observar reduções nos conteúdos de proteínas totais nos tratamentos com arsenito para ambas linhagens, especificamente na fase Log. Na fase Est, essa redução foi observada apenas para a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 no Tratamento 2.

Em relação aos conteúdos de aminoácidos, os valores encontrados foram 31 a 62 e 45 a 54 mg g<sup>-1</sup> MS para *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, respectivamente (Figura 10B). As linhagens apresentaram diferenças entre elas nos níveis desse metabólito apenas na fase Log. Foi também possível observar uma redução nos conteúdos de aminoácidos solúveis totais para a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 no tratamento 2 na fase Est, acompanhando o padrão encontrado para as proteínas.

### 3.3.3 Glicogênio

As linhagens unicelulares apresentaram padrões similares de resposta, porém com algumas diferenças entre as diferentes espécies utilizadas no que respeita o conteúdo de glicogênio. Assim, os conteúdos de glicogênio ficaram na faixa de 0,46 a 2,36 mmol Glicogênio equivalente g<sup>-1</sup> MS para linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803, e 0,33 a 2,41 mmol Glic. Equiv. g<sup>-1</sup> MS para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039. A linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 apresentou maiores níveis de glicogênio que a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apenas na fase Lag. Também observamos que a presença do arsenito culminou em incrementos nos conteúdos de Glicogênio, para ambas linhagens na fase Lag, e redução nos conteúdos desse metabolito para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 no Tratamento 2.

**Figura 11.** Quantificação dos conteúdos de glicogênio das linhagens em estudo em meio suplementado com arsenito.



No eixo Y dos gráficos, a concentração de glicogênio equivalente em  $\text{nmol.g}^{-1} \text{MS}$ . No eixo X, as fases de crescimento onde foram realizadas as coletas para as quantificações (Lag, Log, Est). Dentro de cada fase, separados pela linha tracejada, as linhagens em estudo. As letras maiúsculas representam a diferença das médias entre as linhagens dentro de cada fase. As letras

minúsculas, representam a diferença das médias entre os tratamentos de cada linhagem em cada tratamento (interação AxB), dentro de uma mesma fase.

Para as linhagens homocitadas analisadas, foram encontradas tendências diferentes de resposta ao arsenito. A linhagem *L. platensis* PCC7345 apresentou valores de 0,36 a 1,37 mmol Glic. Equiv. g<sup>-1</sup> MS, enquanto a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 0,45 a 2,15 mmol Glic Equiv. g<sup>-1</sup> MS. Em adição, a linhagem *L. platensis* PCC7345 apresentou maiores conteúdos de glicogênio na fase Log, e menores conteúdos na fase Est, ao se comparar a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034. Considerando os tratamentos com arsenito, observamos também uma redução nos conteúdos de glicogênio apenas para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 em ambos tratamentos na fase Est.

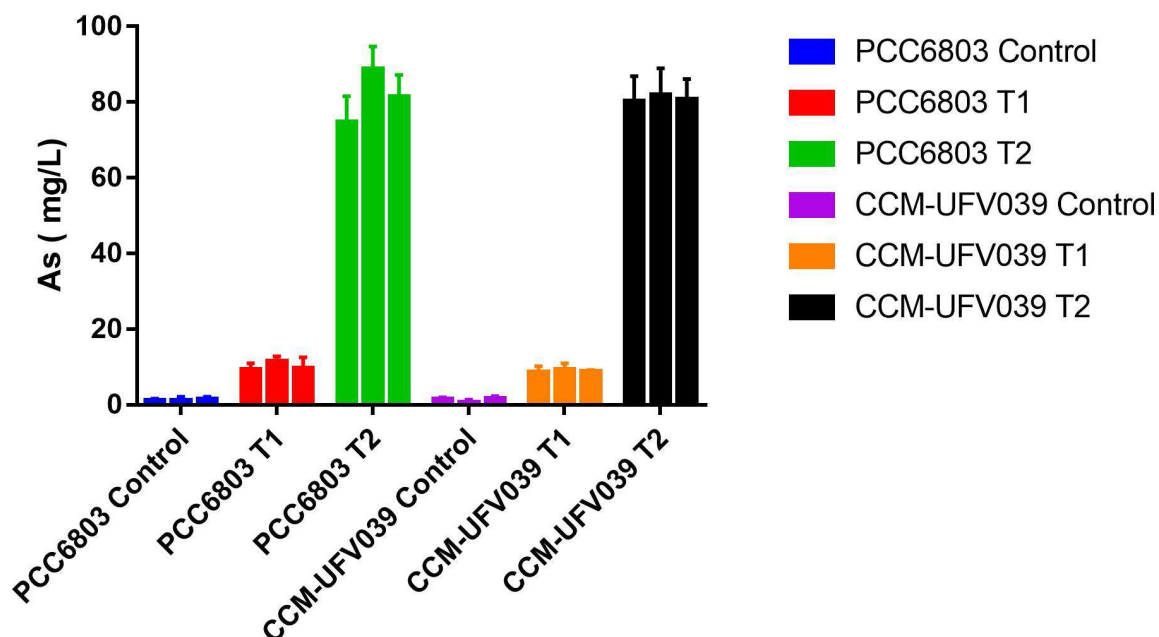
Já as linhagens heterocitadas apresentaram padrão de resposta similares entre as duas espécies aqui analisadas. Assim, a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou maiores conteúdos de glicogênio quando comparada à linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, em todas fases de crescimento (Figura 11). Também observamos um aumento dos conteúdos de glicogênio em resposta à maior concentração de arsenito (Tratamento 2), porém, apenas para linhagem *Nostoc* sp. PCC7120, nas fases Log e Est. Os conteúdos de glicogênio dessas linhagens ficaram na faixa de 0,68 a 4,02 mmol Glic. Equiv. g<sup>-1</sup> MS para linhagem *Nostoc* PCC7120 e 0,37 a 0,83 mmol Glic. Equiv. g<sup>-1</sup> MS para linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035.

### 3.4 Quantificação do As total no sobrenadante

A quantificação do arsênio total encontrado no sobrenadante apresentou valores próximos aos determinados previamente para os experimentos.

Para as concentrações escolhidas no experimento para as linhagens unicelulares, o tratamento 1 (T1) apresentou valores próximos a 10mg/L de arsênio, aproximadamente 0,13 mM de As, e o tratamento 2 (T2) apresentou valores em torno de ~80mg/L de arsênio, ou 1,1 mM de arsênio, confirmando que as linhagens estavam expostas às concentrações similares às propostas. É importante mencionar que não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens, nem entre os pontos amostrais escolhidos durante a duração do experimento.

**Figura 12.** Quantificação do arsênio total no sobrenadante das amostras coletadas durante a curva de crescimento.



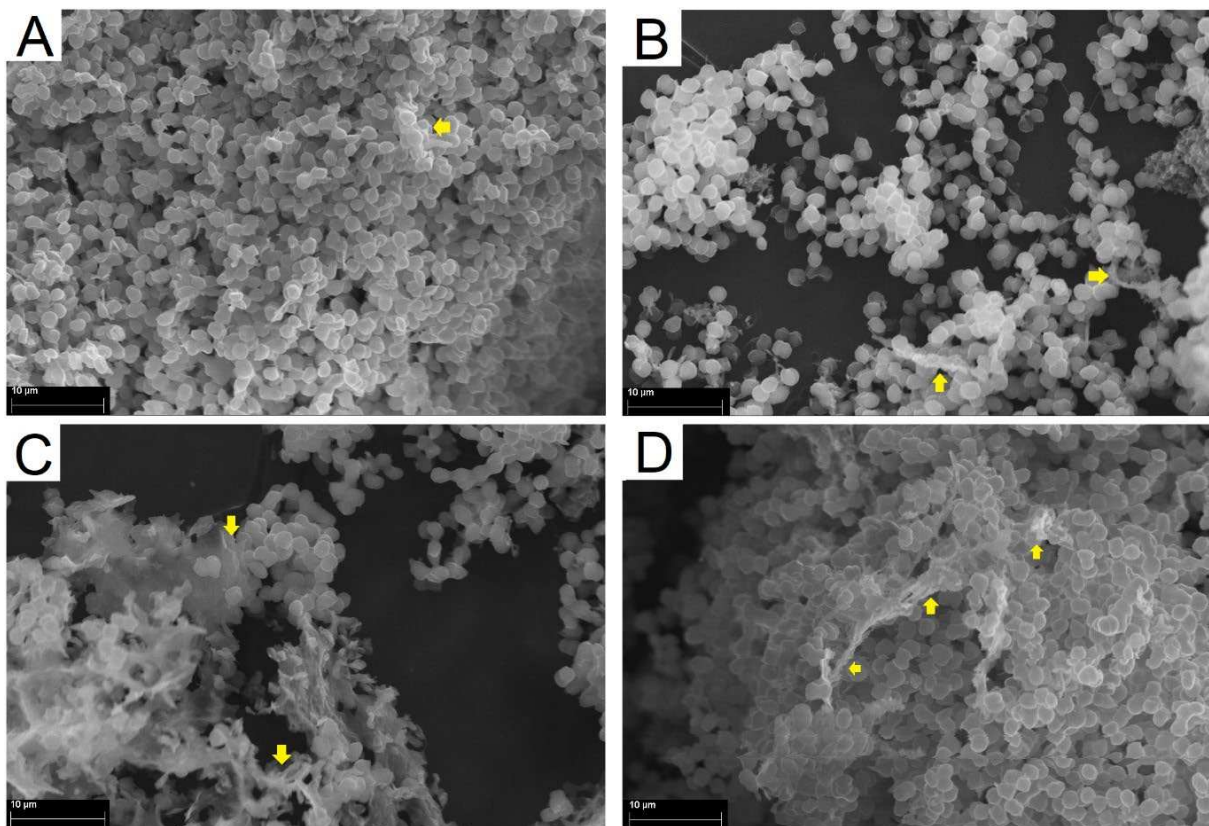
### 3.5 Análises de microscopia

#### 3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

##### 3.5.1.1 Linhagens unicelulares

Análises de microscopia eletrônica de varredura demonstram a morfologia cocóide das linhagens *Synechocystis* (Figura 13 e 14). Cabe registrar que embora as linhagens sejam pertencentes ao mesmo gênero, foi possível observar diferenças no formato celular entre elas. Assim, a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 apresenta uma morfologia bem ovalada e arredondada (Figura 13), ao passo que a *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, além da forma oval, apresenta bordas um pouco mais acentuadas que a *Synechocystis* sp. PCC6803, o que promove um aspecto mais poligonal às suas células (Figura 14).

**Figura 13.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.



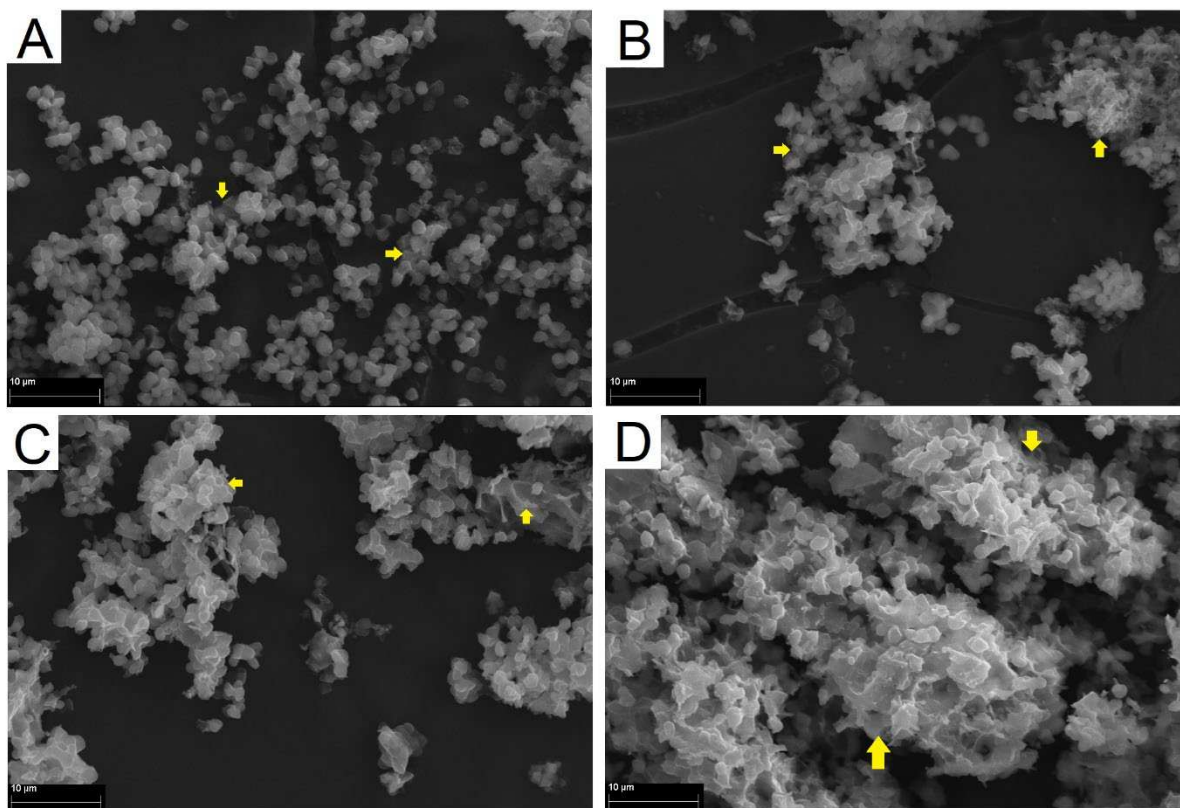
**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,16 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (1,6 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS).

Considerando o aspecto morfológico das células após a exposição ao arsenito, foi possível verificar que as células da PCC6803 se mantiveram intactas com a exposição, tanto para o T1 quanto para o T2 (Figuras 13C e D). Para a linhagem CCM-UFV039, foi possível observar que as suas células apresentam visíveis mudanças morfológicas, com as células já perdendo parte da sua forma original, tanto no T1 e, de modo mais pronunciado, no T2 (Figuras 14C e D). Além da forma irregular das células da CCM-UFV039 expostas ao arsenito, também observamos células rompidas em ambos tratamentos para essa linhagem.

Cabe ressaltar também a presença pronunciada de EPS (matriz mais clara) ao redor das células, para ambas linhagens (Setas Amarelas - Figuras 13 e 14). A partir dessas observações, foi possível observar também uma maior quantidade de EPS nos tratamentos do que no controle. Da mesma forma, esse EPS é também mais pronunciado no tratamento 2 em relação ao tratamento 1 (Setas Amarelas – Figuras 13 e 14C e D). Em adição, a presença de agregados celulares (microcolônias) foi

observada no controle e em todos tratamentos com exposição ao arsenito, sendo ainda mais pronunciado nos tratamentos, envoltos por uma grande matriz de EPS.

**Figura 14.** Fotos microscopia eletrônica de varredura. *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.



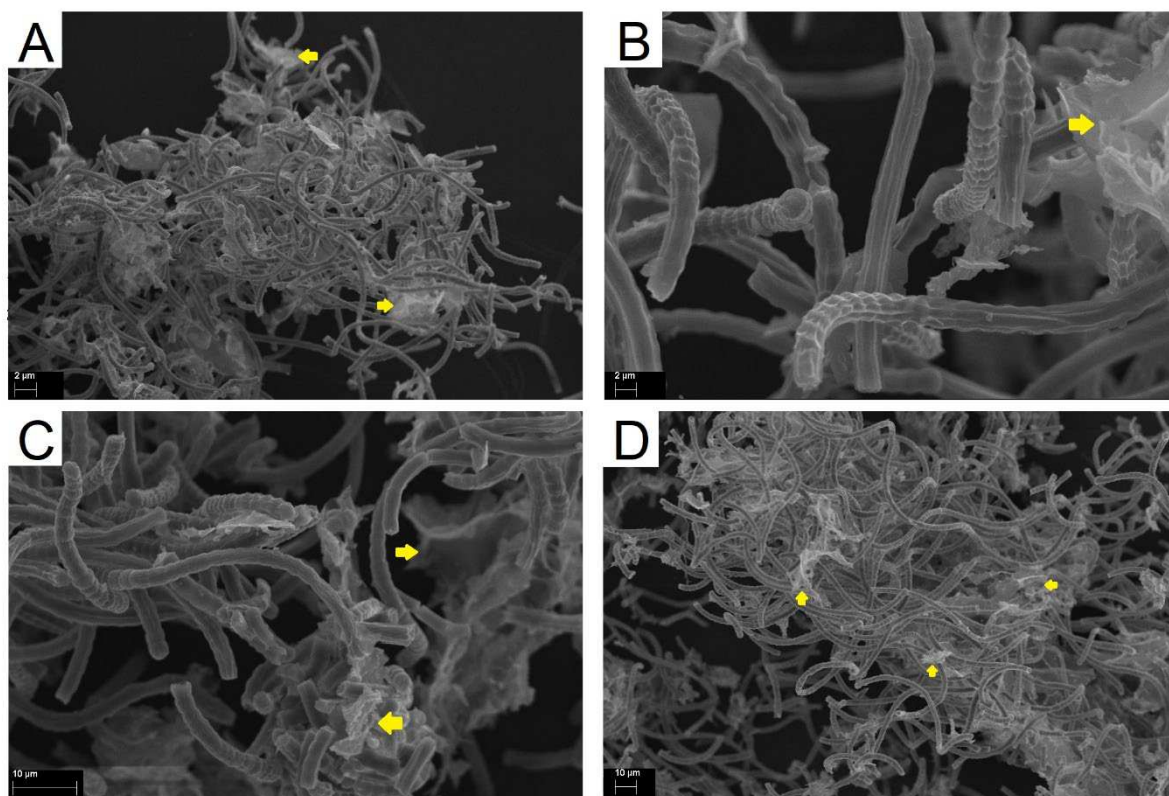
**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,16 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (1,6 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS).

### 3.5.1.2 Linhagens homocitadas

As linhagens homocitadas apresentaram um aspecto bem interessante nas observações por microscopia eletrônica de varredura. Foi possível verificar que os tricomas são caracterizados por uma camada de EPS cobrindo grande parte do filamento, além de uma visível produção de EPS livre (Setas amarelas - Figuras 15 e 16). A linhagem *L. platensis* PCC7345 apresentou tricomas mais curvos e enrolados. As separações das células do tricoma são visíveis, ao menos em algumas regiões (Figura 15). Para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 foram observados tricomas longos, bem retos, e com uma pequena curvatura na ponta de alguns filamentos, característica diacrítica do gênero *Ancylothrix* (Figura 16). Cabe ressaltar que não foi possível observar as separações celulares, ao passo que os tricomas são bem retos e organizados e forma paralela. Também foi observado a presença de estruturas

semelhantes a vilosidades nos tricomas dessa linhagem. Além disso, vemos a pronunciada presença do EPS circundando os tricomas, e de forma livre, com diversos filamentos associados a essa matriz.

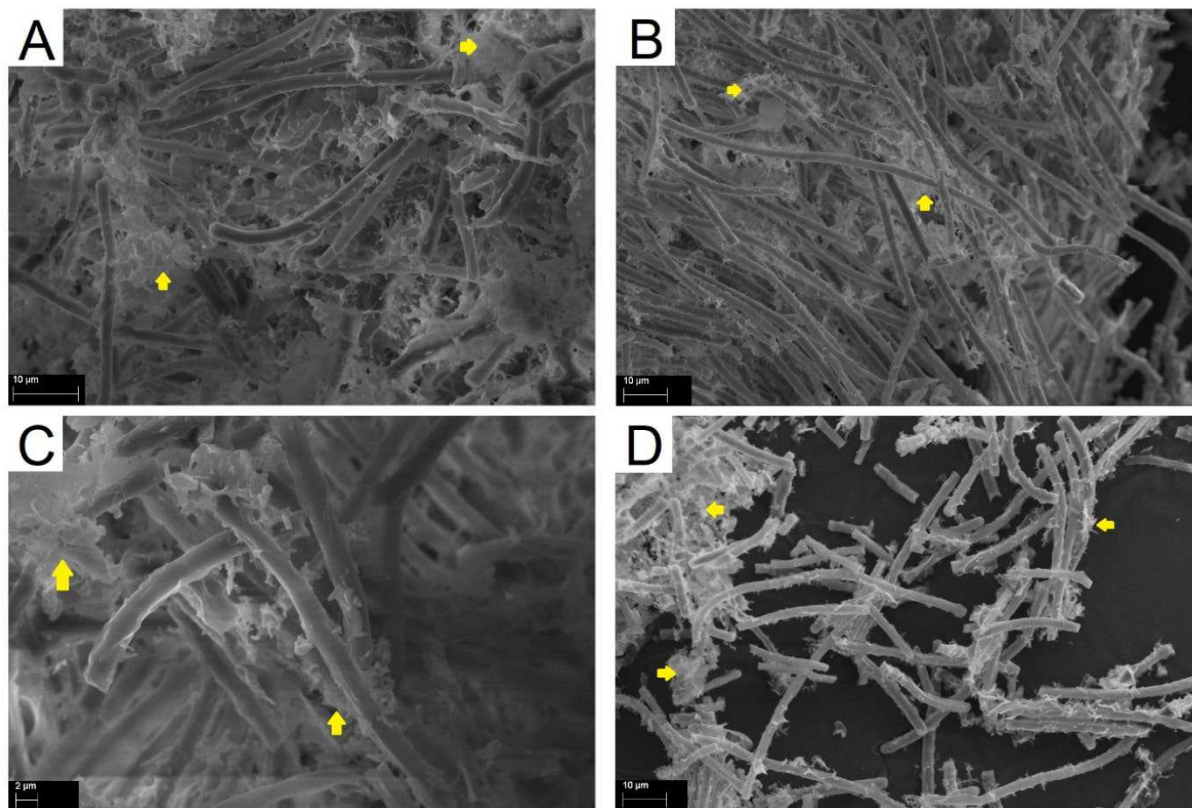
**Figura 15.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *L. platensis* PCC7345 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.



**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,01 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (0,1 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS).

Em relação a presença do arsenito no meio de cultivo desses organismos, foi também possível verificar que as células expostas apresentam um maior padrão de agregamento. Para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 também é observado a presença de diversos tricomas mais curtos ou ainda quebrados (Figura 16D).

**Figura 16.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.

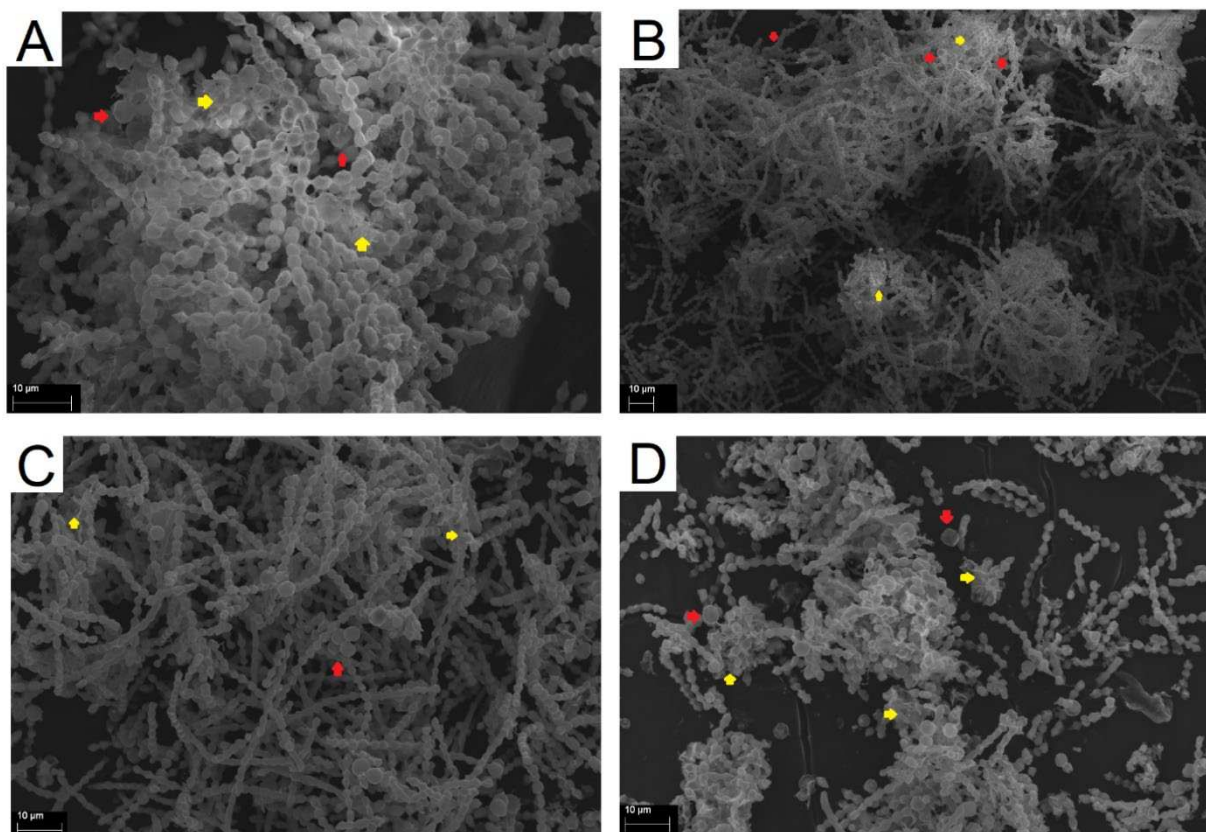


**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,01 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (0,1 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS).

### 3.5.1.3 Linhagens heterocitadas

Para as linhagens heterocitadas, foi possível observar que as linhagens apresentaram um padrão filamentososo, células arredondadas e constrictas, com visíveis células diferenciadas (setas vermelhas - acinetos) (Figura 17). A linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresenta um padrão típico de linhagens desse gênero, já que as células vegetativas possuem uma forma bem definida e delimitada, com os tricomas constrictos. Os heterócitos dessa linhagem são pouco visíveis e com um tamanho semelhante às células vegetativas (Figura 17). Os acinetos também foram observados, com um tamanho também superior aos heterócitos e às células vegetativas (Figura 17 – Setas Vermelhas). A presença de EPS foi observada em microcolônias, tanto no controle para o ponto na fase estacionária, quanto em presença de arsenito (Figura 17 – Setas Amarelas).

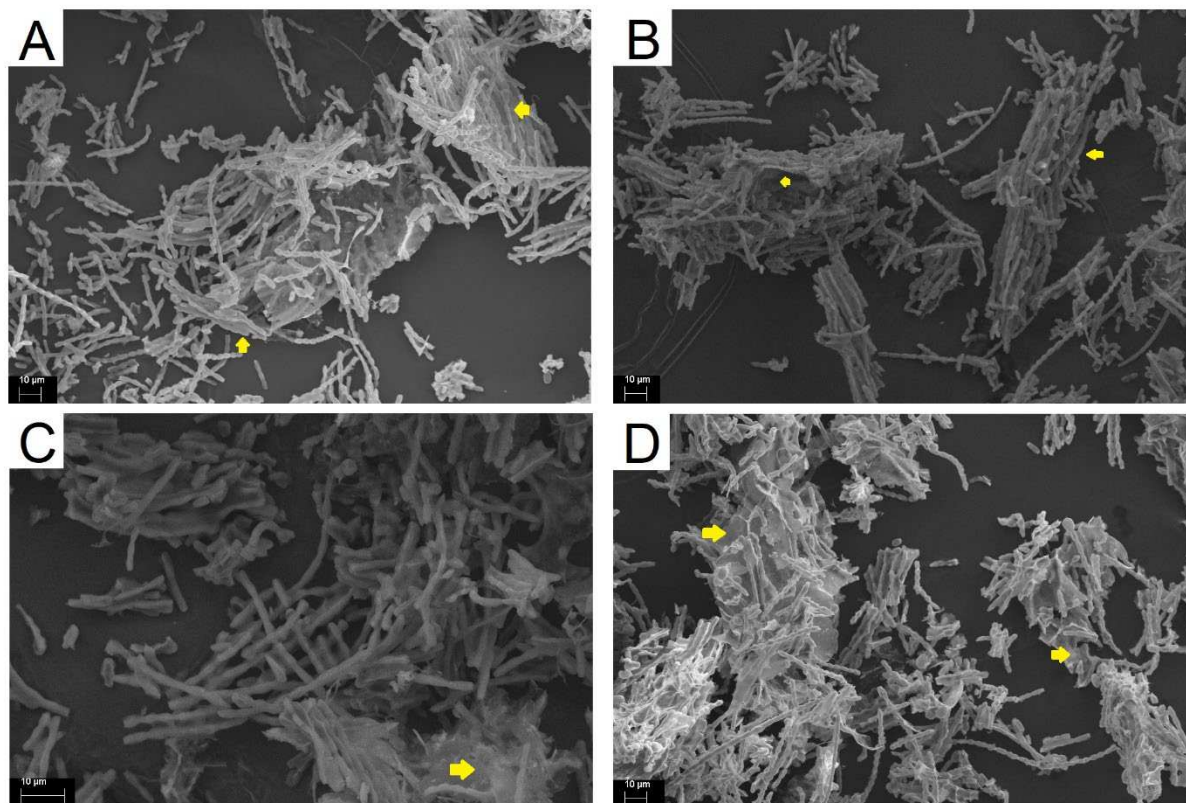
**Figura 17.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.



**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,01 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (0,1 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS). As setas vermelhas indicam os acinetos.

Considerando as alterações percebidas nas células expostas ao arsenito, foi possível verificar que no tratamento com menor concentração de arsênio (0,01mM - T1), as células apresentaram uma morfologia menos arredondada e mais longilínea (Figura 17C). O mesmo se repete para o tratamento com maior concentração de arsenito, com a observação de células mais disformes, tricomas menores e uma maior presença de EPS e células associadas (Figura 17D).

**Figura 18.** Figuras microfotográficas (Microscopia eletrônica de varredura) da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 em condições controle (BG-11) e em meio suplementado com arsenito.



**A:** Controle (BG-11) fase Lag (Dia 0) **B:** Controle fase Est (Dia 5) **C:** Tratamento 1 (0,01 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5) **D:** Tratamento 2 (0,1 mM As<sup>3+</sup>) fase Est (Dia 5). As setas amarelas indicam matrizes de exopolissacarídeos (EPS).

A linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 apresentou tricomas bem menos constrictos que a *Nostoc* sp. PCC7120. Suas células são mais longas, com os tricomas podendo formar pacotes com diversos filamentos paralelos (Figura 18A e B). Foi observado uma presença pronunciada de EPS, associada a uma matriz bem visível contendo tricomas para ambas condições controle e tratamentos (Figura 18A, B C e D). Considerando as alterações percebidas nas células expostas ao arsenito, verifica-se que as células apresentaram um padrão menos arredondado e mais longilíneas (Figura 18D), assim como a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120. Além disso, nota-se a presença de tricomas e células rompidas nos tratamentos com maior concentração de arsênio, assim como um maior agregamento dos tricomas e células.

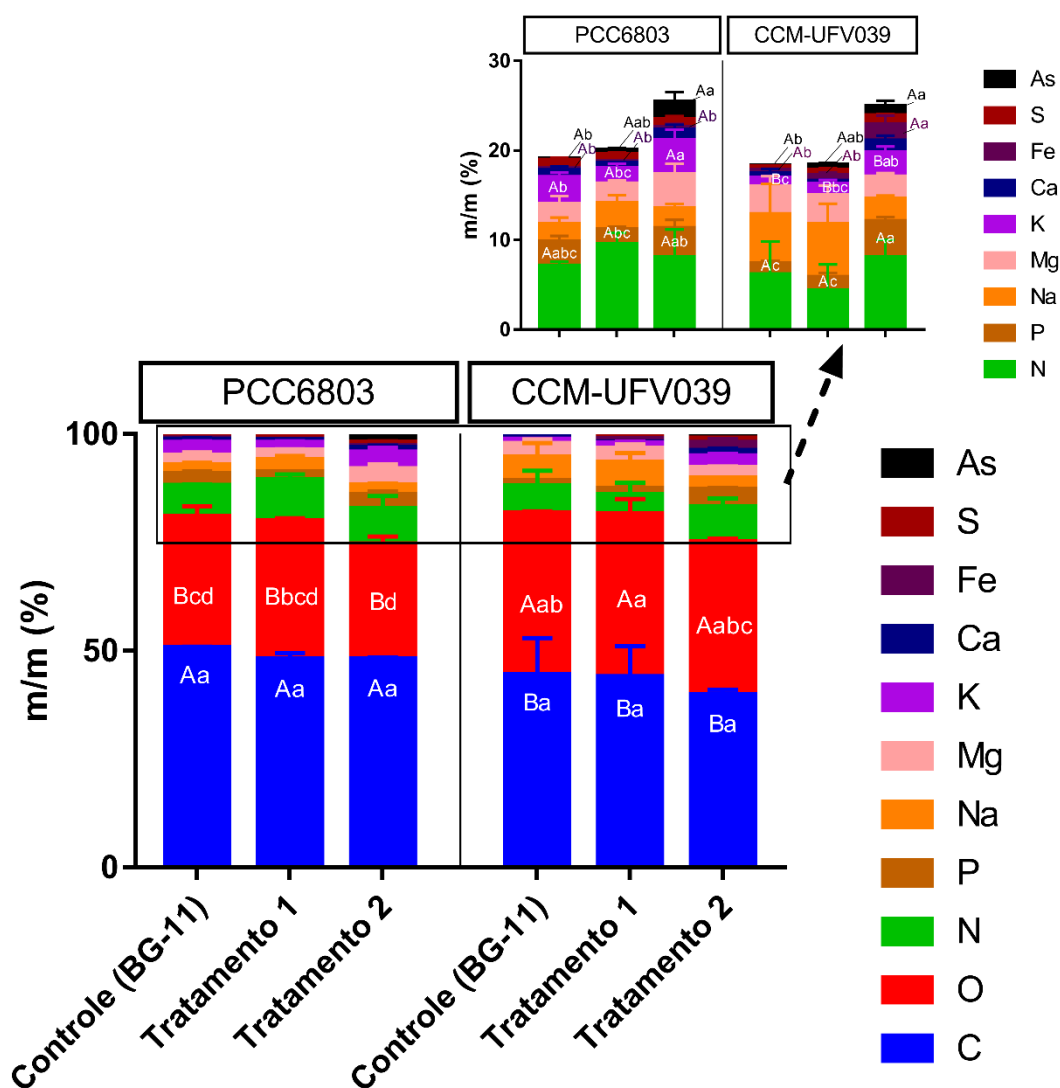
### 3.5.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

#### 3.5.2.1 Linhagens unicelulares

A análise por EDS trouxe diversos dados pertinentes a distribuição de certos elementos nas células de cianobactérias expostas ao As. Nos gráficos gerados

usando todos os elementos (Figura 19) é possível ver uma clara diferença na razão Carbono/Oxigênio entre as *Synechocystis*. PCC6803 e CCM-UFV039. Neste contexto, os valores de carbono e oxigênio no controle para *Synechocystis* sp. PCC6803 estão na faixa de 50% e 30% (m/m) respectivamente, ao passo que para *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 esses valores encontram-se entre 44% e 37% respectivamente. Diferenças foram também observadas para o carbono e oxigênio entre as linhagens embora não tenham sido observadas diferenças nesses elementos em presença de arsenito.

**Figura 19.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens unicelulares (*Synechocystis* sp. PCC6803 e CCM-UFV039).



eixo X do gráfico, estão os grupos de tratamentos para as linhagens utilizadas. No eixo Y, a porcentagem relativa do elemento em massa / massa (%). **Controle; BG-11, Tratamento 1;** BG-11 suplementado com 0,16 mM As<sup>3+</sup>, **Tratamento 2;** BG-11 suplementado com 1,60 mM As<sup>3+</sup>. No canto superior direito, um gráfico excluindo os elementos Carbono (C) e Oxigênio (O).

Como esperado, a presença do arsênio (entre 0,5% e 2% m/m) foi observada (Figura 19), tanto para o T1, quanto o T2. Um aspecto interessante foi a diferença, ainda mais visível, do arsênio nos tratamentos com *Synechocystis* sp. PCC6803 em comparação a *Synechocystis* sp. CCM-UFV039.

Também, foi possível notar um aumento dos valores relativos de potássio e fósforo, para ambas linhagens *Synechocystis* sp. PCC6803 e CCM-UFV039 quando expostas ao arsenito; não obstante, as linhagens mostraram padrões diferentes de resposta. Dessa forma, ao passo que na linhagem CCM-UFV039 ocorreu um aumento gradativo dos níveis desses elementos em resposta ao aumento nas concentrações de arsenito (1,21%, 1,46% e 4% para o fósforo e 0,98%, 1,29% e 2,71% para o potássio), para linhagem PCC6803, o T1 apresentou os menores valores relativos de fósforo e potássio, 1,75% e 1,73%, enquanto o T2 apresentou os maiores valores, 3,22% e 3,79%.

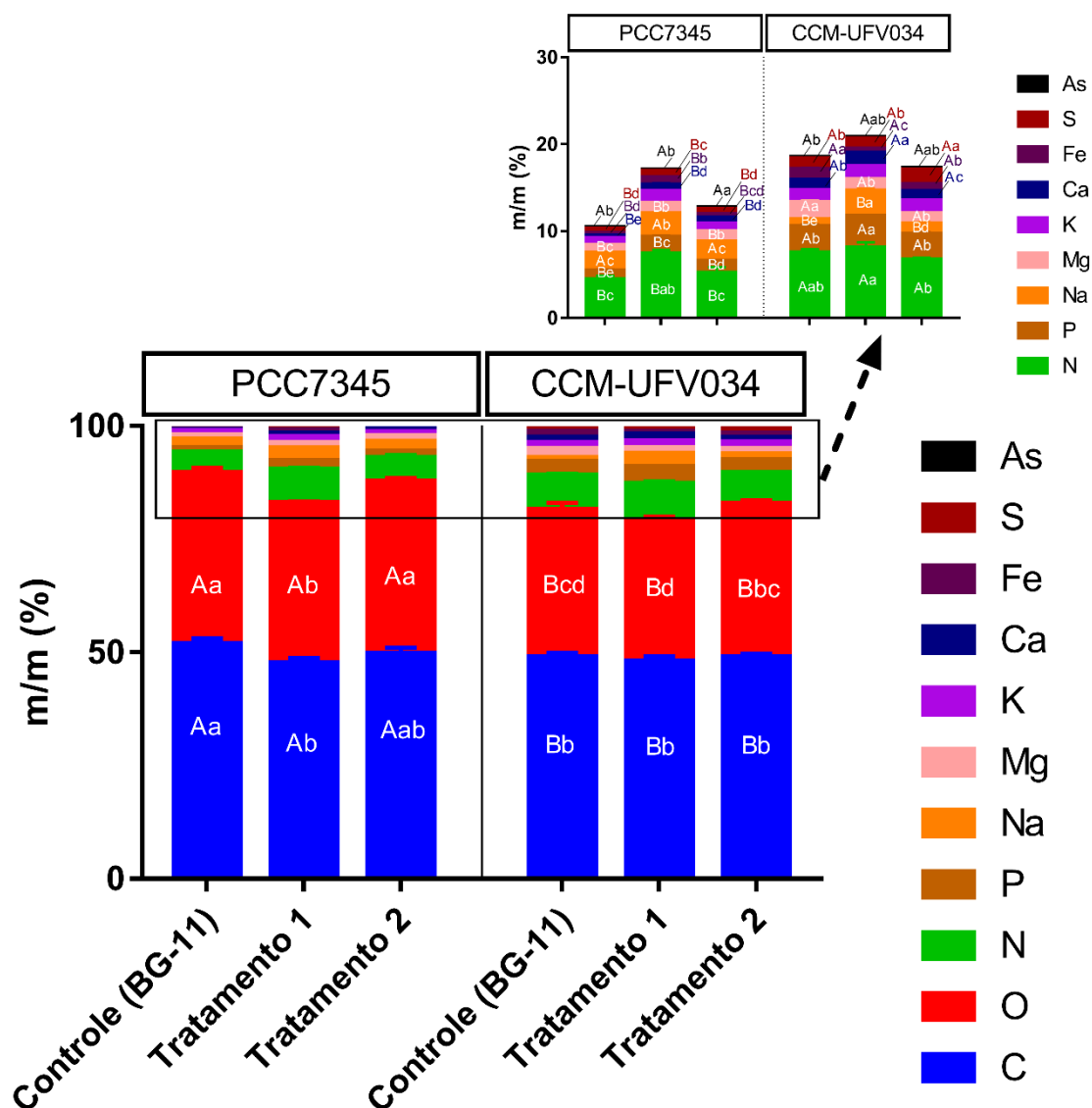
Foram encontrados também maiores valores relativos de ferro em ambos tratamentos (0,35% para o controle, 0,66% T1 e 1,83% T2), porém apenas para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 (Figura 19).

### 3.5.2.2 Linhagens homocitadas

Para as linhagens homocitadas foi possível observar que a composição elementar dessas células também diferiu, tanto em relação à linhagem quanto à adição do arsenito no meio de cultivo. Considerando o C e O, a linhagem PCC7345 apresentou maiores níveis gerais desses elementos quando comparada a linhagem CCM-UFV034. Para esses elementos, considerando a adição do arsenito, observa-se também uma redução dos conteúdos no tratamento 1 para a linhagem PCC7345 (Figura 20).

**Figura 20.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens homocitadas (*L. platensis* sp. PCC7345 e *A. terrestris* CCM-

UFV034).



No eixo X do gráfico, estão os grupos de tratamentos para as linhagens utilizadas. No eixo Y, a porcentagem relativa do elemento em massa / massa (%). **Controle**; **BG-11**, **Tratamento 1**; BG-11 suplementado com 0,01 mM As<sup>3+</sup>, **Tratamento 2**; BG-11 suplementado com 0,10 mM As<sup>3+</sup>. No canto superior direito, um gráfico excluindo os elementos Carbono (C) e Oxigênio (O).

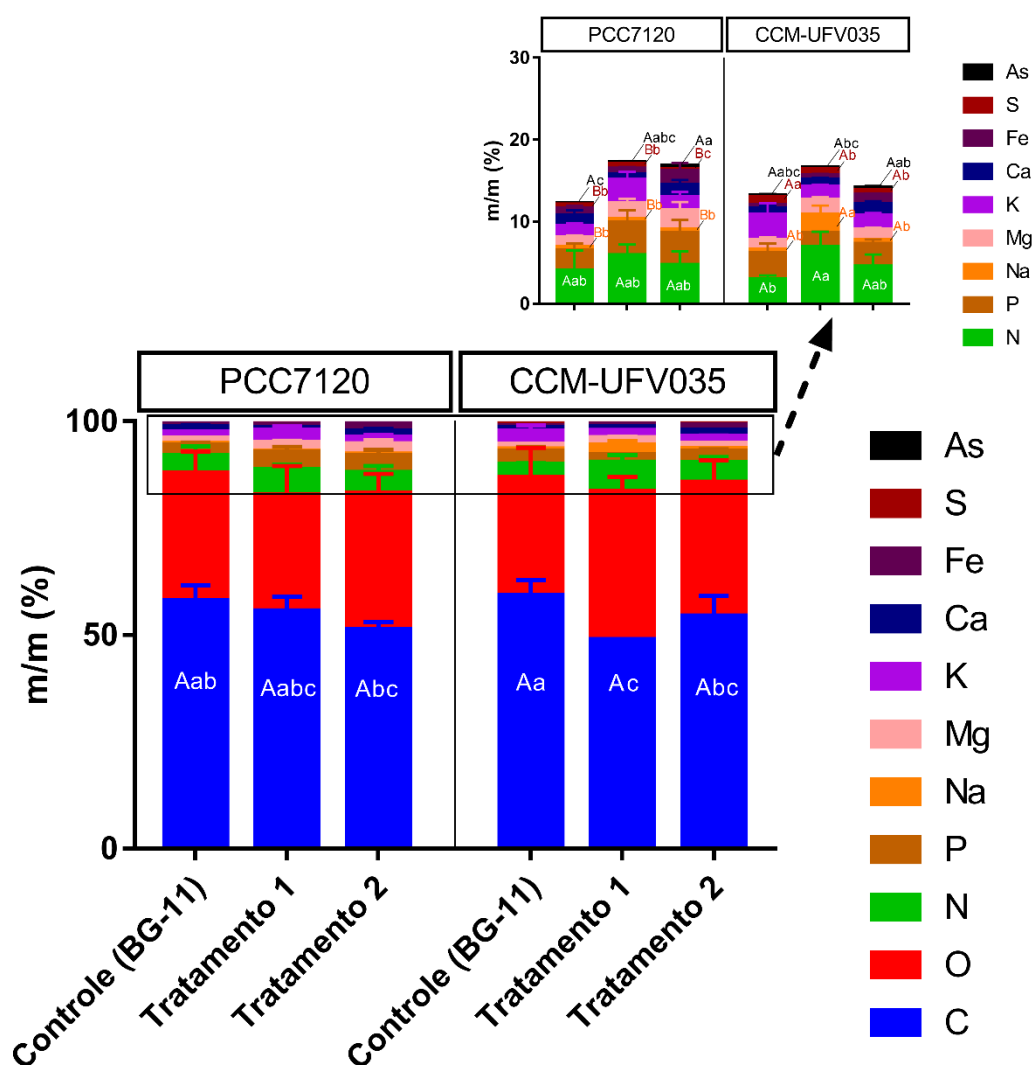
Analisando a composição dos outros elementos com exceção do C e O, observar-se que, novamente, tanto as linhagens quanto os tratamentos com arsenito apresentaram alterações na distribuição desses elementos. Foi possível observar um aumento na proporção de N, P, Na, Ca e Fe para o tratamento 1 em ambas linhagens homocitadas (Figura 20). Foi também observado um aumento da proporção do S para o tratamento 1 na linhagem *L. platensis* PCC7345 e no tratamento 2 para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034. O As foi também detectado em maiores níveis no tratamento

2, com maior proporção para linhagem *L. platensis* PCC7345 em comparação a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034.

### 3.5.2.3 Linhagens heterocitadas

Considerando os resultados obtidos para as linhagens filamentosas heterocitadas, foi possível também observar alterações pontuais nos tratamentos com arsenito. Também foram observadas alterações nas razões Carbono/Oxigênio nas linhagens quando submetidas aos tratamentos com arsenito. Foi possível observar também que a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou uma redução no conteúdo de Carbono no tratamento 2.

**Figura 21.** Quantificação elementar das amostras com base em Espectroscopia de raios X por dispersão em energia EDS – Linhagens heterocitadas (*Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035).



X do gráfico, estão os grupos de tratamentos para as linhagens utilizadas. No eixo Y, a porcentagem relativa do elemento em massa / massa (%). **Controle**; BG-11<sub>0</sub>, **Tratamento 1**; BG-11<sub>0</sub> suplementado com 0,01 mM As<sup>3+</sup>, **Tratamento 2**; BG-11<sub>0</sub> suplementado com 0,10 mM As<sup>3+</sup>. No canto superior direito, um gráfico excluindo os elementos Carbono (C) e Oxigênio (O).

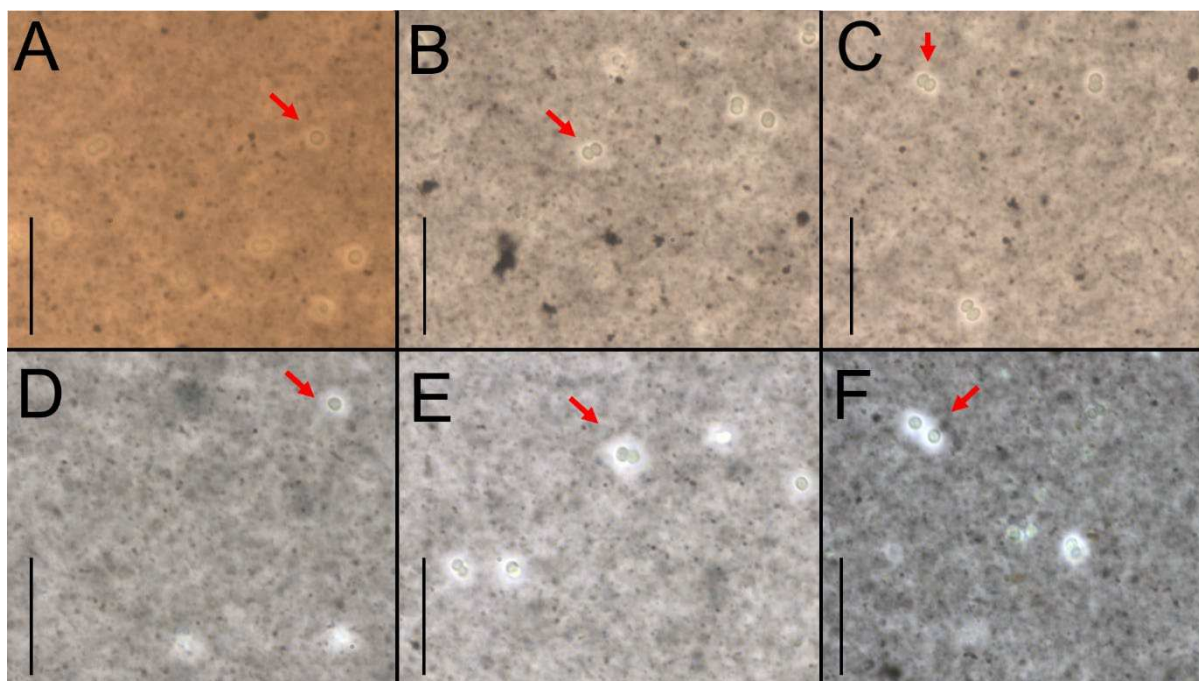
Ao se analisar elementos específicos, destacamos que o arsênio pode ser detectado, em maiores níveis, nos tratamentos com arsenito (entre 0,2% a 0,5% m/m), indicando que as células estão em contato com esse elemento. Também foi possível observar que a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 apresentou maiores conteúdos de arsênio nos tratamentos com adição de arsenito, quando comparada a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 (Figura 21).

Foram observadas alterações pontuais em alguns elementos (e.g. Ferro e Cálcio) para ambas linhagens, comparando o tratamento 2 ao controle em amostras coletadas na fase estacionária. Foi possível observar ainda um aumento 2,2 e 2,8 vezes nos níveis de Ferro para as linhagens *Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, respectivamente. Para o cálcio, esse aumento foi de 1,2 e 2,2 vezes, respectivamente, para as mesmas linhagens acima mencionadas (Figura 21). Uma diferença nos padrões encontrados entre as linhagens foi para o fósforo, onde a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 teve seus níveis reduzidos enquanto na linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 foram observados aumentos no conteúdo desse elemento (Figura 21). Esse padrão também se repetiu para o potássio.

### 3.5.2 Análise óptica de luz com coloração de Nanquim

Os resultados para as análises histoquímicas de coloração com Nanquim trouxeram dados interessantes em relação à produção de EPS pelas linhagens aqui investigadas (Figura 22). Foram observados padrões diferentes tanto para linhagens unicelulares quanto para as filamentosas.

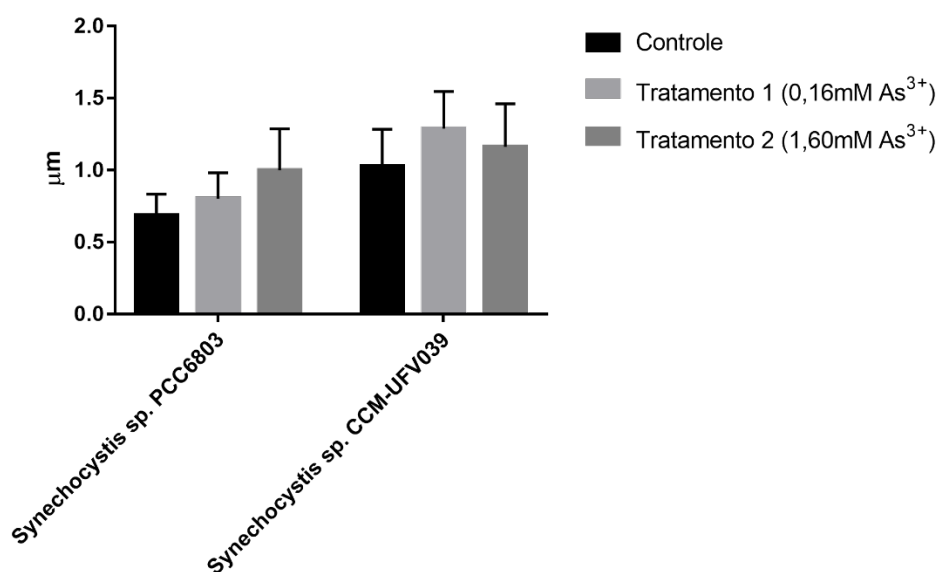
**Figura 22.** Prancha de microfotografias das linhas unicelulares coradas com Nanquim.



**A, B, C;** *Synechocystis* sp. PCC6803, **D, E, F;** *Synechocystis* sp. CCM-UFV039. **A, D;** Controle (BG-11). **B, E;** Tratamento 1 (BG11+ 0,16 mM As<sup>3+</sup>) **C, F;** Tratamento 2 (BG11+ 0,16 mM As<sup>3+</sup>). Escalas =10µm.

Ao se analisar as linhagens unicelulares, foram observadas diferenças significativas no diâmetro da camada de EPS nos tratamentos com adição do arsenito (Figuras 22 e 23). Ambas linhagens *Synechocystis* sp. PCC6803 e CCM-UFV039 apresentaram maiores valores na camada de EPS nos tratamentos quando comparadas à condição controle (Figura 23).

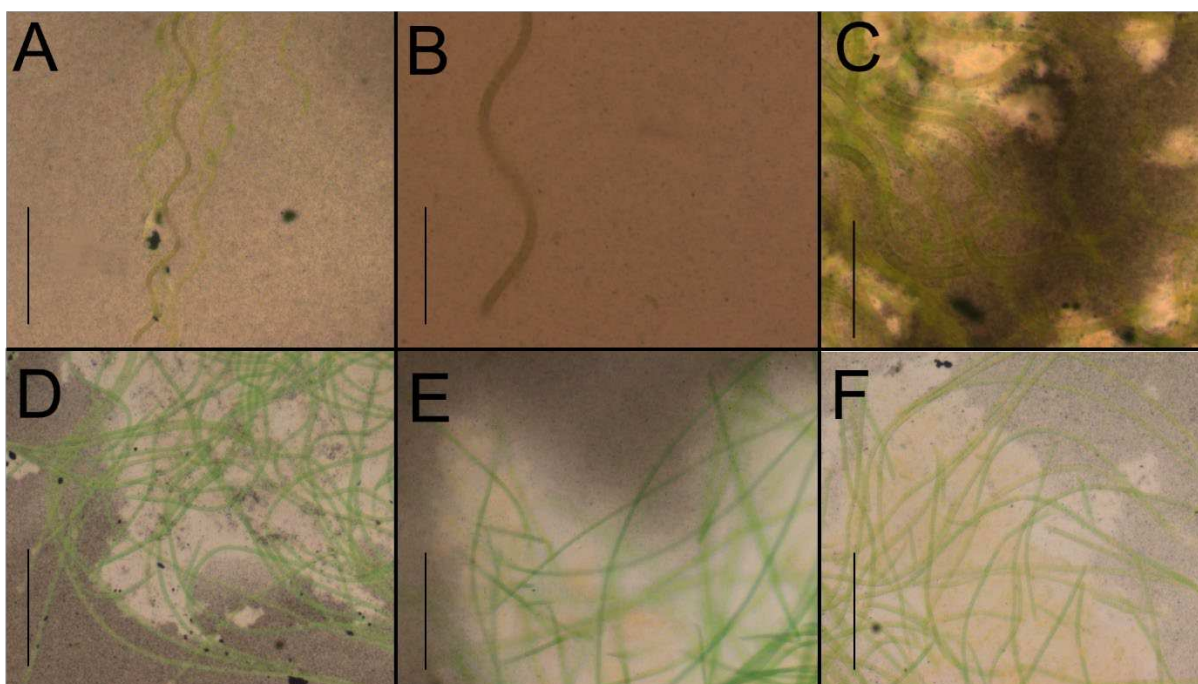
**Figura 23.** Diâmetro da camada de EPS das linhagens unicelulares (*Synechocystis* spp.).



Considerando as linhagens filamentosas, não foi possível mensurar precisamente o tamanho da camada de EPS envolta dos tricomas, mas foram encontrados diferentes padrões em relação a presença e a forma desse composto, quando se comparado as linhagens de um mesmo morfotipo (Figura 24).

As linhagens homocitadas apresentaram diferentes padrões entre si (Figura 24). A linhagem *L. platensis* PCC7345 trouxe um EPS laminar bem discreto quase não visível na maioria das observações. A presença de um EPS interno às micro colônias é visível, e com uma maior abundância no tratamento 2 (Figura 24C). Para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 temos a presença do EPS fino sobre os tricomas, também de forma bem discreta. Além disso, vemos um EPS livre mais disperso em todos tratamentos (Figuras 24 D, E e F), e com uma aparente maior dispersão dessa molécula no meio nos tratamentos com arsenito (Figuras 24E e F).

**Figura 24.** Prancha de microfotografias das linhagens homocitadas coradas com Nanquim.

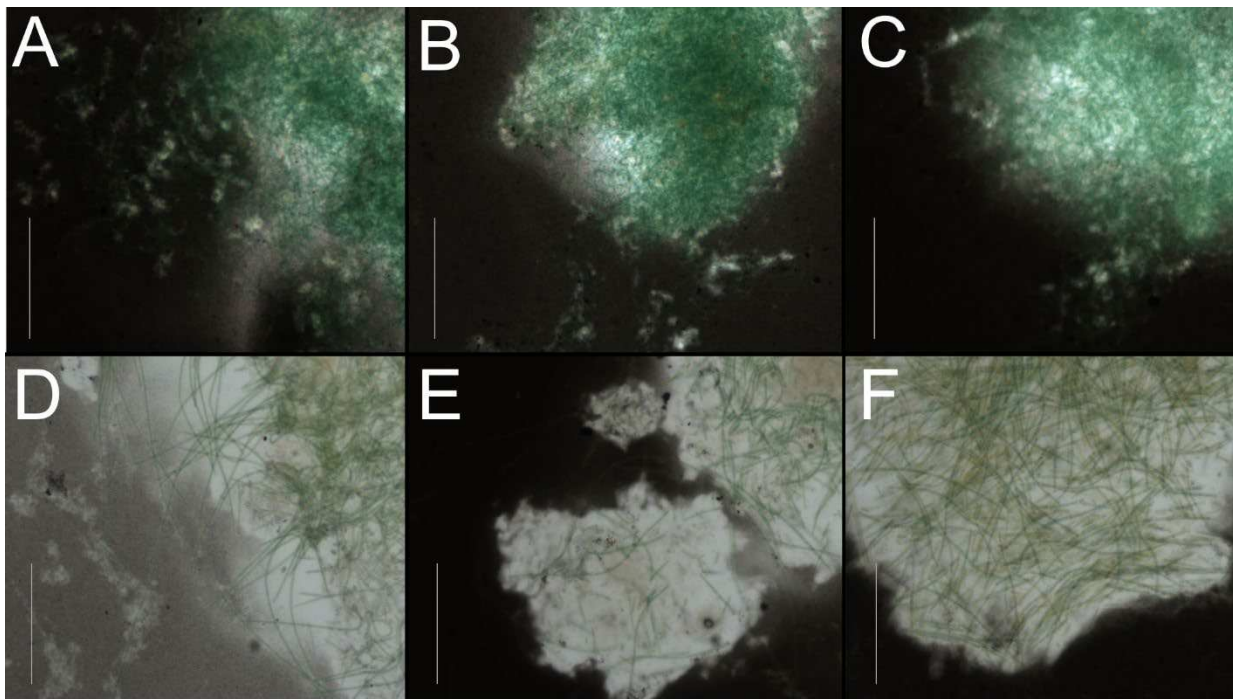


**A, B, C;** *L. platensis* PCC7345, **D, E, F;** *A. terrestris* CCM-UFV034. **A, D;** Controle (BG-11). **B, E;** Tratamento 1 (BG11+ 0,01 mM As<sup>3+</sup>) **C, F;** Tratamento 2 (BG11+ 0,10 mM As<sup>3+</sup>). As escalas das figuras **24A, D, E e F** representam 40 µm. As escalas das figuras **24B e C**= 20µm.

Em relação às linhagens heterocitadas, foi possível observar padrões distintos na disposição do EPS, especialmente ao analisar as microcolônias formadas pelos tricomas. Neste contexto, a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 apresentou uma

camada de EPS visível e extensa, com aparente fluidez, principalmente na sua região limítrofe (Figuras 25D, E e F).

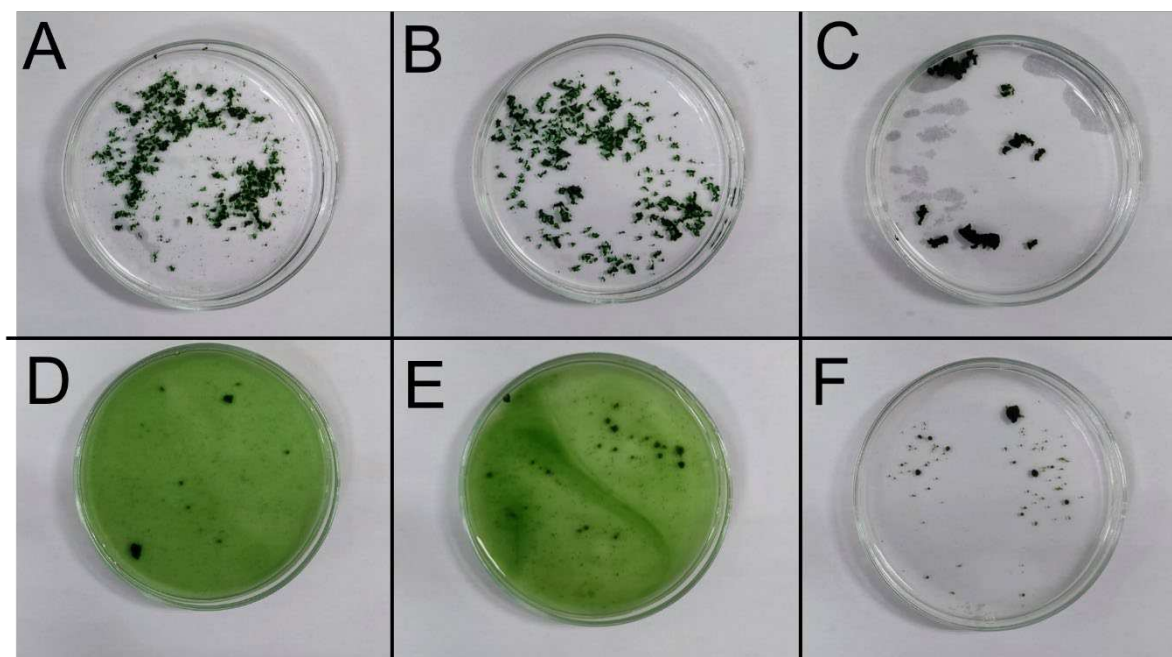
**Figura 25.** Prancha de microfotografias das linhagens heterocitadas coradas com Nanquim.



**A, B, C;** *Nostoc* sp PCC7120, **D, E, F;** *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. **A, D;** Controle (BG-11<sub>0</sub>). **B, E;** Tratamento 1 (BG11<sub>0</sub>+ 0,01 mM As<sup>3+</sup>) **C, F;** Tratamento 2 (BG11<sub>0</sub>+ 0,10 mM As<sup>3+</sup>). As escalas das figuras representam 80 μm.

Já a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 exibiu um EPS compacto, em menor extensão e concentrado principalmente no interior das microcolônias (Figuras 25A, B e C). Além disso, ao se analisar o tratamento com a maior concentração de arsenito, observou-se um maior grau de agregação dos tricomas, em ambas as linhagens, quando comparado ao grupo controle (Figura 26C e F).

**Figura 26.** Prancha de fotografias das linhagens heterocitadas expostas ao arsenito



**A, B, C;** *Nostoc sp* PCC7120, **D, E, F;** *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. **A, D;** Controle (BG-11<sub>0</sub>). **B, E;** Tratamento 1 (BG11<sub>0</sub>+ 0,01 mM As<sup>3+</sup>) **C, F;** Tratamento 2 (BG11<sub>0</sub>+ 0,10 mM As<sup>3+</sup>). O diâmetro das placas de Petri é de 10cm.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento e cinética são alterados pela presença de As

Foi possível observar diversos padrões de resposta no crescimento nas linhagens submetidas ao arsenito. No geral, as curvas de crescimento (Figuras 2, 3 e 4) não apresentaram uma fase de aclimação (*lag*) o que indica que as condições de cultivo e inóculo foram adequadas para o crescimento dessas linhagens. Para algumas das linhagens, foi observado de nenhum a poucas alterações no crescimento com a adição do arsenito. Isso indica que os mecanismos para evitação, remoção e mitigação do arsenito estavam ocorrendo, e foram suficientes para permitir essas linhagens um crescimento próximo ao do controle. Isso é observado para ambos tratamentos, com menor e maior concentração de arsenito para as linhagens *Synechocystis sp.* PCC6803, *L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034. Para as linhagens *Synechocystis sp.* CCM-UFV039, *Nostoc sp.* PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, foi observado reduções significativas nas taxas de crescimento e produtividade, no tratamento com maior concentração de arsenito, com diferentes magnitudes de redução, a depender da linhagem.

#### 4.1.1 Linhagens unicelulares (*Synechocystis*)

Considerando as linhagens unicelulares, padrões bem distintos entre as linhagens aqui estudadas em relação ao tratamento com a maior concentração de arsenito (Tratamento 2 - 1,6 mM  $\text{As}^{3+}$ ), foram observados (Figura 2). A linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 não apresentou diferenças na densidade óptica em 750 nm ( $\text{DO}_{750\text{nm}}$ ) entre ambos tratamentos e o controle, enquanto a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresentou diferenças significativas na  $\text{DO}_{750\text{nm}}$  em relação ao tratamento 2 quando comparado ao controle.

Considerando-se os dados cinéticos (e.g. tempo de duplicação celular e a produtividade), também observamos diferenças significativas entre as duas linhagens unicelulares, especialmente para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 no tratamento 2, com reduções de 77% em ambos parâmetros (Tabela 1). Isso indica que as linhagens responderam, de maneira diferente, ao arsenito, afetando seu crescimento e produtividade, e corroborando com os dados da curva de crescimento. A resposta diferencial de cianobactérias ao arsenito já foi relatada com organismos dos diferentes morfotipos desse filo (Miyashita et al., 2016b). Com efeito, reduções nos parâmetros cinéticos, de linhagens expostas ao arsenito, foram também reportadas para outras linhagens unicelulares (Ferreira et al., 2018). Os resultados aqui obtidos indicam que a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 foi mais sensível à exposição ao arsenito, com grandes reduções no crescimento em resposta à concentração de 1,60 mM  $\text{As}^{3+}$  (Figura 2). Por outro lado, a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 parece ser mais tolerante ao arsenito, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na  $\text{DO}_{750\text{nm}}$  entre os tratamentos.

É interessante observar que a maior produtividade foi alcançada na condição controle para a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, enquanto a menor produtividade ocorreu na maior concentração de arsenito, também para a mesma linhagem (Tabela 1). A produtividade para a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 encontra-se na faixa de valores similares aos encontrados na literatura (Zavřel et al., 2017). Tomados em conjunto, esses resultados destacam a importância de considerar a resposta individual de diferentes linhagens unicelulares a estímulos ou condições ambientais, como a presença de arsenito. Além disso, eles sugerem que a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 parece ser um organismo adequado para aplicações

com vistas à alta produtividade, desde que seja cultivada sob condições adequadas, se tratando de linhagens do gênero *Synechocystis*.

#### 4.1.2 Linhagens homocitadas (Oscillatoriales)

As linhagens homocitadas apresentaram poucas alterações nos parâmetros cinéticos e de produtividade quando expostas aos tratamentos com arsenito, mas diferenças interessantes de resposta em relação às linhagens estudadas foram encontradas.

No que diz respeito à curva de crescimento, ambas as linhagens mostraram reduções nas medições da  $DO_{750nm}$  no tratamento com a concentração mais alta de arsenito (T2) (Figura 3). É importante destacar que a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 exposta ao T2 conseguiu recuperar as medições de  $DO_{750nm}$ , alcançando valores semelhantes aos do grupo controle no final do experimento. Por outro lado, a linhagem *L. platensis* PCC7345 apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle até o final do experimento. Esses resultados indicam que as linhagens responderam de maneiras distintas aos estresses impostos. A linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 demonstrou uma capacidade maior de recuperação do estresse, sugerindo a presença de mecanismos eficientes para lidar com essas condições. Além disso, percebe-se que tais mecanismos foram eficazes na redução dos efeitos negativos sobre o crescimento e a multiplicação celular dessa linhagem.

Os dados de produtividade confirmam os resultados observados no crescimento, especialmente no caso da linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034, que manteve níveis de produtividade semelhantes aos do grupo controle ao final do experimento ( $0,44 \text{ mg mL}^{-1}$  em ambos os casos) (Tabela 2). Por outro lado, a linhagem *L. platensis* PCC7345 mostrou que o tratamento T2 teve um impacto significativo na produtividade ao final do experimento, resultando em uma redução de 32% em relação ao controle. É interessante notar que essa redução na produtividade foi mais acentuada do que a diminuição observada na  $DO_{750nm}$  (Figura 3). Isso sugere que a linhagem *L. platensis* PCC7345 mobilizou parte do seu metabolismo, originalmente destinado ao acúmulo de biomassa, para manter uma taxa de crescimento mais elevada. Esse realocamento de recursos pode explicar, ainda que parcialmente, as diferenças na produtividade em relação ao controle, mesmo com uma redução menor na densidade óptica.

Os resultados aqui obtidos indicam que a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 apresentou uma maior “estabilidade” na produtividade, enquanto a linhagem *L. platensis* PCC7345 precisou realocar recursos metabólicos para sustentar o crescimento, resultando em uma redução mais expressiva na produtividade (Figura 3). Esses dados revelam que linhagens de um mesmo morfotipo, com características de crescimento semelhantes, exibem respostas bastante distintas quando se trata da análise da produtividade. A capacidade superior da linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 de crescer e produzir biomassa em condições com a presença de arsenito indica que essa linhagem possui uma habilidade intrínseca para lidar com esse elemento tóxico no ambiente de crescimento. Essa característica já era esperada pelo seu local de isolamento, onde também se encontrava a presença desse elemento tóxico (Capítulo 1).

#### 4.1.3 Linhagens heterocitadas (*Nostocaceae*)

Considerando os padrões cinéticos obtidos das linhagens heterocitadas, foi observado que as duas linhagens foram afetadas pelo arsenito nos tratamentos com maior concentração (T2), conforme indicado pelos dados de  $DO_{750nm}$  (Figura 4). Esses resultados também se refletiram nos tempos de duplicação, revelando diferenças significativas na taxa de crescimento entre as linhagens e os tratamentos. Portanto, é evidente que a presença de arsenito teve um impacto negativo no crescimento das linhagens heterocitadas (Figura 4). Ao comparar as linhagens, observamos que a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou maiores reduções nos parâmetros mencionados, em comparação com a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. Enquanto a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 teve seu tempo de duplicação duplicado no tratamento T2, a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 teve um aumento superior a 4 vezes esse valor. O mesmo padrão é observado na produtividade, embora de forma menos acentuada. A linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 registrou uma redução de aproximadamente 85% na produtividade, enquanto a linhagem *T. flavodiazotum* sp. CCM-UFV035 apresentou uma redução de 70% (Tabela 3).

Os resultados aqui apresentados revelam que as linhagens heterocitadas apresentam diferentes sensibilidades ao arsenito em relação ao crescimento e à produtividade. Notavelmente, a linhagem *T. flavodiazotum* sp. CCM-UFV035 demonstrou uma redução geral menos acentuada nos parâmetros mencionados, em comparação com a linhagem *Nostoc* PCC7120, na concentração de 0,1mM  $As^{3+}$ . Essa

observação ressalta a capacidade superior da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 de crescer e produzir biomassa em condições com a presença de arsenito, indicando sua habilidade em lidar com esse elemento tóxico.

Ao se analisar os dados da origem ecológica das linhagens aqui investigadas, percebe-se que as linhagens isoladas do ambiente contaminado com As apresentaram uma maior capacidade de crescer e produzir biomassa quando expostas as concentrações de arsenito, quando se comparada às linhagens modelo utilizadas nesse trabalho.

## 4.2 Análises bioquímicas

### 4.2.1 Clorofilas totais

Tanto as linhagens unicelulares apresentaram uma tendência semelhante de redução nos teores de clorofilas totais ao longo do tempo do experimento, independentemente do tratamento (Figura 5). A resposta dos teores de clorofila nas linhagens foi consistente ao analisarmos apenas as clorofilas *a* ou *b*, mostrando uma proporção semelhante em relação ao tempo e aos tratamentos. A única exceção foi uma tendência à redução encontrada na linhagem heterocitada *Nostoc* sp. PCC7120, no tratamento com maior concentração de arsenito na fase Log. Essa alteração se deve, muito provavelmente, a uma leve redução da clorofila *a* e aumento da clorofila *b*, visto nas quantificações desses pigmentos (Figura 6). A diminuição da razão clorofila *a/b* é um padrão conhecido em respostas a certos tipos estímulos, como alterações de luminosidade, especificamente a qualidade da luz. Em plantas, a presença da clorofila *b* também está associada a estabilidade dos complexos de coleta de luz (LHC) (Wójtowicz et al., 2021). Ademais, essa razão pode estar associada diretamente a adaptações em alteração de intensidade e qualidade de luz (Ito et al., 1993). Em cianobactérias, a alteração dessa razão também pode estar associada a intensidade e qualidade de luz (Lim et al., 2019). Também foram observadas alterações nesta razão que podem estar associada a disponibilidade nutricional (Jaiswal et al., 2018).

De forma geral, a aplicação de concentrações de arsenito não apresentou um impacto direto nos teores de clorofilas dessas linhagens, mesmo quando a linhagem *Synechocystis* CCM-UFV039 teve seu crescimento e produtividade afetados pela

adição do arsenito. Isso indica que a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 conseguiu manter níveis de clorofilas totais próximos aos de uma condição controle, em troca de crescimento e produtividade. A redução dos teores de clorofila na presença do arsenito é um padrão já relatado na literatura (Bhattacharya e Pal, 2011b), e para o arsenato, já foi descrito inclusive para espécies unicelulares (Huang et al., 2014). Um dos efeitos do arsenito no interior da célula é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem afetar a cadeia transportadora fotossintética, resultando em alterações nos teores de clorofilas (Latifi et al., 2009) e uma maior remobilização dessas proteínas. A capacidade da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 em manter níveis de clorofila diante do estresse ao arsenito indica uma capacidade de remediação desses impactos nas clorofilas, mesmo com efeitos sobre outros parâmetros biológicos.

No que diz respeito aos padrões de alteração nas linhagens homocitadas, é observada uma tendência de aumento nos teores de clorofila ao longo da duração do experimento, com uma redução ou manutenção dos teores iniciais na fase logarítmica de crescimento. Essa redução foi mais pronunciada na linhagem *L. platensis* PCC7345. No geral, os teores de clorofila aumentaram em todos os tratamentos até o final do experimento. Os teores de clorofilas *a* e *b* também responderam proporcionalmente aos teores totais para ambas as linhagens. Foi possível observar que a adição de arsenito na menor concentração (T1) no meio cultivo trouxe aumentos nos teores de clorofila *a* para linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034. Ferrari et al., 2013 mostra que na linhagem *Nostoc minutum*, a adição de arsênio pode estimular a produção de alguns metabólitos, como clorofilas e carotenóides. Tal comportamento pode acontecer devido a estímulos no crescimento, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos.

Nas linhagens heterocitadas, foi observada uma redução nos teores de clorofila *a* em ambas as espécies na presença da maior concentração de arsenito (Tratamento 2). Essas reduções foram de aproximadamente 43% a 45% para as ambas linhagens. Os teores de clorofila *b* também responderam proporcionalmente aos teores de clorofila *a* em ambas as linhagens. Essa resposta de redução nos teores de clorofila com a exposição ao arsenito já foi descrita anteriormente, no sentido de um efeito das ROSs geradas pelo arsênio sobre o aparato fotossintético (Bhattacharya and Pal,

2011). A alteração dos pigmentos fotossintéticos de linhagens heterocitadas também já foi observada em organismos do gênero *Nostoc* e *Trichormus* (Ferrari et al., 2013), porém, em um contexto de aumento desses metabólitos na presença de baixas concentrações de arsenato. Os resultados aqui apresentados indicam que as linhagens heterocitadas desse trabalho sofreram impactos nos conteúdos de clorofila devido à presença do arsenito no meio de cultivo; não obstante, é plausível sugerir que essa redução seja derivada da presença de ROS geradas pelo arsênio, e não um efeito direto dessa molécula.

As diferentes linhagens estudadas apresentaram padrões distintos de comportamento em relação aos níveis de clorofila nas células (Figuras 5, 6 e 7). No caso das linhagens unicelulares, ambas mantiveram níveis semelhantes de clorofila em comparação ao grupo controle, apesar das diferenças observadas na produtividade e no crescimento da linhagem *Synechocystis* CCM-UFV039. Por outro lado, nas linhagens homocitadas, notamos que baixas concentrações de arsenito resultaram em aumentos nos teores de clorofila para a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034, indicando um possível estímulo na produção desse metabólito. Já nas linhagens heterocitadas, os efeitos sobre esse metabólito foram mais significativos, com reduções observadas em ambas as linhagens na condição de maior concentração de arsenito, provavelmente relacionado a uma mobilização dos aparatos fotossintéticos devido aos estresses gerados pela presença do arsenito.

#### **4.2.2 Proteínas e aminoácidos solúveis totais;**

Considerando os dados de proteínas totais das linhagens unicelulares, observou-se que a linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 manteve os níveis de proteínas ao longo de todo o experimento, independentemente dos tratamentos utilizados. No entanto, na linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresentou um aumento nos conteúdos de proteínas na fase Est, especialmente no tratamento com maior concentração de arsenito (T2) (Figura 8A).

Essa resposta diferencial nos conteúdos de proteína pode estar relacionada ao crescimento diferencial que as linhagens apresentaram em resposta à disponibilidade de arsenito no meio de cultivo. É importante ressaltar que alterações nos níveis de proteínas durante estresses causados pelo arsênio são um padrão já relatado em cianobactérias. Tanto a redução desse metabólito (Bhattacharya and Pal, 2011b)

quanto o aumento de seus níveis (Ferrari et al., 2013) em condições com a presença de arsenito foram observados em diferentes morfotipos já foram previamente relatadas.

No caso da linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, essa proteína disponível provavelmente é um metabólito que foi realocado em detrimento do incremento de biomassa, como podemos relacionar em conjunto aos dados cinéticos anteriores. Essas alterações são de certa forma esperadas, vide a necessidade de uma remobilização proteica em condições de estresse em geral (Babele et al., 2019), com a disponibilização de precursores para resposta à condição que esses organismos estão submetidos. Essa hipótese é reforçada pelo conteúdo dos aminoácidos solúveis totais, cujo valores foram também superiores nesse mesmo ponto amostral (Figura 8B).

Quando observado os padrões de resposta desses metabólitos aos tratamentos com arsenito para as linhagens homocitadas, observamos uma tendência para manutenção dos conteúdos durante o experimento, independente dos tratamentos. Isso indica que essas linhagens conseguiram evitar a entrada do arsenito ou mitigar os seus efeitos celulares, sem necessidade de uma realocação dos conteúdos proteicos, ou efeitos sobre esses conteúdos nas concentrações em que estavam expostas.

A redução dos níveis de proteínas totais na presença do arsenito foi observada para apenas a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 (Figura 10). Alterações similares alteração já foram observadas em microalgas, como *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus* sp. A redução nos conteúdos de proteínas também foi acompanhada pela redução nos conteúdos de clorofila nas microalgas (Arora 2017), o que também foi encontrado na linhagem *Nostoc* PCC7120. Em contrapartida, considerando os conteúdos de proteínas e aminoácidos da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 uma manutenção desses metabólitos aos níveis da condição controle foi observada. Isso provavelmente indica que essa linhagem foi capaz de regular o fluxo desses metabólitos frente ao estresse. Vemos também que essa linhagem apresentou uma redução das clorofilas e que não foi refletida nos conteúdos de proteínas e aminoácidos, redução que ocorreu nesses metabólitos para linhagem *Nostoc* PCC7120. É plausível sugerir que as alterações geradas nos teores de clorofila para linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035, sem o acompanhamento de alterações nas

proteínas, revelam uma maior capacidade de manter o aparato fotossintético nas condições a qual estava exposta.

É possível que a redução nesses metabólitos tenha uma relação com os danos causados pelo arsenito, tanto por parte das EROs possivelmente gerados, levando a uma maior mobilização de recursos para atuar na mitigação das EROs, quanto à ação direta do arsênio nas proteínas (Vergara-Gerónimo et al., 2021). O As pode se ligar a a proteínas por meio de interações com resíduos de cisteína individuais, motifs *Zinc Finger* (ZnF) e domínios de *RING Finger*, causando alterações na sua estrutura (Jiang et al., 2018; Vergara-Gerónimo et al., 2021) e levando à degradação (Kluska et al., 2018).

Uma outra hipótese que pode explicar a redução dos conteúdos de proteína para a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 é a redução da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). A FBN é um processo metabólico muito complexo e sensível, principalmente em relação a presença do oxigênio. A presença de ERO pode ser ainda mais danosa ao processo de fixação, que apenas o oxigênio (Postgate, 1982; Vitousek et al., 2002), inclusive sendo gerado durante esse processo. Para algumas bactérias fixadoras de nitrogênio, os processos e proteção a ERO são regulados positivamente para evitação da reatividade do oxigênio produzido durante a FBN (Alquères et al., 2010; Srivastava et al., 2009).

#### 4.2.3 Glicogênio

Foram identificados padrões interessantes de resposta ao analisar os dados da quantificação do glicogênio nas linhagens estudadas. Foi observado um aumento nos níveis de glicogênio em ambas as linhagens unicelulares com a adição de arsenito. Esse aumento foi mais significativo durante a fase logarítmica. Portanto, é possível que a presença do arsenito no meio de cultivo tenha favorecido, ainda que parcialmente, o acúmulo dessas reservas de carbono.

A razão das reservas de carbono pode ter uma relação com um balanço energético celular, onde a célula favoreceu o acúmulo dessas reservas durante o crescimento. A síntese de glicogênio também é um processo que contribui para a regulação balanço energético de cianobactérias (Cano et al., 2018) Observando os dados de crescimento e produtividade, vemos que as linhagens não tiveram alterações significativas nesses parâmetros, o que indica que o crescimento dessas

linhagens não foi afetado pelo acúmulo do glicogênio. O glicogênio também pode ser acumulado em condições de estresse como uma forma de preparar a célula para condições desfavoráveis (Cano et al., 2018). Esse acúmulo também é fundamental para uma resposta celular efetiva a estresses abióticos (Gründel et al., 2012). Neste contexto, a resposta ao estresse requer uma conexão eficiente entre glicogênio e metabolismo central de carbono pelas enzimas fosfoglucomutases (Ortega-Martínez et al., 2023).

Cabe ressaltar também que o arsênio apresenta-se como um inibidor da glicólise, atuando diretamente nas enzimas Hexokinase (HXK) e Piruvato quinase (Vergara-Gerónimo et al., 2021). A proteína HXK também pode atuar como um regulador de diversas outras enzimas, especificamente em fungos (Rodríguez et al., 2001). Não menos importante, a proteína HXK também se mostra com um importante sensor dos conteúdos de açúcares nesses organismos (Vega et al., 2016). A alteração da sua atividade ou estrutura, pode estar afetando essas vias metabólicas. É possível que essa resposta de acúmulo de glicogênio possa ser um efeito derivado do afrouxamento do controle metabólico dos esqueletos carbônicos. Tanto pela depleção da atividade de enzimas da glicólise, quanto efeitos nas funções regulatórias dessas proteínas, afetadas pela presença do arsenito.

De forma oposta, foi observado uma redução dos níveis de glicogênio na fase estacionária para linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039. Por conta dos impactos gerados pela presença do arsenito no meio no seu crescimento, é possível que essa redução ocorreu pelo fato dessa linhagem não estar conseguindo manter tanto o crescimento quanto a mitigação dos estresses gerados pela presença do arsenito. O fato dessa linhagem exibir baixos conteúdos de glicogênio nesse ponto amostral, sugerem que essa linhagem não conseguiu produzir uma resposta efetiva a esse estresse, o que também se pode observar nos dados de crescimento.

Considerando os dados relativos as linhagens homocitadas, vemos que a linhagem *L. platensis* PCC7345 não mostrou variação dos conteúdos em relação aos tratamentos com arsenito. Diferentemente, a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 apresentou reduções dos teores de glicogênio ao fim do experimento (Dia 9), em ambos tratamentos.

Essa redução pode estar relacionada a um investimento dessas reservas em mecanismos de tolerância e mitigação ao arsenito. Muitos dos mecanismos de evitação e mitigação dos impactos derivados da presença do arsênio requerem um

investimento energético, como a produção de EPS (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015; Dutta and Bhadury, 2020) ou de enzimas e componentes anti-oxidantes não enzimáticos (Shilpi et al., 2015). Essas vias de resposta ao estresse submetido podem influenciar os níveis das reservas de carbono. Podemos observar que a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034. Teve uma melhor performance de crescimento e produtividade com a adição do arsenito, quando se comparada a linhagem *L. platensis* PCC7345. Isso indica que a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 foi capaz de investir recursos energéticos para tanto responder ao arsenito, quanto manter um crescimento celular satisfatório.

Já para as linhagens heterocitadas vemos no geral um incremento nos conteúdos de glicogênio com a adição do arsenito no meio de cultivo. Esse aumento foi perceptível na fase logarítmica e estacionária para linhagem *Nostoc* sp. PCC7120, no tratamento com maior concentração de arsenito (T2). Para linhagem *T. flavodiazotum* sp. CCM-UFV035 é observado um aumento nesse metabólito apenas na fase estacionária, para ambos tratamentos. A alteração observada nos conteúdos de glicogênio foi diferencialmente expressa entre as linhagens. A linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 trouxe incrementos de 151 e 245% nos níveis de glicogênio para os pontos da fase logarítmica e estacionária respectivamente, para o tratamento T2. Para a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 os incrementos observados na fase estacionária foram na magnitude de 124% e 72% para os tratamentos T1 e T2 respectivamente. Isso indica que as linhagens responderam de forma semelhante ao estresse gerado, mas com diferenças significativas na magnitude dessa resposta, se tratando dos conteúdos de glicogênio nas células.

No geral, vemos que os conteúdos de glicogênio encontrados nas linhagens aqui analisadas mostram um padrão de acúmulo dessa reserva. Podemos resgatar novamente o arsênio como um inibidor da glicólise (Vergara-Gerónimo et al., 2021), e a função da proteína HXK como um regulador de diversas outras enzimas (Rodríguez et al., 2001), além de sua importância como um sensor metabólico. Reforçando, é possível que o padrão de acúmulo do glicogênio possa ser um efeito derivado do afrouxamento do controle metabólico de esqueletos carbônicos. Tanto pela depleção da atividade de enzimas da glicólise, quanto efeitos nas funções regulatórias dessas proteínas, seja pela ação direta do arsenito ou pelas possíveis EROs presentes nesse estresse.

### 4.3 Análises de microscopia

#### 4.3.1 Linhagens unicelulares (*Synechocystis* spp. PCC6803 e CCM-UFV039)

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura evidenciam a morfologia cocóide das linhagens de *Synechocystis* investigadas neste estudo (Figuras 13 e 14). Embora ambas as linhagens pertençam ao mesmo gênero, é possível observar diferenças no formato celular entre elas. Essa plasticidade morfológica encontrada em linhagens de um mesmo gênero já é descrita na literatura, tanto para linhagens unicelulares (Komárková et al., 2010) quanto filamentosas (Almeida et al., 2023; Hrouzek et al., 2005), porém, essa informação sobre linhagens de regiões tropicais e subtropicais ainda é insuficiente. A plasticidade fenotípica também já é relatada para outros diferentes morfotipos de cianobactéria, a depender do ciclo de vida e dos nutrientes disponíveis no ambiente em que essa linhagem se encontra, e se mostra importante para respostas às flutuações ambientais (Stomp et al., 2008; Zapomělová et al., 2008). Esses resultados trazem informações importantes sobre a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e suas características específicas, explicitando a diversidade morfológica de linhagens desse gênero, assim como linhagens de regiões pouco exploradas.

Um resultado bem interessante é a presença do EPS nas imagens, que se mostraram significativamente presentes com um maior diâmetro da camada dessa substância nos tratamentos com arsenito (Figura 22). O EPS é uma molécula que possui um papel importante na proteção contra uma ampla gama de estresses abióticos nesses organismos (Laroche, 2022; Shalaby and Dubey, 2018). Essa molécula também pode atuar como um mobilizador de diversos metais pesados (De Philippis et al., 2011). É possível que o aumento da camada de EPS nessas células tenham uma relação com a presença do arsenito. Alguns trabalhos já evidenciaram uma maior produção de EPS na presença de arsênio (Dutta and Bhadury, 2020). Uma maior produção de EPS também é observada em algumas em certas condições estresses mais gerais, como salina, osmótica e luminoso (Alvarenga et al., 2020; Shalaby and Dubey, 2018). O estímulo da deposição do EPS sobre a célula como uma resposta direta a exposição ao arsenito ainda não é um processo esclarecido, mesmo já sendo um padrão observado em algumas espécies (Dutta and Bhadury, 2020).

O EPS pode auxiliar na imobilização do arsenito através das propriedades sequestradores de certos radicais, quem compõem esse polímero (Al-Amin et al.,

2021). A adsorção de metais pesados ocorre principalmente pelos grupos carboxílicos. Além do grupo carboxila, os grupos fosfórico e hidroxila podem contribuir significativamente para o sequestro de íons metálicos (De Philippis et al., 2011), diminuindo a mobilidade desse elemento para o interior celular. Junto a isso, a presença de grupos com ácido urônico e radicais sulfato fornecem uma maior carga negativa para o EPS, favorecendo a ligação com íons carregados positivamente (Ozturk et al., 2009). Alguns aminoácidos também estão envolvidos nessa captura desses íons, incluindo o arsênio (Santini and Vanden Hoven, 2004).

Essa capacidade do EPS de adsorver cátions pode variar de acordo com a composição dessa molécula (Pereira et al., 2009). Além disso, a interação direta com o arsênio já foi relatado em EPS produzido por cianobactérias, especificamente ao gênero filamentosamente heterocitadas *Nostoc* (Dutta and Bhadury, 2020). A formação de agregados celulares na presença de arsênio no meio também já foi observada em outras linhagens de cianobactéria (Andy et al., 2008; Dutta and Bhadury, 2020), que se mostra como um mecanismo físico de proteção, diminuindo a superfície celular exposta ao ambiente, e a mobilidade de certos elementos no interior desses aglomerados.

#### **4.3.2 Linhagens homocitadas (*L. platensis* PCC7345 e *A. terrestris* CCM-UFV034)**

Para as linhagens homocitadas observou-se a morfologia filamentosamente dessas linhagens. O limite entre as células foi pouco visível, sendo observado apenas para alguns trechos do filamento da linhagem *L. platensis* PCC7345. Acreditamos que a presença de uma camada de EPS, na forma de uma bainha laminada sobre todo ou quase todo os filamentos de ambos organismos, dificultou a visualização dos limites celulares. Junto a isso, a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 apresentou uma camada de EPS mais rígida e contínua do que a linhagem *L. platensis* PCC7345. Esse padrão de uma bainha laminar é similar ao encontrado para a linhagem *Plectonema wollei* (St. Amand et al., 2005). Foi possível observar o EPS tanto nas condições controle como nas células expostas ao arsenito. Também foi observado o EPS de forma livre, em uma matriz (Setas amarelas – Figuras 15 e 16). Como já abordado, o EPS é uma matriz extracelular produzida por muitas cianobactérias e desempenha um papel importante na formação de biofilmes e na proteção contra estresses ambientais (Shalaby and Dubey, 2018). Sua presença indica que essas linhagens são capazes de produzir EPS mesmo em condições adversas, como a presença de

arsenito. A presença aumentada de EPS e células associadas em agregados também estão presentes nesses organismos, e indicam uma tentativa das células de se protegerem e se adaptarem à essas condições. Essa resposta em um aumento no padrão de agregamento de linhagens expostas ao arsênio já foi relatada para organismos da ordem unicelulares (Andy et al., 2008) e filamentosos (Dutta and Bhadury, 2020), como já abordado anteriormente.

Uma observação interessante é a presença de “vilosidades” nos tricomas de *A. terrestris* CCM-UFV034. Não foi possível definir a origem ou composição dessas estruturas, porém, acreditamos que sejam parte do EPS, provavelmente projeções da matriz dessa molécula. Pelas observações microscópicas, a quantidade dessas vilosidades parece estar superior nos tratamentos com arsênio, porém não foi possível aferir quantitativamente essa observação.

#### **4.3.3 Linhagens Heterocitadas (*Nostoc* sp. PCC7120 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035)**

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura trouxeram dados interessantes quanto a morfologia das linhagens. A presença de EPS foi observada em microcolônias para ambas linhagens, tanto no controle quanto nos tratamentos submetidos. Isso sugere que a produção de EPS é uma característica intrínseca dessas linhagens, independentemente da exposição ao arsenito. Sua presença nas microcolônias indica que essas linhagens são capazes de produzir EPS como a presença de arsenito. Vemos que a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 trouxe um EPS organizado de forma diferente da linhagem *Nostoc* sp. PCC7120, com uma matriz mais extensa e externa às microcolônias. Essa diferença é esperada vide a plasticidade fenotípica dentro do grupo das Nostocales.

Quanto às alterações observadas nas células expostas ao arsenito, foi constatado que, no tratamento com menor concentração de arsênio (T1), as células apresentaram um padrão menos arredondado e mais longilíneo. Essa mudança na morfologia pode indicar uma resposta adaptativa das células ao estresse causado pelo arsenito. Sabemos que quanto mais próxima a forma de um polígono a uma esfera, menor sua razão Superfície área/volume (SA/V). As células se podem se tornar mais alongadas em busca de alterar a relação SA/V, ou por alterações na divisão celular, levando a células com um maior comprimento antes da divisão (Harris

and Theriot, 2018). Junto a isso, essa alteração de volume/superfície celular pode ser um efeito da redução do volume citoplasmático sem uma redução da membrana plasmática.

No tratamento com maior concentração de arsenito (T2), além da mudança para um padrão mais longilíneo, foi observada a presença de células mais disformes e tricomas menores. Isso mostra que o arsenito em alta concentração pode afetar negativamente o crescimento e a morfologia das células. A fragmentação dos tricomas pode ser um dano causado pela desestabilização das membranas, efeito direto da presença de ROS (Andy et al., 2008; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015; Swapnil et al., 2017). Essa fragmentação ocorre pela morte de algumas células no tricoma, levando ao rompimento do mesmo (Adamec et al., 2005). Também, a fragmentação dos tricomas pode ser uma forma de reprodução/colonização desses indivíduos, realizada nessa condição hostis com o provável obtivo de dispersar células para novos ambientes.

A presença aumentada de EPS e células associadas em agregados também indicam uma tentativa das células de se protegerem e se adaptarem às condições adversas, formando uma matriz extracelular mais densa, diminuindo a mobilidade desse elemento para o interior das células. Já foi observado que agrupamento e agregação celular pode estar respostas ligadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como resultado, essa agregação permite a proteção das células de diversas condições durante este período de estresse (Sure et al. 2016). Novamente, os filamentos agregados também podem ser beneficiado por minimizar a área de superfície total e, assim, reduzir a exposição ao As, também já observado anteriormente (Dutta and Bhadury, 2020).

Considerando os dados do EDS, podemos destacar alguns elementos que tiveram alteração nas suas distribuições nos tratamentos com arsenito. Considerando o Carbono, as únicas alterações perceptíveis na distribuição foram uma redução na condição dos Tratamento 1 para linhagem *L. platensis* PCC7345 e ambos tratamentos para linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035.

Para os outros elementos, destacamos o Potássio que teve sua distribuição aumentada para as linhagens unicelulares e o Fósforo para as linhagens homocitadas.

Para os demais elementos, padrões de aumento e redução foram encontrados, mas sem nenhuma relação aparente comum às linhagens nos tratamentos.

## 5. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados aqui apresentados revelaram padrões distintos de resposta em termos de crescimento das linhagens estudadas quando expostas ao arsenito. As linhagens unicelulares, mostraram respostas diferentes ao tratamento com a maior concentração de arsenito, tendo a linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresentado reduções significativas no crescimento e na produtividade. Isso indica que as linhagens responderam, de maneiras distintas, ao arsenito, afetando diretamente seu crescimento e produtividade.

No caso das linhagens homocitadas, tanto a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 quanto a linhagem *L. platensis* PCC7345 apresentaram reduções na densidade óptica no tratamento com a maior concentração de arsenito. No entanto, a linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034 demonstrou uma capacidade maior de recuperação do estresse, mantendo níveis de produtividade semelhantes ao controle. Por outro lado, a linhagem *L. platensis* foi caracterizada por uma redução na produtividade mais expressiva do que na densidade óptica, indicando realocação de biomassa para sustentar o crescimento na condição exposta.

No caso das linhagens heterocitadas, a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 apresentou maiores reduções no crescimento e na produtividade em resposta ao arsenito em comparação com a linhagem *T. flavodiazotum*. CCM-UFV035. Isso sugere que a linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 possui uma maior capacidade de lidar com o arsenito e manter seu crescimento e produtividade. Além disso, considerando os dados cinéticos obtidos, as linhagens isoladas de ambientes contaminados com arsênio mostraram uma maior capacidade de se recuperar, crescer e produzir biomassa na presença de arsenito, em comparação com as linhagens modelo utilizadas no estudo, indicando uma potencial adaptação prévia às condições de exposição ao arsenito.

Os dados bioquímicos apresentados neste estudo revelam alterações metabólicas interessantes nas linhagens estudadas, em resposta à presença do arsenito. Houve uma clara mobilização de certos metabólitos em diferentes linhagens e tratamentos. No caso dos pigmentos, observou-se uma redução geral nas linhagens afetadas pelo tratamento com arsenito, sugerindo alterações nos aparatos

fotossintéticos. No entanto, uma linhagem específica, *A. terrestris* CCM-UFV034, apresentou um aumento do metabólito em resposta à menor concentração de arsenito, indicando uma possível sinergia entre a presença desse elemento e a síntese de clorofilas.

Em relação às proteínas e aminoácidos, foram observados padrões distintos de redução e aumento. A linhagem *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 apresentou um aumento desses metabólitos na maior concentração de arsenito, sugerindo uma alta degradação celular e impactos significativos do arsenito nesse organismo. Por outro lado, nas linhagens heterocitadas, houve uma redução nas proteínas e aminoácidos, indicando um investimento metabólico desses componentes na condição exposta. A linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 mostrou alterações apenas na fase Log, retornando aos níveis normais na fase estacionária, o que indica uma melhor performance no controle metabólico dentro do tratamento exposto.

Quanto aos níveis de glicogênio, foram também observados padrões de redução e aumento. Os aumentos desse metabólito podem estar associados a uma preparação para condições de estresse ou uma diminuição do controle sobre mecanismos regulatórios do fluxo de esqueletos carbônicos. Para as linhagens que apresentaram redução do glicogênio na presença de arsenito, acredita-se que o investimento energético para mitigação e evitação do arsenito desempenhe um papel importante nesse padrão.

Considerando as alterações morfológicas observadas nos indivíduos estudados, estratégias adaptativas para redução da exposição das células ao arsenito presente no meio de cultivo foram observadas. Essas respostas estão principalmente associadas a um aumento na produção de EPS (Exopolissacarídeos), que pode atuar como um imobilizador do arsenito, além de favorecer um maior padrão de agregação celular. Com efeito, impactos no diâmetro dos tricomas além de alterações superfície área/volume foram observadas na presença do arsenito.

Os resultados obtidos destacam a importância de considerar as respostas individuais das diferentes linhagens a estímulos e condições ambientais, como a presença de arsenito. Além disso, eles fornecem evidências acerca da capacidade de diferentes linhagens de cianobactérias em lidar com a presença do arsenito e sugerem

que algumas linhagens podem ser mais adequadas para aplicações em condições com a presença desse elemento tóxico. Os resultados deste estudo demonstram também que as linhagens estudadas respondem de maneiras diferentes à presença do arsenito, evidenciando alterações metabólicas distintas. Tomados em conjuntos, tais resultados contribuem significativamente para uma melhor compreensão dos efeitos do arsenito em organismos e podem ter implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias de mitigação e remediação de ambientes contaminados por arsenito, assim como o impacto dos contaminantes no metabolismo das cianobactérias. As modificações morfológicas observadas indicam uma resposta adaptativa das células para minimizar os efeitos do arsenito e possivelmente proteger a integridade celular. Todavia, são ainda necessárias mais investigações para compreender completamente os mecanismos subjacentes a tais alterações e seu papel na sobrevivência e resposta ao arsenito em cianobactérias. Cabe ressaltar ainda que mais estudos são necessários para compreender completamente os mecanismos subjacentes a essas respostas adaptativas e explorar o potencial de aplicação dessas linhagens em diferentes contextos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abiye, T.A., Bhattacharya, P., 2019. Arsenic concentration in groundwater: Archetypal study from South Africa. *Groundw. Sustain. Dev.* 9, 100246. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2019.100246>
- Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P., 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.006>
- Adamec, F., Kaftan, D., Nedbal, L., 2005. Stress-induced filament fragmentation of *Calothrix elenkinii* (Cyanobacteria) is facilitated by death of high-fluorescence cells. *J. Phycol.* 41, 835–839. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00104.x>
- Aires, U.R.V., Santos, B.S.M., Coelho, C.D., da Silva, D.D., Calijuri, M.L., 2018. Changes in land use and land cover as a result of the failure of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. *Land use policy* 70, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.10.026>
- Al-Amin, A., Parvin, F., Chakraborty, J., Kim, Y.I., 2021. Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability. *Environ. Technol. Rev.* 10, 44–57. <https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1869323>
- Almeida, A.V.M., Vaz, M.G.M.V., Castro, N.V. de, Genuário, D.B., Oder, J.C., Souza, P.A.M. de, Martins, S.B., Machado, M., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., 2023. How diverse a genus can be: An integrated multi-layered analysis into *Desmonostoc* (Nostocaceae, Cyanobacteriota). *Syst. Appl. Microbiol.* 46, 126422. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126422>
- Alquères, S.M.C., Oliveira, J.H.M., Nogueira, E.M., Guedes, H. V., Oliveira, P.L., Câmara, F., Baldani, J.I., Martins, O.B., 2010. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 192, 835–841. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0609-1>
- Alvarenga, L.V., Lucius, S., Vaz, M.G.M.V., Araújo, W.L., Hagemann, M., 2020. The novel strain *Desmonostoc salinum* CCM - UFV 059 shows higher salt and desiccation resistance compared to the model strain *Nostoc* sp. PCC 7120 . *J. Phycol.* 56, jpy.12968. <https://doi.org/10.1111/jpy.12968>
- Andy, R.I.D.H., Yon, D.E.Y.L., Ahendra, S.H.M., Aughlin, M.I.J.M.C.L., Ead, J.A.R.L.,

2008. NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY, AND EFFECTS. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Babele, P.K., Kumar, J., Chaturvedi, V., 2019. Proteomic De-regulation in cyanobacteria in response to abiotic stresses. *Front. Microbiol.* 10, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01315>
- Berger, L.R.R., Stamford, N.P., Willadino, L.G., Laranjeira, D., de Lima, M.A.B., Malheiros, S.M.M., de Oliveira, W.J., Stamford, T.C.M., 2016. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. *Biol. Control* 92, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.006>
- Bhattacharya, P., Pal, R., 2011. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *J. Appl. Phycol.* 23, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9617-4>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cano, M., Holland, S.C., Artier, J., Burnap, R.L., Ghirardi, M., Morgan, J.A., Yu, J., 2018. Glycogen Synthesis and Metabolite Overflow Contribute to Energy Balancing in Cyanobacteria. *Cell Rep.* 23, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.083>
- Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2015. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. <https://doi.org/10.3390/ijms16010871>
- Chen, J., Sun, G.X., Wang, X.X., Lorenzo, V. De, Rosen, B.P., Zhu, Y.G., 2014. Volatilization of arsenic from polluted soil by *Pseudomonas putida* engineered for expression of the *arsM* arsenic(III) S-adenosine methyltransferase gene. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10337–10344. <https://doi.org/10.1021/es502230b>
- Cordeiro, M.C., Garcia, G.D., Rocha, A.M., Tschoeke, D.A., Campeão, M.E., Appolinario, L.R., Soares, A.C., Leomil, L., Froes, A., Bahiense, L., Rezende, C.E., de Almeida, M.G., Rangel, T.P., De Oliveira, B.C.V., de Almeida, D.Q.R., Thompson, M.C., Thompson, C.C., Thompson, F.L., 2019. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. *Sci. Total Environ.* 654, 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.112>

- Cross, J.M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M., 2006. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* 142, 1574–1588. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>
- De Andrade, R.P., Santana Filho, S., De Mello, J.W.V., De Figueiredo, B.R., Dussin, T.M., 2008. Arsenic mobilization from sulfidic materials from gold mines in Minas Gerais State. *Quim. Nova* 31, 1127–1130. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500037>
- De Philippis, R., Colica, G., Micheletti, E., 2011. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: Molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 697–708. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z>
- De, R., 2002. Natural arsenic-contamination of surface and ground waters in Southern Switzerland (Ticino). *Bull. Appl. Geol.* 7, 81–103.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B., 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nat. Biotechnol.* 20, 1140–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt747>
- Dutta, S., Bhadury, P., 2020. Effect of arsenic on exopolysaccharide production in a diazotrophic cyanobacterium. *J. Appl. Phycol.* 32, 2915–2926. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02206-0>
- Eisler, R., Nwachuku, N., Gerba, C.P., 2004. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Fekih, I. Ben, Zhang, C., Li, Y.P., Zhao, Y., Alwathnani, H.A., Saquib, Q., Rensing, C., Cervantes, C., 2018. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02473>
- Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., Kruger, N.J., 2001. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212, 250–263. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>
- Ferrari, Susana G., Silva, P.G., González, D.M., Navoni, J.A., Silva, H.J., 2013. Tolerancia a arsénico de cianobacterias con usos biotecnológicos. *Rev. Argent. Microbiol.* 45, 174–179. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70021-X)

- Ferrari, Susana G, Silva, P.G., González, D.M., Navoni, J.A., Silva, H.J., 2013. M I C R O B I O L O G Í A Arsenic tolerance of cyanobacterial strains with potential use in biotechnology, *Rev Argent Microbiol*.
- Ferreira, F.A.G., Franco, M.W., De Oliveira, D.M., Magalhães, S.M.S., Barbosa, F.A.R., 2018. Arsenic tolerance of *Microcystis novacekii* (Komárek-Compère, 1974) and its arsenic decontamination potential. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 61, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160644>
- Figueiredo, B.R., Borba, R.P., Angélica, R.S., 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environ. Geochem. Health* 29, 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9074-9>
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J.W., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., Stroud, R.M., 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* (80-. ). 290, 481–486. <https://doi.org/10.1126/science.290.5491.481>
- Garbinski, L.D., Rosen, B.P., Chen, J., 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environ. Int.* 126, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., Zilliges, Y., 2012. Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiol. (United Kingdom)* 158, 3032–3043. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062950-0>
- H. Wegner, L., 2017. Cotransport of water and solutes in plant membranes: The molecular basis, and physiological functions. *AIMS Biophys.* 4, 192–209. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.2.192>
- Harris, L.K., Theriot, J.A., 2018. Surface Area to Volume Ratio: A Natural Variable for Bacterial Morphogenesis. *Trends Microbiol.* 26, 815–832. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.008>
- Hrouzek, P., Ventura, S., Lukešová, A., Mugnai, M.A., Turicchia, S., Komárek, J., Angela Turicchia, S., Komárek, J., 2005. Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and phenotypic variability. *Algol. Stud. für Hydrobiol. Suppl. Vol.* 117, 251–264. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0251>
- Huang, K., Chen, C., Shen, Q., Rosen, B.P., Zhao, F.J., 2015. Genetically engineering *Bacillus subtilis* with a heat-resistant arsenite methyltransferase for bioremediation of arsenic-contaminated organic waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6718–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-15>

- Huang, K., Chen, C., Zhang, J., Tang, Z., Shen, Q., Rosen, B.P., Zhao, F.J., 2016. Efficient Arsenic Methylation and Volatilization Mediated by a Novel Bacterium from an Arsenic-Contaminated Paddy Soil. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6389–6396. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01974>
- Huang, W.J., Wu, C.C., Chang, W.C., 2014. Bioaccumulation and toxicity of arsenic in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Environ. Monit. Assess.* 186, 805–814. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3418-6>
- Huertas, M., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A., Florencio, F., 2014. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms. *Life* 4, 865–886. <https://doi.org/10.3390/life4040865>
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00084-X)
- Ito, H., Tanaka, Y., Tsuji, H., Tanaka, A., 1993. Conversion of Chlorophyll b to Chlorophyll a by Isolated Cucumber Etioplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1492>
- Jaiswal, A., Koli, D.K., Kumar, A., Kumar, S., Sagar, S., 2018. Pigments analysis of cyanobacterial strains. ~ 1248 ~ *Int. J. Chem. Stud.* 6, 1248–1251.
- Jiang, J., Tam, L.M., Wang, P., Wang, Y., 2018. Arsenite Targets the RING Finger Domain of Rbx1 E3 Ubiquitin Ligase to Inhibit Proteasome-Mediated Degradation of Nrf2. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 380–387. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00062>
- Kalia, K., Joshi, D.N., 2009. Detoxification of arsenic. *Handb. Toxicol. Chem. Warf. Agents* 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/B978-012374484-5.00072-9>
- King, L.S., Kozono, D., Agre, P., 2004. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 687–698. <https://doi.org/10.1038/nrm1469>
- Kluska, K., Adamczyk, J., Krężel, A., 2018. Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coord. Chem. Rev.* 367, 18–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.009>
- Komárková, J., Jezberová, J., Komárek, O., Zapomělová, E., 2010. Variability of *Chroococcus* (cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships. *Hydrobiologia* 639, 69–83. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-0015-3>
- Ladeira, L.C.M., dos Santos, E.C., Valente, G.E., da Silva, J., Santos, T.A., dos Santos

- Costa Maldonado, I.R., 2020. Could biological tissue preservation methods change chemical elements proportion measured by energy dispersive X-ray spectroscopy? *Biol. Trace Elem. Res.* 196, 168–172. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01909-x>
- Laroche, C., 2022. Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. *Mar. Drugs* 20. <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C.C., 2009. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 258–278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>
- Lim, H., Tanaka, A., Tanaka, R., Ito, H., 2019. In Vitro Enzymatic Activity Assays Implicate the Existence of the Chlorophyll Cycle in Chlorophyll b-Containing Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 60, 2672–2683. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz157>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* 1, 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., Rosen, B.P., 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6053–6058. <https://doi.org/10.1073/pnas.092131899>
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migdal, I., Migocka, M., Bocer, T., Wysocki, R., 2010. The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Lett.* 584, 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.027>
- Maeda, S., Wada, H., Kumeda, K., Onoue, M., Ohki, A., Higashi, S., Takeshita, T., 1987. Methylation of inorganic arsenic by arsenic-tolerant freshwater algae. *Appl. Organomet. Chem.* 1, 465–472. <https://doi.org/10.1002/aoc.590010512>
- Miyashita, S.I., Murota, C., Kondo, K., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., 2016a. Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.* 13, 577–589. <https://doi.org/10.1071/EN15071>
- Miyashita, S.I., Murota, C., Kondo, K., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., 2016b. Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.* 13, 577–589. <https://doi.org/10.1071/EN15071>
- Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., 1999. Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the iron mountain superfund site, California. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3455–3462.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3455>

- Obuekwe, I.S., Vaz, M.G.M.V.M. V., Genuário, D.B., Castro, N.V. de, Almeida, A.V.M.M., Veloso, R.W., Pinto, G.N., Alvarenga, L. V., Mello, J. V., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., 2019. Arsenic-contaminated sediment from mining areas as source of morphological and phylogenetic distinct cyanobacterial lineages. *Algal Res.* 42, 101589. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101589>
- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M., 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6206–6215. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6206-6215.2005>
- Ortega-Martínez, P., Roldán, M., Díaz-Troya, S., Florencio, F.J., 2023. Stress response requires an efficient connection between glycogen and central carbon metabolism by phosphoglucomutases in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* 74, 1532–1550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac474>
- Ozturk, S., Aslim, B., Suludere, Z., 2009. Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresour. Technol.* 100, 5588–5593. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.001>
- P.L. Smedley\*, D.G.K., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochemistry* 17 8, 7899–7918. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- Pandey, S., Shrivastava, A.K., Rai, R., Rai, L.C., 2013. Molecular characterization of Alr1105 a novel arsenate reductase of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 and decoding its role in abiotic stress management in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 83, 417–432. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0100-x>
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P., 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 917–941. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00183.x>
- Pérez-Portilla, P., Araya, J., Gallardo, K., Aránguiz-Acuña, A., 2021. Potential of arsenic bioremediation by a cyanobacterium isolated from the Salado River in the Atacama Desert. *J. Plankton Res.* 43, 156–160. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbab016>

- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenerg.* 975, 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Postgate, J.R., 1982. Biology {Nitrogen} {Fixation}: {Fundamentals}. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 296, 375–385.
- Qin, J., Rosen, B.P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., Rensing, C., 2006. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2075–2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506836103>
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., Moreno, F., 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355, 625–631. <https://doi.org/10.1042/bj3550625>
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03186-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03186-1)
- Santini, J.M., Vanden Hoven, R.N., 2004. Molybdenum-Containing Arsenite Oxidase of the Chemolithoautotrophic Arsenite Oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186, 1614–1619. <https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1614-1619.2004>
- Santos, C., Gaspar, M., Caeiro, A., Branco-Price, C., Teixeira, A., Ferreira, R.B., 2006. Exposure of *Lemna minor* to arsenite: Expression levels of the components and intermediates of the ubiquitin/proteasome pathway. *Plant Cell Physiol.* 47, 1262–1273. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj096>
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.Ú.L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F., Batista, B.L., 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environ. Pollut.* 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>
- Shalaby, E.A., Dubey, N.K., 2018. Polysaccharides from cyanobacteria: Response to biotic and abiotic stress and their antiviral activity. *Indian J. Geo-Marine Sci.* 47, 21–33.
- Shilpi, G., Shilpi, S., Sunita, S., 2015. Tolerance against heavy metal toxicity in cyanobacteria: Role of antioxidant defense system. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7, 9–16.

- Singh, J.S., Abhilash, P.C., Singh, H.B., Singh, R.P., Singh, D.P., 2011. Genetically engineered bacteria: An emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.03.001>
- Sousa, A.C., 2014. Remoção de arsénio e antimónio de soluções aquosas por bioissorção.
- Srivastava, A.K., Bhargava, P., Thapar, R., Rai, L.C., 2009. Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress. *J. Basic Microbiol.* 49, 63–72. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800301>
- St. Amand, A., Hoover, R.B., Jerman, G.A., Coston, J., Rozanov, A.Y., 2005. Morphology and elemental composition of recent and fossil cyanobacteria. *Astrobiol. Planet. Mission.* 5906, 590603. <https://doi.org/10.1117/12.624854>
- Stomp, M., Van Dijk, M.A., Van Overzee, H.M.J., Wortel, M.T., Sigon, C.A.M., Egas, M., Hoogveld, H., Gons, H.J., Huisman, J., 2008. The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *Am. Nat.* 172, E169–E185. <https://doi.org/10.1086/591680>
- Swapnil, P., Yadav, A.K., Srivastav, S., Sharma, N.K., Srikrishna, S., Rai, A.K., 2017. Biphasic ROS accumulation and programmed cell death in a cyanobacterium exposed to salinity (NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). *Algal Res.* 23, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.014>
- Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., Moreno, F., 2016. Hexokinase 2 is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of mig1 protein repressor complex. *J. Biol. Chem.* 291, 7267–7285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>
- Vergara-Gerónimo, C.A., León Del Río, A., Rodríguez-Dorantes, M., Ostrosky-Wegman, P., Salazar, A.M., 2021. Arsenic-protein interactions as a mechanism of arsenic toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 431. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115738>
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I., 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57–58, 1–45. <https://doi.org/10.1023/A:1015798428743>
- Wang, P., Sun, G., Jia, Y., Meharg, A.A., Zhu, Y., 2014. A review on completing arsenic biogeochemical cycle: Microbial volatilization of arsines in environment. *J. Environ. Sci. (China)* 26, 371–381. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60432-](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60432-)

5

- Wang, Z., Luo, Z., Yan, C., Che, F., Yan, Y., 2014. Arsenic uptake and depuration kinetics in *Microcystis aeruginosa* under different phosphate regimes. *J. Hazard. Mater.* 276, 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.049>
- Wójtowicz, J., Jagielski, A.K., Mostowska, A., Gieczewska, K.B., 2021. Compensation mechanism of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana* ch1 mutants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22010221>
- Wysocki, R., Chéry, C.C., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, J.M., Tamás, M.J., 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 40, 1391–1401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02485.x>
- Yang, H.C., Fu, H.L., Lin, Y.F., Rosen, B.P., 2012. Pathways of Arsenic Uptake and Efflux, *Current Topics in Membranes*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>
- Yin, X.-X.X., Chen, J., Qin, J., Sun, G.X.G.-X., Rosen, B.P., Zhu, Y.-G.Y.G., 2011. Biotransformation and Volatilization of Arsenic by Three Photosynthetic Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 156, 1631–1638. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178947>
- Zapomělová, E., Hisem, D., Řeháková, K., Hrouzek, P., Jezberová, J., Komárková, J., Korelusová, J., Znachor, P., 2008. Experimental comparison of phenotypic plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis*/*A. crassa* complex (cyanobacteria). *J. Plankton Res.* 30, 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn081>
- Zavřel, T., Očenášová, P., Červený, J., 2017. Phenotypic characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLoS One* 12, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189130>



### CAPÍTULO 3

**TÍTULO: Filogenia comparativa entre genes *ars* e 16S rRNA em Cianobactérias morfológicamente distintas;**

Allan Victor Martins Almeida<sup>1</sup>, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz<sup>1#</sup>, Jean Coutinho Oder<sup>1</sup>, Thamires Emídio Sateles, Wagner Luiz Araújo\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Brazil.

#Current address: BCCM/ULC Culture Collection, InBios-Centre for Protein Engineering, University of Liège, Liège B-4000, Belgium.

\*Autor correspondente: Wagner L. Araújo

Departamento de Biologia Vegetal

Universidade Federal de Viçosa 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Telefone: +55-31-3612-5357 Email: wlaraujo@ufv.br

## RESUMO

As cianobactérias possuem mecanismos complexos para responder ao estresse causado pela presença de arsênio (As). Diversos estudos evidenciam que tais respostas abrangem uma ampla gama de modificações, incluindo alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genômicas e proteômicas. O operon *ars*, exemplificado em *Synechocystis* sp. PC6803, desempenha um papel central nesse contexto, sendo referido como operon *ars1*, *ars2* ou *ars3* de acordo com as variações nos genes regulatórios e nas proteínas presentes. Este operon produz dois mecanismos cruciais para a detoxificação do As na célula: uma redutase do arsenato (codificada por *arsC*) e uma permease do arsenito (codificada por *arsB* ou *acr3*). Outros genes, como *arsI1* e *arsM*, também participam dos mecanismos de resistência ao As em cianobactérias. A toxidez das formas inorgânicas de As é superior à dos compostos orgânicos, destacando a importância da enzima ArsM na metilação do As, gerando formas menos tóxicas. A filogenia dos genes *ars* surge como uma ferramenta relevante para a compreensão da evolução desses genes em cianobactérias, com implicações práticas na biotecnologia ambiental e preservação de ecossistemas. Além disso, são também discutidos processos como desintoxicação via biotransformação, e a menor tolerância de cianobactérias filamentosas ao As em comparação com linhagens unicelulares. A compreensão da filogenia dos genes *ars* é apresentada como um elemento crucial para insights na biotecnologia ambiental, possibilitando o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de remediação. A importância dessas informações é ressaltada em relação à preservação de ecossistemas e à promoção da saúde humana, dada a grave ameaça representada pela exposição ao As. Assim, o estudo da filogenia dos genes *ars* emerge como uma contribuição fundamental para a compreensão da evolução e aplicações práticas desses genes em cianobactérias. Os resultados obtidos para reconstrução filogenética dos genes estudados nesse trabalho mostram dados interessantes sobre a evolução de genes relacionados ao metabolismo de arsênio dentro do grupo das cianobactérias. A topologia obtida indica que o gene *acr3* pode ter surgido em momentos anteriores a diversificação de certos clados, como *Synechocystis*, *Microcoleus* e o grupo das Nostocales, visto os organismos desses gêneros na nossa análise se agruparam em ramos similares às reconstruções com base no gene da subunidade 16S do RNA ribossomal. As sequências para o gene *arsM* no grupo das cianobactérias formam um clado monofilético bem robusto. Essa relação indica que o gene *arsM* tem um surgimento bem antigo, assim como alguns trabalhos já indicam para o gene *arsC*. Nossos resultados reforçam essa relação evolutiva próxima entre o gene *arsM* e a filogenia do 16S rRNA. Em resumo, os resultados fornecem insights valiosos sobre a evolução dos genes *acr3* e *arsM* e sua relação com o operon *ars* nas cianobactérias, destacando a complexidade das relações filogenéticas e a necessidade de estudos adicionais para elucidar completamente esses processos evolutivos.

**Palavras chave:** Cianobactérias, arsênio, filogenia, operon *ars*, *acr3*, *arsM*

## ABSTRACT

Cyanobacteria possess complex mechanisms to respond to stress induced by the presence of arsenic (As). Various studies highlight that these responses encompass a broad spectrum of modifications, including morphological, physiological, biochemical, genomic, and proteomic alterations. The *ars* operon, exemplified in *Synechocystis* sp. PC6803, plays a central role in this context, referred to as *ars1*, *ars2*, or *ars3* operon based on variations in regulatory genes and associated proteins. This operon yields two crucial mechanisms for As detoxification within the cell: an arsenate reductase (encoded by *arsC*) and an arsenite permease (encoded by *arsB* or *acr3*). Other genes, such as *arsI1* and *arsM*, also participate in As resistance mechanisms in cyanobacteria. The toxicity of inorganic As forms surpasses that of organic compounds, underscoring the significance of the ArsM enzyme in As methylation, generating less toxic forms. The phylogeny of *ars* genes emerges as a pertinent tool for understanding the evolution of these genes in cyanobacteria, with practical implications in environmental biotechnology and ecosystem preservation. Additionally, processes such as detoxification through biotransformation are discussed, along with the lower tolerance of filamentous cyanobacteria to As compared to unicellular strains. Understanding the phylogeny of *ars* genes is presented as a crucial element for insights in environmental biotechnology, enabling the development of more efficient remediation strategies. The importance of this information is emphasized concerning ecosystem preservation and human health promotion, given the severe threat posed by As exposure. Thus, the study of *ars* gene phylogeny emerges as a fundamental contribution to comprehending the evolution and practical applications of these genes in cyanobacteria. The results obtained for the phylogenetic reconstruction of the studied genes in this work provide interesting insights into the evolution of genes related to arsenic metabolism within the cyanobacteria group. The obtained topology suggests that the presence of the *acr3* gene may have emerged earlier than the diversification of certain clades, such as *Synechocystis*, *Microcoleus*, and the Nostocales group, as organisms from these genera in our analysis clustered in branches similar to reconstructions based on the 16S rRNA gene. Sequences for the *arsM* gene in the cyanobacteria group form a robust monophyletic clade, indicating that the *arsM* gene has an ancient origin, consistent with previous findings for the *arsC* gene. Our results reinforce this close evolutionary relationship between the *arsM* gene and the 16S rRNA phylogeny. In summary, the results provide valuable insights into the evolution of *acr3* and *arsM* genes and their relationship with the *ars* operon in cyanobacteria, highlighting the complexity of phylogenetic relationships and the need for additional studies to fully elucidate these evolutionary processes.

**Keywords:** Cyanobacteria, arsenic, phylogeny, *ars* operon, *acr3*, *arsM*.

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias possuem mecanismos complexos para responder ao estresse causado pela presença de arsênio (As). Estudos no tema (Huertas et al., 2014; Pandey et al., 2013; Srivastava et al., 2009) mostraram que essas respostas envolvem alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genômicas e proteômicas. Além disso, várias espécies de cianobactérias são capazes de acumular e resistir ao As por meio de diversas biotransformações (Huang et al., 2012; Wang et al., 2013). Essa habilidade é crucial para a sobrevivência dessas bactérias em ambientes contaminados por As. Por exemplo, em *Synechocystis* sp. PC6803, que é a linhagem de cianobactéria mais bem caracterizada quanto à resistência e metabolismo do As, o operon *ars* (*arsBHC*) responde pelo principal mecanismo de resistência ao As (Huertas et al., 2014) Esse operon possui variações dentro do grupo das bactérias, sendo referido comumente como operon *ars1*, *ars2* ou *ars3*, com base nas variações dos genes regulatórios e das proteínas de efluxo presentes (Garbinski et al., 2019; Sousa et al., 2015). Esses operons geram como produto, dois dos principais mecanismos para a detoxificação do As na célula. O primeiro, uma redutase do arsenato, codificada pelo gene *arsC* (*arsC1*, *arsC2* e *arsC3* a depender do operon presente), que catalisa a redução do As pentavalente [As(V)] ao trivalente [As(III)], a partir da transferência de dois elétrons mediada por uma glutatona (Hughes, 2002). Em segundo, uma permease do arsenito, codificada pelo gene *arsB* ou *acr3*, *os quais têm a mesma função, porém, com algumas diferenças estruturais* (Garbinski et al., 2019). Essa permease irá bombear o As(III) através do antiporte de  $\text{As(OH)}_3/\text{H}^+$  ou  $\text{Sb(III)}/\text{H}^+$  para fora da célula (Kalia and Joshi, 2009). Quase todo operon *ars* tem um gene que codifica uma das duas proteínas de efluxo de As(III), *Acr3* ou *ArsB* (Castillo and Saier, 2010). Além desses genes, existem os genes regulatórios do operon, como o gene *arsR* (*arsR1*, *arsR2* *arsR4*). A presença dos genes *arsB/acr3* são fundamentais para a resposta ao arsenito no ambiente. Indivíduos com a ausência de ambos genes possuem fenótipo sensível ao As (Achour et al., 2007).

No operon *ars* também pode ser encontrado um gene que codifica a proteína *ArsH*, uma quinona redutase dependente de NADH, capaz de reduzir  $\text{CrO}_4^{2-}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , porém, sua função no metabolismo de As ainda não foi confirmada (Hervás et al., 2012; Suzuki et al., 1998). No entanto, estudos demonstram que ela possui um papel na resposta aos danos oxidativos gerados pelo estresse ao As (Hervás et al., 2012).

Outros dois genes para redutases de arsenato (*arsI1* e *arsI2*) (Sánchez-Riego et al., 2014) e uma metiltransferase de arsenito (*arsM*) (Yin et al., 2011) também foram encontrados participando dos mecanismos de resistência ao As em algumas cianobactérias, como *Nostoc* e *Synechocystis* (Ordóñez et al., 2005; Xue et al., 2019).

Em *E. coli*, o operon responsável pela resistência ao As é chamado *arsR(DA)BC*, no qual existe um regulador transcricional, mais especificamente um repressor, codificado pelo gene *arsR* (Cai and Dubow, 1996). Esse gene também já foi descrito em algumas cianobactérias, atuando da mesma forma, porém não acoplado ao operon *arsBHC* (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015). Também se sabe da existência de outros dois genes em *E. coli*, *arsD* e *arsA*. O gene *arsD* codifica um repressor transcricional, atuando de forma similar, porém independente ao *ArsR*. Já *arsA* codifica para uma permease dependente de ATP para o arsenito, que junto ao *arsB* (complexo *ArsAB*), é capaz de bombear o As(III) para fora da célula, necessitando neste caso de gasto ativo de ATP para esse bombeamento (Westenberg and Guerinot, 1997). A deleção de *arsD* de células de *E. coli* não remove a capacidade de tolerar As de linhagens mutantes, mas diminui sua eficiência de remoção, muito provavelmente, atuando diretamente na regulação da permease *ArsAB* (Garbinski et al., 2019). Homólogos do *arsR* já foram descritos para cianobactérias, como o gene *SmtB*, que também possui a função de regulador transcricional, porém a sua função celular está mais associada a homeostase de zinco (VanZile et al., 2002).

Geralmente, a toxidez das formas inorgânicas de As costuma ser maior que a dos compostos orgânicos contendo As, os quais são conhecidos como organoarsênios (Miyashita et al., 2016). Nesse sentido, foi demonstrado que a enzima As(III) S-adenosilmetionina metiltransferase, codificada por *arsM*, confere resistência ao As(III), catalisando a metilação deste. Desta forma, ocorre a produção de espécies metiladas pentavalentes menos tóxicas, incluindo metilarsenato [MAs (V)], dimetilarsenato [DMAs (V)], óxido de trimetilarsina [TMAsO] ou até compostos metilados voláteis (Miyashita et al., 2016; Qin et al., 2006; Yin et al., 2011). O efluxo e oxidação de As(III) também são considerados vias de desintoxicação eficientes em organismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* (Qin et al., 2009).

Tanto a metilação quanto a volatilização do As são afetadas pelas condições ambientais, como pH, temperatura (Huang et al., 2015; Zhao et al., 2013) e quantidade/tipo de material orgânico associado (Yang et al., 2018). Estudos mais

recentes mostraram que a volatilização de compostos arsênicos metilados compete com o efluxo desses compostos (Huang et al., 2015; Yang et al., 2020), visto que bactérias mutantes para o efluxo de As(III) são mais eficientes na volatilização do mesmo (Yang et al., 2020). As espécies de As trivalente metilado, metilarsenita [MAs (III)] e dimetilarsenita [DMA (III)], que são os produtos imediatos da biometilação de As(III) (Marapakala et al., 2015), são muito mais tóxicas do que a forma inorgânica As(III) (Mass et al., 2001; Petrick et al., 2000), sendo rapidamente oxidados para formas menos tóxicas (Mass et al., 2001), ou bombeados para fora da célula (Huang et al., 2015). Os MAs (V) também podem ser reduzidos a MAs (III) em algumas bactérias por uma redutase (Zhu et al., 2014). Desta forma, alguns organismos desenvolveram vários processos para se desintoxicar dos MAs (III) à medida que são formados. Os MAs (III), assim como As(III), são eliminados por oxidação ou efluxo em alguns microrganismos (Xue et al., 2019). Uma oxidorredutase dependente de NADPH-FMN (ArsH) e uma permease de membrana (ArsP) são responsáveis pela oxidação e efluxo de MAs (III), respectivamente (Huang et al., 2015), podendo algumas bactérias também apresentar uma permease codificada pelo gene *arsK* (Garbinski et al., 2019; Yang et al., 2012). Além disso, a desmetilação de MAs (III) catalisada por uma C-As liase (ArsI) é uma via de desintoxicação de MAs (III) eficaz (Zhu et al., 2014).

Outro processo realizado por cianobactérias de modo a evitar a toxidez causada pelo As é a chamada biotransformação (Miyashita et al., 2012). A partir de formas metiladas de As(MA), algumas cianobactérias e outros organismos, são capazes de incorporar essas moléculas ao metabolismo, tanto na forma de lipídeos quanto de açúcares, então chamados, arsenolipídeos e arsenoaçúcares (Dembitsky and Levitsky, 2004; Xue et al., 2019). Essas formas arseniadas de compostos orgânicos possuem uma toxicidade muito inferior às formas metiladas, e ao As elementar, como demonstrado por vários autores (Miyashita et al., 2016; Xue et al., 2019, 2014). As cianobactérias filamentosas parecem possuir uma menor tolerância ao As, quando comparadas a linhagens unicelulares. Essa possibilidade foi apresentada no estudo de Miyashita et al. (2016), no qual foram reunidos dados sobre a tolerância de linhagens unicelulares como *Synechocystis* e *Synechococcus*, bem como de linhagens filamentosas heterocitadas (*Anabaena*, *Nostoc*) e homocitadas (*Phormidium*). Essa tolerância diferencial parece existir não só para o As, mas também para outros elementos químicos que podem trazer danos às cianobactérias (Huertas

et al., 2014). Porém, pouco se sabe sobre qual(is) fator(es), genético ou morfológico, permite às cianobactérias unicelulares apresentarem uma maior tolerância a esses compostos (Al-Amin et al., 2021).

Além disso, compreender a filogenia dos genes *ars* pode fornecer *insights* importantes para a biotecnologia ambiental, permitindo o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para a remediação de áreas contaminadas. Essas informações podem contribuir para a preservação e conservação dos ecossistemas, bem como para a promoção da saúde humana, uma vez que a exposição ao As representa um sério risco para a vida em geral. Portanto, o estudo da filogenia dos genes *ars* desempenha um papel fundamental na compreensão da evolução e nas aplicações práticas relacionadas à presença desses genes em cianobactérias.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Seleção das linhagens

Para a realização deste trabalho foram selecionadas três linhagens morfológica e ecologicamente distintas, isoladas de ambientes hostis e ou contaminados por As: *Synechocystis* sp. CCM-UFV039, *Ancylothrix terrestris* CCM-UFV034 e *Trichormus flavodiazotum* CCM-UFV035. A linhagem unicelular, *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 foi isolada do lago salino-alcálico, Laguna Amarga, em Torres del Paine National Park, Chile. Ambas linhagens filamentosas foram isoladas a partir de um tanque de descarte de resíduos de arsênio, localizado na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), DBV, na Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Demais parâmetros de isolamento estão descritos no Capítulo 1 da Tese.

### 2.2 Amplificação dos genes *acr3* e *arsM*

Para verificar a existência de genes relacionados ao metabolismo de arsênio, foram amplificados por PCR fragmentos dos genes *acr3* (transportador de efluxo de arsenito) e *arsM* (metilação do arsenito). Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram modificados a partir de Sánchez-Riego et al., 2014, Yin et al., 2011 e Sandrini et al., 2016, e estão disponíveis na tabela 1. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µL de solução em microtubos de 0,2 mL. Foram adicionados tampão para a reação de PCR 1 X (20 mM Tris HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Brasil); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada primer e água ultrapura esterilizada para completar o volume da solução final.

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes *acr3* e *arsM* nas linhagens em estudo.

Nome da sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Sequência
>AV_arsB_F	ATGAGTAATGATTCACCACAA
>AV_arsB_R	TTGCTTGAGTTCTTACAAATAA
>AV_arsM_F	ATGACCTATTTAGAAACAGC
>AV_arsM_R	TTAACAGCAACCACCACCGTTATA

A reação foi conduzida em termociclador (ProFlex PCR System, Applied Biosystem, Life Technologies) e a verificação da amplificação dos fragmentos foi realizada por aplicação em gel de agarose (1% m/v em tampão TAE 1 X), imerso

em tampão TAE 1 X dentro de cuba de eletroforese (BIO-RAD) por 45 minutos, 70 V e 400 mA.

### 2.3 Sequenciamento dos fragmentos de PCR

Para sequenciamento dos fragmentos gênicos relativos às sequências dos genes do metabolismo de arsênio, os produtos das ampliações (pPCR) do item 2.2 foram purificados com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (REF A1125) de acordo com o fabricante. Em seguida, os pPCR purificados foram quantificados e secados em placas meia borda (modelo PCR-96-AB-C) para posterior sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no equipamento AB 3500 *Genetic Analyzer*, com geração de aproximadamente 800 nucleotídeos cada sequência pelo método Sanger (ACTGene).

### 2.4 Construção das árvores filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando a sequência de aminoácidos da proteína resultante da tradução da amplificação/sequenciamento gênico. A tradução da sequência obtida no tópico anterior foi executada com a ferramenta de tradução online Expasy - SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) (<https://web.expasy.org/>). Para a construção da árvore filogenética foram utilizados além das sequências obtidas nesse trabalho, sequências de linhagens de cianobactérias filogeneticamente afiliadas/relacionadas às em estudo, providas dos bancos de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Foram utilizados métodos diferentes para cada árvore de acordo com o *Best-Fit Model* (Tamura et al., 2021), sendo para o gene *acr3* o método LG+G (Le-Gascuel + distribuição gamma), e para o gene *arsM* o método JTT+G (Jones-Taylor-Thornton + distribuição gamma). Foi utilizado o software MEGA11 e todas árvores foram feitas com 1000 repetições amostrais (bootstrap=1000). Para a reconstrução da árvore do gene *acr3*, foi utilizada uma matriz de 59 sequências e 214 aminoácidos, e para a árvore do gene *arsM*, uma matriz de 51 sequências e 323 aminoácidos.

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Estrutura dos genes amplificados

O tamanho da sequência gerada para os genes amplificados, assim como o tamanho da proteína gerada pela tradução da sequência está descrito na Tabela 2. Foi possível amplificar os genes relativos à proteína Acr3 (bomba de efluxo de arsenito) para as linhagens *Synechocystis* sp. CCM-UFV039 e *A. terrestris* CCM-UFV034. Para o gene codante da proteína ArsM (**metiltransferase do arsenito**), foi possível recuperar a sequência completa apenas para a linhagem *T. flavodiazotum*. CCM-UFV035. Dentro dos bancos de dados, também foi possível resgatar as sequências de algumas linhagens de importância no capítulo anterior desse trabalho (Capítulo 2), especificamente o gene codante para a proteína Acr3 para as linhagens *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Nostoc* sp. PCC7120.

Tabela 2. Tamanho das amplificações geradas para os genes *acr3* e *arsM* nas linhagens em estudo.

Linagem	( <i>acr3</i> ) / Acr3	( <i>arsM</i> )/ArsM
<i>Synechocystis</i> sp. CCM-UFV039	(955pb) / 162aa	*
<i>Ancylothrix terrestris</i> CCM-UFV034	(954pb) / 231aa	*
<i>T. flavodiazotum</i> . CCM-UFV035	*	(1007pb) / 272aa

\*não foi possível recuperar a sequência em questão.

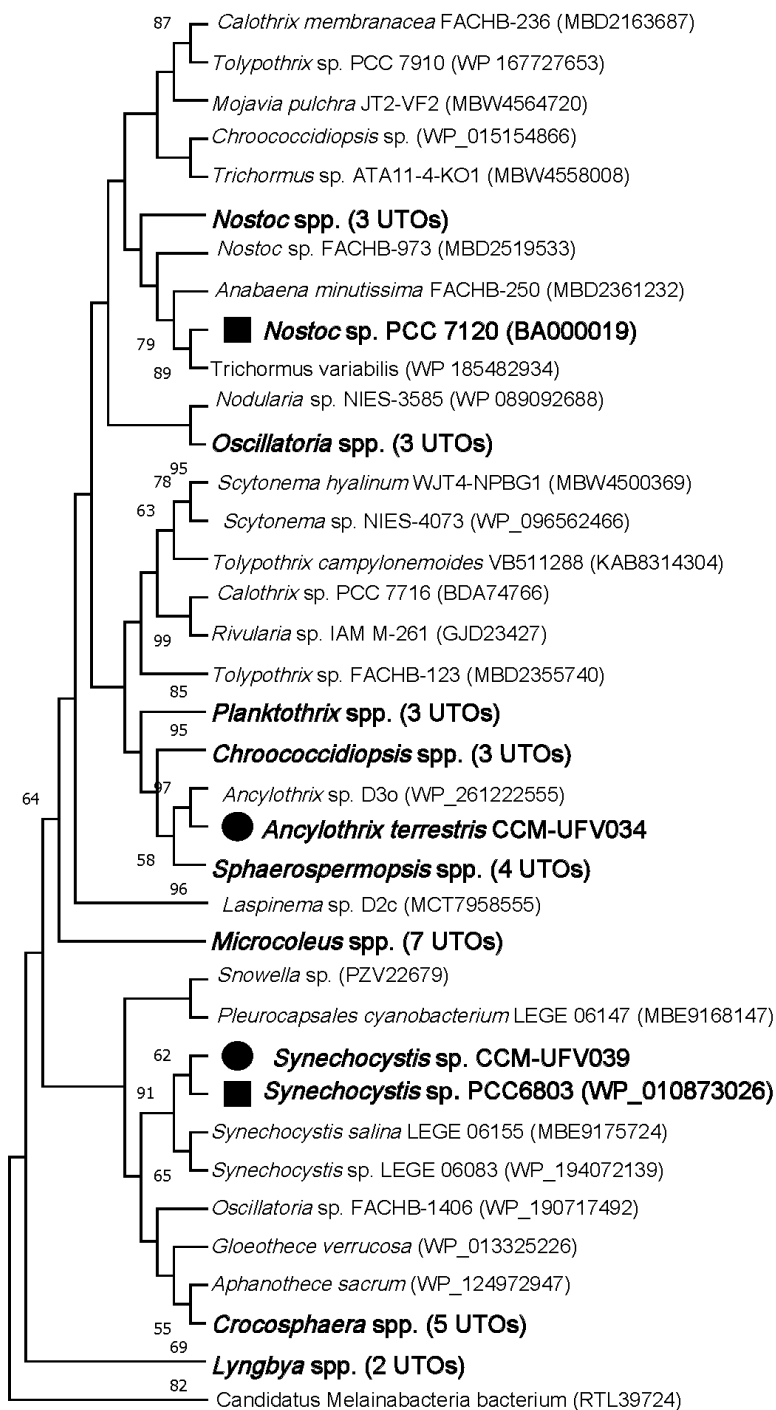
#### 3.2 Filogenia para o gene *acr3* (bomba de efluxo de arsenito)

Para a árvore filogenética gerada a partir das sequências proteicas do gene *acr3*, observa-se que as sequências amplificadas para as linhagens desse trabalho se posicionaram em grupos distintos.

A sequência obtida da linhagem *Synechocystis* CCM-UFV039 se posiciona próximo a linhagens do gênero *Synechocystis* (Figura XX). Próximo a essa linhagem temos a sequência da linhagem *Synechocystis* sp. PCC6803 (WP\_010873026), formando um agrupamento com uma reamostragem de 60 %. Se agrupando externo a essas linhagens, porém ainda com uma grande proximidade, temos as sequências para linhagens *Synechocystis salina* (MBE9175724) e outra sequência classificada como *Synechocystis* sp. (WP\_194072139) em um ramo com reamostragem de 61 %. Esses dois grupos descritos anteriormente compartilham uma reamostragem de 91 % (Figura 1). Vemos que no geral, as sequências disponíveis para linhagens unicelulares se agruparam em um ramo único, com gêneros como *Crocospaera*, *Aphanothece* e

*Snowella*. Uma exceção nesse grupo foi a presença de uma sequência classificada como *Oscillatoria* sp. FACHB-1406 (WP\_190717492).

**Figura 1.** Reconstrução filogenética do peptídeo traduzido do gene *acr3* para os produtos obtidos nesse trabalho.



Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada nas sequências do gene *acr3* das linhagens cianobactérias em estudo e outras ordens próximas filogeneticamente. As sequências recuperadas das linhagens estudadas estão destacadas em negrito com um círculo preto preenchido. As linhagens providas de bancos de dados e de importância para capítulos anteriores

desse trabalho estão destacadas em negrito com um quadrado preto preenchido. Um teste de bootstrap envolvendo 1.000 reamostragens foi realizado e valores de bootstrap > 50% estão dispostos nos nós relevantes.

Em relação a sequência derivada da linhagem *A. terrestris* CCM-UFV034, também é observado um posicionamento na árvore filogenética em um ramo compartilhado com outras sequência do seu mesmo gênero, especificamente a sequência *Ancylothrix* sp. D3o (WP\_261222555), com uma reamostragem de 97 %. Além disso, vemos que sequências para os gêneros *Planktothrix*, *Sphaerospermopsis* e *Chroococcidiopsis* também se relacionaram de forma proximal com as sequências para o gênero *Ancylothrix*. É importante destacar que com exceção do gênero *Planktothrix*, *Sphaerospermopsis* e *Chroococcidiopsis* não se relacionam filogeneticamente como gênero *Ancylothrix*.

Considerando a sequência para a linhagem *Nostoc* sp. PCC7120 recuperada dos bancos de dados, vemos que essa linhagem se agrupou com outras próximas filogeneticamente, considerando o gene para o rRNA 16S. Vemos uma proximidade com outras sequências classificadas como *Nostoc*, mas também *Anabaena* e *Trichormus*, todos da ordem Nostocales.

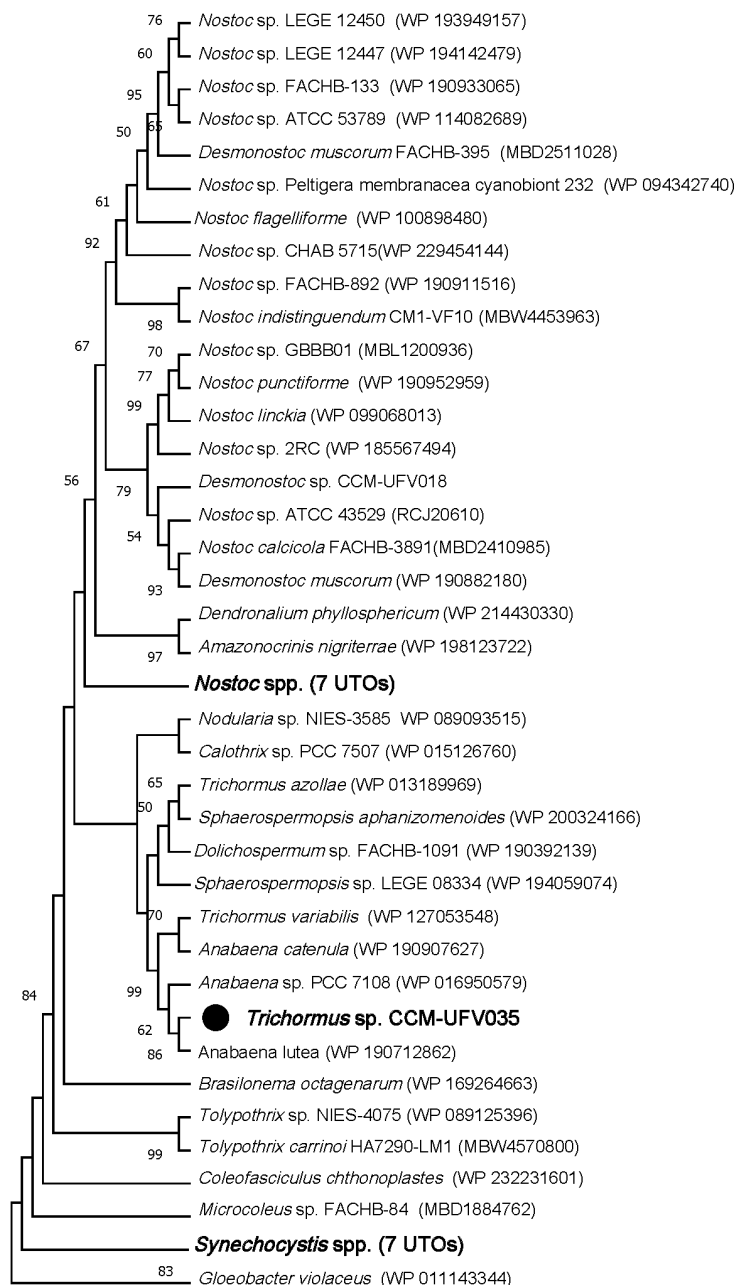
No geral, podemos observar que as sequências de aminoácidos para o gene *acr3* possuem uma distribuição similar para certos gêneros quando comparada a disposição encontrada para a filogenia do 16S. Porém, vemos algumas exceções, como a presença de sequências classificadas como *Chroococcidiopsis*, distribuídas dentro de um agrupamento com sequências para linhagens heterocitadas (*Nostoc*, *Anabaena*, *Trichormus*, *Tolypothrix* e *Scytonema*), e o gênero *Sphaerospermopsis* se relacionando com linhagens da ordem Oscillatoriales.

### 3.3 Filogenia para o gene *arsM* (metiltransferase do arsenito)

Para a reconstrução filogenética baseada em sequências codantes do gene *arsM*, foi possível amplificar de forma completa apenas o gene relativo à sequência da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035. Vemos que a sequência dessa linhagem se agrupou com outras sequências relativas aos gêneros *Trichormus* e *Anabaena* (Figura 2). De forma mais próxima à sequência da linhagem *T. flavodiazotum* CCM-UFV035 temos a formação de um grupo com a sequência *Anabaena lutea* (WP 190712862), com uma reamostragem de 86 %, e mais externo, a sequência *Anabaena* sp. PCC7108 (WP 016950579), com uma reamostragem de 62 %. Relacionado a esse

grupo temos a formação de um grupo com as sequências *T. variabilis* (WP 127053548) e *A. catenula* (WP 190907627). Esses dois grupos se relacionam com uma reamostragem de 99 %.

**Figura 2.** Reconstrução filogenética do peptídeo traduzido do gene *acr3* para os produtos obtidos nesse trabalho.



Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) baseada nas sequências do gene *arsM* das linhagens cianobactérias em estudo e outras ordens próximas filogeneticamente. As sequências recuperadas das linhagens estudadas estão destacadas em negrito com um círculo preto preenchido. Um teste de bootstrap envolvendo 1.000 reamostragens foi realizado e valores de bootstrap > 50% estão dispostos nos nós relevantes.

Podemos observar que diversos clusters genéricos se agruparam em ramos compartilhados, corroborando com as relações evolutivas do gene 16S rRNA, como o gênero *Synechocystis*. Também vemos esse padrão para o grupo das linhagens heterocitadas. Dentro do clado que agrupa as sequências Nostocales (linhagens heterocitadas) vemos a formação de dois grandes grupos, um agrupando sequências *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Dendronalium* e *Amazonocrinis*, e outro com sequências *Trichormus*, *Anabaena*, *Sphaerospermopsis*, *Dolichospermum*, *Calothrix* e *Nodularia*. Sequências de outras linhagens heterocitadas como *Tolypothrix* e *Brasilonema* caíram mais externas a esse grande agrupamento Nostocales. Também observamos a formação de ramos com indivíduos homocitados na posição basal da árvore filogenética, como *Microcoleus* e *Coleofasciculus*. Vemos que em geral, a árvore filogenética para o gene *arsM* possui uma topologia semelhante a distribuição encontrada na filogenia para o 16S.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Filogenia do gene *acr3*

Os resultados obtidos para reconstrução filogenética do gene *acr3* mostram dados interessantes sobre a evolução desse gene dentro do grupo das cianobactérias. Podemos destacar primariamente o grupo formado pelas linhagens do gênero *Synechocystis*, que apresentou um alto valor de reamostragem (91 %), indicando uma robustez nas relações entre esses indivíduos, quando considerado o gene *acr3*.

A topologia obtida indica que o a presença gene *acr3* pode ter surgido em momentos anteriores a diversificação de certos clados, como *Synechocystis*, *Microcoleus* e o grupo das Nostocales, visto os organismos desses gêneros na nossa análise se agruparam em ramos similares às reconstruções com base no gene da subunidade 16S do RNA ribossomal. Porém, nossas reconstruções também trazem algumas espécies se relacionando com indivíduos distantes filogeneticamente, considerando a filogenia do 16S rRNA. Por exemplo, o grupo *Sphaerospermopsis* (Nostocales), que se relacionou de forma mais próxima ao grupo *Ancylothrix* e *Planktothrix* (Oscillatoriales), bem como o grupo unicelular *Chroococciopsis* (Chroococciopsidales), se relacionando com tanto com linhagens heterocitadas (Nostocales), e homocitadas (Oscillatoriales). A relação entre indivíduos filamentosos homocitados e unicelulares ainda é bem controversa (Strunecký et al., 2022), mesmo quando considerando dados da filogenia do 16S rRNA e de genomas completos. Além disso, a disposição encontrada para sequências do gênero *Tolypothrix* (Nostocales) aparenta mostrar uma origem diversa para o gene *acr3*, com diversas sequências derivadas desses organismos espalhadas pela reconstrução filogenética.

Na literatura, a relação entre os genes dos operon *ars* é bastante complexa. Alguns trabalhos trazem a origem de alguns dos genes *ars*, como a arsenito oxidase (*AiO*) e arsenito redutase (*arsC*) como enzimas “anciãs”, tendo suas estruturas surgindo antes de eventos de diferenciação de clados como Bactéria e Archea (Jackson and Dugas, 2003; Lebrun et al., 2003).

Em relação ao gene *acr3*, vemos que sua presença pode ter acompanhado o operon *ars* em diversos casos, porém, a literatura também coloca eventos de deleção e transferência horizontal como eventos presentes na evolução desse gene no grupo das cianobactérias (Castillo and Saier, 2010). Podemos destacar a ambiguidade para a produção de uma proteína de efluxo do arsenito, sendo codificada por ambos os

genes *arsB* e *acr3* em operons *ars* nas cianobactérias. De acordo com a literatura, pelo menos uma cópia de um desses genes está presente na maioria das cianobactérias (Castillo and Saier, 2010), demonstrando sua importância para esses organismos. Supomos que a presença de ambos os genes nesses organismos poderia estar favorecendo eventos de deleção/transferência de uma das suas cópias, devido a essa ambiguidade. Podemos observar esses prováveis eventos de deleção gênica e transferência horizontal em alguns indivíduos do gênero *Chroococcidiopsis* (Brito et al., 2020) e *Tolypothrix* (Entfellner et al., 2017). Porém, uma análise mais robusta, com o foco da divergência desses genes, se faz necessária para a confirmação desses eventos.

#### 4.2 Filogenia do gene *arsM*

Considerando os resultados obtidos para reconstrução filogenética do gene *arsM* vemos uma forte congruência em relação aos dados da filogenia do gene 16S rRNA. O gene *arsM* é descrito como um gene amplamente distribuído e diverso, sendo distribuído diversos filos bacterianos (Desoeuvre et al., 2016). Junto a isso, as sequências para o *arsM* no grupo das cianobactéria formam um clado monofilético bem robusto (Chen et al., 2017). Essa relação indica que o gene *arsM* tem um surgimento bem antigo, assim como alguns trabalhos já indicam para o gene *arsC* (Jackson and Dugas, 2003). Nossos resultados reforçam essa relação evolutiva próxima entre o gene *arsM* e a filogenia do 16S rRNA.

É importante destacar que a topografia da árvore para gene *arsM* quando se comparada a filogenia do gene 16S rRNA ainda possui certas divergências quando analisadas as relações entre os indivíduos dentro do grupo das Nostocales. Vemos a presença de indivíduos do gênero *Sphaerospermopsis* e *Nodularia* (Aphanizomenonaceae) se relacionando mais fortemente com os gêneros *Anabaena* e *Trichormus* (Nostocaceae). As relações evolutivas do grupo *Sphaerospermopsis* são discutidas na literatura, pois mesmo utilizando-se da filogenia do 16S e até a análise de genomas completos, o gênero demonstra certa instabilidade dentro das reconstruções filogenéticas (Tuji and Niiyama, 2013), se agrupando em algumas reconstruções com indivíduos classificados como *Anabaena*. Vemos que essas divergências também são mantidas quando analisado o gene para *arsM*.

Interessantemente, os registros moleculares indicam que a presença do gene *arsM* no grupo das cianobactérias é um evento anterior à diversificação do grupo

“basal” *Gloeobacter* (Chen et al., 2017). Essa hipótese é reforçada pela presença do gene *arsM* no indivíduo conhecido como LCCA (*Last cyanobacterial common ancestor*). Os registros fósseis indicam que o gene *arsM* está presente no LCCA antes do grande evento de oxigenação (2,45 – 2,32 Bilhões de anos atrás) (Canfield et al., 2006), evento causado pelo surgimento e diversificação do grupo das cianobactérias. É importante destacar que a disponibilidade das sequências para esse gene ainda é insuficiente para uma análise mais robusta, necessitando ainda uma maior diversidade dos clados dos organismos do filo Cyanobacteriota. A literatura também traz que diversos eventos de THG (transferência horizontal de genes) ocorreram para o gene *arsM* de bactérias, distribuindo esses genes para grupos como *Metazoa*, Diatomáceas e dentro do próprio grupo das Bactérias. (Chen et al., 2017).

Além disso, a avaliação do gene *arsM* parece um bom indicativo da capacidade dos organismos de um ambiente de metabolizar o arsênio. Junto a isso, esse gene demonstra ter uma evolução congruente com a filogenia do gene 16S rRNA, apresentando poucas alterações/deleções/transferências dentro do grupo Cyanobacteriota, o que pode explicar uma grande importância desse gene nesses organismos.

## 5. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados da reconstrução filogenética dos genes *acr3* e *arsM* fornecem informações interessantes sobre a evolução desses genes dentro do grupo das cianobactérias. Para o gene *acr3*, podemos destacar o grupo *Synechocystis*, demonstrando relações robustas entre as linhagens quando considerado o gene *acr3*. A topologia obtida sugere que a presença do gene *acr3* pode ter surgido antes da diversificação de certos clados, como *Synechocystis*, *Microcoleus* e o grupo das Nostocales. No entanto, as reconstruções também revelam algumas relações filogenéticas que não seguem a filogenia do 16S. Por exemplo, o grupo *Sphaerospermopsis* (Nostocales) se relaciona mais estreitamente com os grupos *Ancylothrix* e *Planktothrix* (Oscillatoriales), enquanto o grupo unicelular *Chroococcidiopsis* (Chroococcidiopsidales) se relaciona tanto com linhagens heterocitadas (Nostocales) quanto homocitadas (Oscillatoriales). Além disso, o gênero *Tolypothrix* (Nostocales) mostra uma origem diversa, com diversas sequências espalhadas pela reconstrução filogenética. É possível que eventos de deleção gênica e transferência horizontal do gene *acr3* podem ter acontecido dentro do grupo das cianobactérias, como observado de acordo com as análises nos indivíduos do gênero *Chroococcidiopsis* e *Tolypothrix*. A presença ambígua de uma bomba de efluxo de arsenito, codificadas pelos genes *acr3* ou *arsB*, podem ter favorecido uma maior “promiscuidade” desses genes. No entanto, análises mais robustas focadas na divergência desses genes são necessárias para confirmar esses eventos.

Os resultados da reconstrução filogenética do gene *arsM* já revelam uma forte congruência com a filogenia do gene 16S rRNA, indicando uma relação evolutiva próxima entre esses dois genes. O gene *arsM* é amplamente distribuído e diverso, encontrado em vários filos bacterianos, e as sequências para o *arsM* no grupo das cianobactérias formam um clado monofilético robusto. Em resumo, os resultados fornecem insights valiosos sobre a evolução do gene *acr3* e sua relação com o operon *ars* nas cianobactérias, destacando a complexidade das relações filogenéticas e a necessidade de estudos adicionais para elucidar completamente esses processos evolutivos. Além disso, o gene *arsM* apresenta poucas alterações, deleções ou transferências dentro do grupo Cyanobacteriota, o que sugere uma importância significativa desse gene nesses organismos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P., 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.006>
- Al-Amin, A., Parvin, F., Chakraborty, J., Kim, Y.I., 2021. Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability. *Environ. Technol. Rev.* 10, 44–57. <https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1869323>
- Brito, Â., Vieira, J., Vieira, C.P., Zhu, T., Leão, P.N., Ramos, V., Lu, X., Vasconcelos, V.M., Gugger, M., Tamagnini, P., 2020. Comparative Genomics Discloses the Uniqueness and the Biosynthetic Potential of the Marine Cyanobacterium *Hyella patelloides*. *Front. Microbiol.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01527>
- Cai, J., Dubow, M.S., 1996. Chromosomal Ars Operon. *Can. J. Microbiol.* 42.
- Canfield, D.E., Rosing, M.T., Bjerrum, C., 2006. Early anaerobic metabolisms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1819–1836. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1906>
- Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2015. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. <https://doi.org/10.3390/ijms16010871>
- Castillo, R., Saier, M.H., 2010. Functional promiscuity of homologues of the bacterial ArsA ATPases. *Int. J. Microbiol.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/187373>
- Chen, S.C., Sun, G.X., Rosen, B.P., Zhang, S.Y., Deng, Y., Zhu, B.K., Rensing, C., Zhu, Y.G., 2017. Recurrent horizontal transfer of arsenite methyltransferase genes facilitated adaptation of life to arsenic. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08313-2>
- Dembitsky, V.M., Levitsky, D.O., 2004. Arsenolipids, *Progress in Lipid Research.* <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.07.001>
- Desoeuvre, A., Casiot, C., Héry, M., 2016. Diversity and Distribution of Arsenic-Related Genes Along a Pollution Gradient in a River Affected by Acid Mine Drainage. *Microb. Ecol.* 71, 672–685. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0710-8>
- Entfellner, E., Frei, M., Christiansen, G., Deng, L., Blom, J., Kurmayer, R., 2017. Evolution of anabaenopeptin peptide structural variability in the cyanobacterium *Planktothrix*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00219>

- Garbinski, L.D., Rosen, B.P., Chen, J., 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environ. Int.* 126, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- Hervás, M., López-Maury, L., León, P., Sánchez-Riego, A.M., Florencio, F.J., Navarro, J.A., 2012. ArsH from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is an efficient NADPH-dependent quinone reductase. *Biochemistry* 51, 1178–1187. <https://doi.org/10.1021/bi201904p>
- Huang, K., Chen, C., Shen, Q., Rosen, B.P., Zhao, F.J., 2015. Genetically engineering *Bacillus subtilis* with a heat-resistant arsenite methyltransferase for bioremediation of arsenic-contaminated organic waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6718–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-15>
- Huertas, M., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A., Florencio, F., 2014. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms. *Life* 4, 865–886. <https://doi.org/10.3390/life4040865>
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00084-X)
- Jackson, C.R., Dugas, S.L., 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol. Biol.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-3-18>
- Kalia, K., Joshi, D.N., 2009. Detoxification of arsenic. *Handb. Toxicol. Chem. Warf. Agents* 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/B978-012374484-5.00072-9>
- Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Muller, D., Lièvreumont, D., Lett, M.C., Nitschke, W., 2003. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 20, 686–693. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg071>
- Marapakala, K., Packianathan, C., Ajees, A.A., Dheeman, D.S., Sankaran, B., Kandavelu, P., Rosen, B.P., 2015. A disulfide-bond cascade mechanism for arsenic(III) S-adenosylmethionine methyltransferase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 71, 505–515. <https://doi.org/10.1107/S1399004714027552>
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D., 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 355–361. <https://doi.org/10.1021/tx000251l>
- Miyashita, S.I., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Kaise, T., 2012. Cyanobacteria produce arsenosugars. *Environ. Chem.* 9, 474–484. <https://doi.org/10.1071/EN12061>
- Miyashita, S.I., Murota, C., Kondo, K., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., 2016. Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.* 13, 577–589.

<https://doi.org/10.1071/EN15071>

- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M., 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6206–6215. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6206-6215.2005>
- Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Vasken Aposhian, H., 2000. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 203–207. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8872>
- Qin, J., Lehr, C.R., Yuan, C., Le, X.C., McDermott, T.R., Rosen, B.P., 2009. Biotransformation of arsenic by a yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5213–5217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900238106>
- Qin, J., Rosen, B.P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., Rensing, C., 2006. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2075–2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506836103>
- Sánchez-Riego, A.M., López-Maury, L., Florencio, F.J., 2014. Genomic responses to arsenic in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096826>
- Sandrini, G., Ji, X., Verspagen, J.M.H., Tann, R.P., Slot, P.C., Luimstra, V.M., Schuurmans, J.M., Matthijs, H.C.P., Huisman, J., 2016. Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 9315–9320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602435113>
- Sousa, T., Branco, R., Piedade, A.P., Morais, P. V., 2015. Hyper accumulation of arsenic in mutants of *Ochrobactrum tritici* silenced for arsenite efflux pumps. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131317>
- Strunecký, O., Ivanova, A.P., Mareš, J., 2022. An Updated Classification of Cyanobacterial Orders and Families Based on Phylogenomic and. *J. Phycol.* <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Suzuki, K., Wakao, N., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 1998. Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 411–418. <https://doi.org/10.1128/aem.64.2.411-418.1998>

- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tuji, A., Niiyama, Y., 2013. Morphology and Molecular Phylogenetics of *Sphaerospermopsis oumiana* (M. Watan.) Tuji et Niiyama Compared with *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Komárek) Werner et al. 39, 101–105.
- VanZile, M.L., Chen, X., Giedroc, D.P., 2002. Allosteric negative regulation of smt O/P binding of the zinc sensor, SmtB, by metal ions: A coupled equilibrium analysis. *Biochemistry* 41, 9776–9786. <https://doi.org/10.1021/bi020178t>
- Westenberg, D.J., Guerinot, M. Lou, 1997. 5 Regulation of Bacterial Gene Expression by Metals, *Advances in Genetics*. Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60310-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60310-7)
- Xue, X.M., Raber, G., Foster, S., Chen, S.C., Francesconi, K.A., Zhu, Y.G., 2014. Biosynthesis of arsenolipids by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Environ. Chem.* 11, 506–513. <https://doi.org/10.1071/EN14069>
- Xue, X.M., Ye, J., Raber, G., Rosen, B.P., Francesconi, K., Xiong, C., Zhu, Z., Rensing, C., Zhu, Y.G., 2019. Identification of Steps in the Pathway of Arsenosugar Biosynthesis. *Environ. Sci. Technol.* 53, 634–641. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04389>
- Yang, H.C., Fu, H.L., Lin, Y.F., Rosen, B.P., 2012. Pathways of Arsenic Uptake and Efflux, *Current Topics in Membranes*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>
- Yang, P., Ke, C., Zhao, C., kuang, Q., Liu, B., Xue, X., Rensing, C., Yang, S., 2020. ArsM-mediated arsenite volatilization is limited by efflux catalyzed by As efflux transporters. *Chemosphere* 239, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124822>
- Yang, Y.P., Zhang, H.M., Yuan, H.Y., Duan, G.L., Jin, D.C., Zhao, F.J., Zhu, Y.G., 2018. Microbe mediated arsenic release from iron minerals and arsenic methylation in rhizosphere controls arsenic fate in soil-rice system after straw incorporation. *Environ. Pollut.* 236, 598–608. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.099>
- Yin, X.-X.X.X., Chen, J., Qin, J., Sun, G.X.G.-X., Rosen, B.P., Zhu, Y.-G.Y.G., 2011. Biotransformation and Volatilization of Arsenic by Three Photosynthetic Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 156, 1631–1638.

<https://doi.org/10.1104/pp.111.178947>

Yin, X.X., Chen, J., Qin, J., Sun, G.X., Rosen, B.P., Zhu, Y.G., 2011. Biotransformation and volatilization of arsenic by three photosynthetic cyanobacteria. *Plant Physiol.* 156, 1631–1638. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178947>

Zhao, F.J., Harris, E., Yan, J., Ma, J., Wu, L., Liu, W., McGrath, S.P., Zhou, J., Zhu, Y.G., 2013. Arsenic methylation in soils and its relationship with microbial arsM abundance and diversity, and As speciation in rice. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7147–7154. <https://doi.org/10.1021/es304977m>

Zhu, Y.G., Yoshinaga, M., Zhao, F.J., Rosen, B.P., 2014. Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 443–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060313-054942>

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesse trabalho foi possível identificar e classificar 3 organismos isolados de ambientes hostis. Além disso, também avaliamos o crescimento, as alterações metabólicas e fisiológicas, e a morfologia de seis cianobactérias expostas a duas concentrações de arsenito. Não menos importante, também foi possível analisar e comparar a filogenia de genes do metabolismo de arsênio, *acr3* e *arsM*, com a filogenia do gene 16S rRNA.

Destacamos aqui, que o a presença desses organismos em ambientes contaminados com arsênio demonstra sua flexibilidade em colonizar ambientes diversos. Também foi observado que mesmo altas concentrações de arsenito, alguns desses organismos (*A. terrestris* CCM-UFV034 e *T. flavodiazotum* CCM-UFV035) conseguiram manter um crescimento e até recuperar padrões próximos a condições ótimas, no fim dos experimentos. O fato que organismos isolados de ambientes contaminados com arsênio possam responder de forma melhor à presença desse elemento, mostram a presença de mecanismos eficientes na mobilização/remoção desse elemento, e a mitigação dos seus efeitos.

Vemos também, que uma resposta direcionada à produção de um polímero celular externo (EPS), e um aumento dos padrões de agregação das células e tricomas indicam ser uma resposta geral a exposição ao arsenito. Essa resposta parece indicar um papel desses padrões na redução da mobilidade e do contato do arsenito à célula.

Esse trabalho trouxe informações importantes dentro de como o metabolismo desses organismos foi afetado por esse contaminante, e indicam certos padrões de resposta que podem ser aprofundamentos em demais estudos.

A coleta, identificação e caracterização de organismos isolados de ambientes contaminados trazem uma importância devido ao potencial uso desses organismos fotoautotróficos em aplicações biotecnológica, considerando ambientes contaminados por arsênio. Não menos importante, o entendimento do seu metabolismo nessas condições pode contribuir para diversas áreas científicas.