

CAMILA QUEIROZ GOMES

**CARACTERIZAÇÃO DE *Geitlerinema* UFV-E01 (CYANOBACTERIA) E
Stigeoclonium UFV-E02 (CHLOROPHYTA) CULTIVADAS EM PRESENÇA DE
ARSÊNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

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

T

G633c
2005

Gomes, Camila Queiroz, 1977-
Caracterização de *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-E02 (Chlorophyta) cultivadas em presença de arsênio / Camila Queiroz Gomes. – Viçosa : UFV, 2005.
ix, 68f. : il. ; 29cm.

Orientador: Rosane Maria Aguiar Euclides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alga - Efeito do arsênio. 2. Alga - Morfologia.
3. Alga - Crescimento. 4. Alga - Genética molecular.
5. Arsênio - Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.8

Já sei aonde ir, já sei onde ficar,
agora só me falta partir...”

Arnaldo Antunes

“... Se as coisas não saírem como planejei,
posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.
O dia está na minha frente, esperando para
ser o que eu quiser. E aqui estou eu,
o escultor que pode dar forma.
Tudo depende só de mim.”

Charles Chaplin

Dedico esta conquista a Deus.
A meus pais, Vivi e Cristina, por terem me dado à
oportunidade de construir minha trajetória.
A meu irmão Cristiano, por tudo.
Ao André, por ter compreendido minha
ausência com paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A Dra. Rosane M. Aguiar Euclides, pela orientação, pela amizade, pelos constantes ensinamentos e pela confiança depositada.

Aos meus conselheiros, Dr. Juraci Alves de Oliveira, Dr. Marco Antonio Oliva Cano pelas sugestões, pelas críticas e constante apoio.

Ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA/USP, em especial a Dra. Marli de Fátima Fiore, pelos ensinamentos durante a realização dos trabalhos de Biologia Molecular e por ter me recebido com carinho e simpatia.

A Dra. Aristéia Alves Azevedo pela disponibilidade e valiosas sugestões.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pela disponibilidade de sua infraestrutura na realização das micrografias.

Aos técnicos Rogério Gomide, João Bosco e José Quintão, pela disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

Ao Daniel pela grande paciência e disponibilidade em ensinar seus conhecimentos.

A Fernanda, pela amizade sincera, pela ajuda com as fotos e pela torcida.

Aos amigos da UCP, Kacilda, Alan, Tatiane, Rogério Ribas e Fábio, pelos conselhos, apoio e a grande amizade.

Ao Francisco e Alan, pelas sugestões e orientação no trabalho Estatístico.

Aos Funcionários do Departamento de Biologia Vegetal pela atenção e apoio.

Ao meu primo Júnior, pelo grande e fundamental incentivo.

A Juliana, pela amizade e por sempre me abrir “às portas” quando fiquei sozinha (em Juiz de Fora e Viçosa).

A todos meus colegas de Pós-Graduação, por me incentivarem sempre.

A Priscilla e a Agnes por terem me acompanhado no início e por torcerem, mesmo de longe, pela minha conquista.

Aos meus tios, primos e amigos de Dom Silvério, que de alguma forma, torceram por mim. MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

Camila Queiroz Gomes, filha de Vicente de Paula Gomes e Maria Cristina de Queiroz Gomes, nascida em Ponte Nova, Minas Gerais, em 21 de novembro de 1977.

Em 2002, recebeu o título de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em março de 2003 iniciou o curso de Mestrado em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2004 conclui os requisitos para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

Conteúdo

Resumo	vii
Abstract	viii
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	3
CAPÍTULO 1 ABSORÇÃO DE ARSÊNIO EM <i>Geitlerinema</i> UFV-E01 E <i>Stigeoclonium</i> UFV-E02	5
1. Introdução	5
2. Revisão Bibliográfica	8
2.1 Caracterização de cianobactérias e algas eucarióticas	8
2.2 A problemática do arsênio	9
2.3 A absorção de metais por organismos planctônicos	11
2.3.1 Efeito do arsênio em cianobactérias e algas	13
3. Material e Métodos	18
3.1 Local e Métodos de Coleta	18
3.2 Isolamento	18
3.3 Seleção de espécies e Manutenção das culturas	20
3.3.1 Produção de biomassa	21
3.4 Análise da absorção de arsênio	22
3.5 Avaliação da toxicidade do arsênio	24
3.5.1 Análise de crescimento de células expostas ao arsênio	24
3.5.2 Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio	24
4. Resultados	26
4.1 Coleta e Isolamento	26
4.2 Seleção das espécies	26
4.3 Produção de biomassa	27
4.4 Análise da absorção de arsênio	29
4.5 Avaliação da toxicidade de arsênio	32
4.5.1 Análise de crescimento de células expostas ao arsênio	32
4.5.2 Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio	35
5. Discussões	41
5.1 Isolamento dos organismos	41
5.2 Seleção de espécies	41

5.3	Análise da absorção de arsênio	42
5.4	Avaliação da toxicidade de arsênio	45
5.4.1	Análise de crescimento de células expostas ao arsênio	45
5.4.2	Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio	46
6.	Conclusões	48
7.	Referências Bibliográficas	49
	CAPÍTULO 2 – ANÁLISE MOLECULAR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM <i>Geitlerinema</i> UFV-E01 (CYANOBACTERIA)	53
1.	Introdução e Revisão Bibliográfica	53
2.	Material e Métodos	57
2.1	Teste imuno-enzimático (ELISA) para detecção de cianotoxina	57
2.2	Extração de DNA genômico de culturas puras	58
2.3	Amplificação do gene <i>mycA</i>	58
2.4	Amplificação do gene <i>smtA</i>	59
3.	Resultados e Discussões	60
3.1	Teste imuno-enzimático (ELISA) para detecção de cianotoxina	60
3.2	Extração de DNA genômico de culturas puras	61
3.3	Amplificação do gene <i>mycA</i>	61
3.4	Amplificação do gene <i>smtA</i>	62
4.	Conclusões	64
5.	Referências Bibliográficas	65
	Conclusões Gerais	67

RESUMO

GOMES, Camila Queiroz, M. S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Caracterização de *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-E02 (Chlorophyta) cultivadas em presença de arsênio.** Orientadora: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Conselheiros: Juraci Alves de Oliveira e Marco Antonio Oliva Cano.

As cianobactérias e algas são organismos encontrados, abundantemente, em ambientes aquáticos, onde atuam como produtores primários transferindo energia para os diferentes níveis tróficos. A ocorrência de substâncias tóxicas ou xenobióticas tem sido uma ameaça constante nos ecossistemas aquáticos. Tais substâncias podem causar efeitos tóxicos sobre diferentes grupos de cianobactérias e algas afetando em nível celular, de população e comunidade, causando prejuízos a cadeia trófica, nestes ambientes. O arsênio (As) é um elemento tóxico frequentemente associado com depósitos de ouro. Através da mineração, o As é trazido à superfície pelo processo de drenagem ácida sendo, posteriormente, lixiviado e contaminando os corpos d'água. Estudos evidenciam que cianobactérias e algas podem acumular As intracelularmente, sendo capazes de biotransformar as formas tóxicas em formas não tóxicas. A utilização destes processos permite a utilização destes organismos como biorremediadores na descontaminação de ambientes aquáticos contaminados pelo As. Com o objetivo de caracterizar os gêneros *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, cultivados na presença de As, foram conduzidos, em laboratório, estudos sobre o crescimento, a absorção e a toxicidade do As. Para a caracterização foram utilizados como parâmetros a alteração morfológica, a produção de biomassa, para ambos os gêneros. A detecção do gene *smtA* que codifica a proteína metalotioneína (técnica de PCR), foi feita apenas em *Geitlerinema* UFV-E01. Os resultados mostraram que a absorção de As, em *Geitlerinema* UFV-E01, foi maior em células cultivadas em meio BG-11 B, com baixa concentração de fosfato ($6,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). A absorção de As foi proporcional às concentrações crescentes do elemento no meio de cultivo, atingindo o pico máximo de absorção em 24 horas de exposição ($665,25 \mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$ para células cultivadas em meio BG-11 A e $1.290,32 \mu\text{g de As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$, para células cultivadas em meio BG-11 B), sendo observado uma queda em 48 horas de exposição ($500,00 \mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$ para células cultivadas em meio BG-11 A, com $17,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fosfato, e $810,00 \mu\text{g de As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$ para células cultivadas em meio BG-11 B). As células de *Geitlerinema* UFV-E01 não apresentaram alterações morfológicas e não houve redução na produção de biomassa. Entretanto, foi

observada a presença de grânulos densos no citoplasma das células. Os resultados obtidos, por meio da técnica de PCR, mostraram que *Geitlerinema* UFV-E01 não possui o gene *smtA* que codifica a proteína metalotioneína, sugerindo que a cianobactéria não utiliza esta estratégia nos processos de detoxificação celular. A absorção de As pelas células de *Stigeoclonium* UFV-E02, não foram influenciadas pelas concentrações de fosfato no meio BG-11 líquido. A absorção máxima de As ocorreu em 24 horas de exposição ($1.300 \mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$) e foi mantida constante em 48 horas de exposição. Entretanto, em *Stigeoclonium* UFV-E02, houve redução na produção de biomassa e, também, alterações morfológicas nos filamentos caracterizados pelo aparecimento de células estreitas e longas, com cloroplastos deformados e de tamanho reduzido quando comparado com células saudas (controle).

ABSTRACT

GOMES, Camila Queiroz, M. S. Universidade Federal de Viçosa, february of the 2005.
Characterization of *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) and *Stigeoclonium* UFV-E02 (Chlorophyta) grown in presence of arsenic. Adviser: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Consultant: Juraci Alves de Oliveira and Marco Antonio Oliva Cano.

Cyanobacteria and algae are important primary producers in aquatic ecosystems and their energy is transferred throughout the different levels of the environmental trophic chain. The presence of xenobiotic or toxic elements has been a constant threat to aquatic ecosystems. These elements can cause considerable negative effects on microorganisms, since it can affect their different organization levels and consequently impairing the whole trophic chain. The arsenic (As) is a potential toxic element frequently associated with gold deposits. It can be brought to the surface by the gold mining activity, alongside the acid drainage and latter lixiviated, causing water bodies' contamination. Previous study has shown that cyanobacteria and algae can accumulated toxic As within the cells and sometimes transforming it into a non toxic form. Such trait can be useful for bioremediation purpose, by using these organisms on As decontamination of aquatic environments. In order to assess the bioremediator potential of *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) and *Stigeoclonium* UFV-02 genera, absorption and toxicity tests were carried out on selected lineages, cultivated in presence of As, under laboratory conditions. The morphological alterations and biomass production were used as evaluation parameters to portray the two genera in relation to As presence. The identification of the *smtA* gene, which codifies the metallothioneina, was performed on the *Geitlerinema* UFV-E01 genus by PCR technique. The results indicated that the As absorption by *Geitlerinema* UFV-E01 cells was greater when they were cultivated in low phosphorus content ($6,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) BG-11 medium. The As absorption was proportional to the increase on the element content in culture medium, reaching the maximum after 24 hours of exposure either in the BG-11A medium ($665,25 \mu\text{g As.g}^{-1}\text{ms}$ in BG-11 A and $1.290,32 \mu\text{g As.g}^{-1}\text{ms}$ in medium BG-11 B). After 48 hours of exposure to As, it was observed a decrease in the amount of element in the cells on both mediums tested, ($500,00 \mu\text{g As.g}^{-1}\text{ms}$ in medium BG-11 A with $17,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ of fosfato, and $810,00 \mu\text{g de As.g}^{-1}\text{ms}$ in medium BG-11 B). The G. cells did not shown any signs of morphological alteration or biomass production decay in any of the culture medium tested. Nevertheless, dense corpuscles were observed in the cytoplasm of the cells cultivated. The PCR results revealed that the *Geitlerinema* UFV-E01 genus does not have the *SmtA* gene, suggesting that this cyanobacteria can be using other

mechanism for As detoxification. As detoxification by *S.* cells was not influenced by the phosphate concentration in the BG-11 medium. The maximum As absorption took place after 24 hours of exposure ($1,300\mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}\text{ms}$) and stayed constant for 48 hours. It was observed that *Stigeoclonium* UFV-02 genus had a decrease in the production of biomass and morphological alterations. The filaments shown longer and striated cells, containing smaller and deformed chloroplasts when compared to the control material.

Introdução geral

Os poluentes inorgânicos, como metais e metalóides, são amplamente difundidos nos ecossistemas aquáticos. Processos geoquímicos ou antropogênicos liberam compostos inorgânicos no ecossistema aquático e provocam alterações na qualidade da água, refletindo na estrutura da comunidade fitoplanctônica (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2001).

Cianobactérias e algas eucarióticas são organismos encontrados em abundância em ambientes aquáticos. Cianobactérias são organismos procarióticos, cuja parede celular é constituída principalmente de peptidoglicano, enquanto que as algas são organismos eucarióticos, cuja parede celular é constituída principalmente de celulose (LEE, 1999). PIRSZEL *et al.* (1995), constataram que variações estruturais e químicas, tais como quantidade e grau de dissociação dos grupos carboxílicos, fosfatos, hidroxílicos e aminos, componentes da superfície celular, bem como, as alterações morfológicas podem ser os responsáveis pelas diferenças na capacidade de biosorção de poluentes orgânicos e inorgânicos.

Atualmente, o arsênio (As) tem recebido especial atenção das autoridades governamentais e de saúde pública, devido aos seus efeitos tóxicos, em concentrações elevadas e exposição prolongada, para os organismos vivos e, principalmente, para o homem. A contaminação por As ocorre, principalmente, pela ingestão de água contaminada (BARRA *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000).

O arsênio é encontrado, naturalmente, em alguns minerais como a pirita (FeS_2), a arsenopirita (FeAsS), os sais de cobre, níquel e outros minerais sulfetados (CERVANTES *et al.*, 1994; SANTANA-FILHO, 2000). A principal origem da contaminação por As, em ambientes aquáticos, é atribuída as atividades antropogênicas, principalmente atividades de mineração. Os minerais contendo o As são trazidos a superfície, sofrem o processo de drenagem ácida e são lixiviados, contaminando os corpos d'água (SANTANA-FILHO, 2000).

Pesquisas realizadas com cianobactérias e algas relatam a existência de espécies acumuladoras de arsênio (MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994, KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999; DEMBITSKY & REZANKA, 2003). Além disso, algumas pesquisas descrevem os mecanismos de biotransformação de formas inorgânicas em formas metiladas (CERVANTES *et al.*, 1994; KAISE *et al.*, 1999).

As espécies de cianobactérias e algas que possuem capacidade de absorção de arsênio e, os processos metabólicos existentes, como os mecanismos de oxidação/redução, permitem aos pesquisadores utilizar as cianobactérias e as algas como organismos biorremediadores na descontaminação de ambientes poluídos por este elemento (BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*,

2000). Dentre as cianobactérias e as algas que apresentam a capacidade de transformar formas inorgânicas de arsênio em formas metiladas, ou formas não tóxicas, podem ser citadas *Chlamydomonas reihardtii*, *Polyphysa peniculus*, *Chlorella vulgaris* e *Phormidium* sp. (MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994; CALZADA *et al.*, 1999; KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

Pesquisas apontam algumas espécies de cianobactérias como organismos altamente resistentes aos metais pesados (CERVANTES *et al.*, 1994; YBARRA & WEBB, 1998). As cianobactérias possuem ampla variedade de mecanismos envolvidos na tolerância de metais pesados, em nível celular. Estudos fisiológicos têm mostrado que o principal mecanismo de tolerância envolve complexação de íons metálicos no citosol, através das metalotioneínas (MTs) ou fitoquelatinas (SILVER & WALDERHAUG, 1995; GUPTA *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2003).

As pesquisas são incipientes sobre a toxicidade do arsênio e seus efeitos deletérios sobre as espécies de algas planctônicas, principalmente no Brasil, não há relatos sobre estudos com espécies de algas tropicais tolerantes e acumuladoras de As. Os estudos sobre absorção, toxicidade e especiação de As, pelos microrganismos, é de grande relevância, devido à presença de inúmeras áreas de mineração de ouro no estado de Minas Gerais, as quais são potencialmente fontes de contaminação de As em solos, águas superficiais, sedimentos e aquíferos. Portanto, o presente estudo buscou determinar a capacidade de absorção de As em *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, isolados a partir de um ambiente dulcícola; avaliar as alterações morfológicas e a toxicidade do arsênio, nos isolados, utilizando como parâmetro a produção de biomassa avaliado pelo conteúdo de clorofila *a*.

Os genes envolvidos na síntese das metalotioneínas são arrançados em um operon, sendo o locus denominado *smt*, que contém o gene *smtA* (codifica a MT) e o gene *smtB* (repressor, regulador da proteína). O gene *smtA* foi também relatado para o gênero *Synechocystis* PCC6714 (CERVANTES *et al.*, 1994; YBARRA & WEBB, 1998).

O gênero *Geitlerinema* pertence à Ordem Oscillatoriales (ANAGNOSTIDIS, 1989). Esta ordem também inclui a espécie *Oscillatoria brevis*, na qual foram identificados dois mecanismos de resistência aos metais pesados: produção de metalotioneína e transportador de membrana, CPx-ATPases, que exclui os íons metálicos do citosol (LIU *et al.*, 2003).

Assim, a partir dos mecanismos de tolerância a metais pesados descritos na literatura, buscou-se identificar aqueles envolvidos com a tolerância ao arsênio apresentado pela cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01.

Referências Bibliográficas

- ANAGNOSTIDIS, K. *Geitlerinema*, a new genus of oscillatoriacean cyanophytes. **Plant Systematics Evolution** **164**: 33-46, 1989.
- BARRA, C. M., SANTELLI, R. E., ABRÃO, J., GUARDIÃ, M., Especiação de arsênio – uma Revisão. **Química Nova** **23(1)**:58-70, 2000.
- BECEIRO-GONZÁLEZ, E., CALZADA, A.T., RODRÍGUEZ, E. A., LOPEZ-MAHÍA, P., MUMATEGUI-LORENZO, S., PRADA-RODRIGUES, P. Interaction between metallic species and biological substrates: approximation to possible interaction mechanisms between the alga *Chlorella vulgaris* and arsenic (III). **Trends in analytical chemistry** **19(8)**:475-480, 2000.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. & MOURA, A.N. Influence of abiotic variables and polluting source in the structure of the phytoplankton community in Tibagi river, Paraná state, south Brazil. **Algology Study** **101**: 73-93, 2001.
- CALZADA, A. T., Lojo, M. C. V., BECEIRO-GONZÁLEZ, E., RODRIGUES, E. A., RODRIGUES, D. P. Determination for arsenic species in environmental samples: use alga *Chlorella vulgaris* for arsenic (III) retention. **Trends in analytical chemistry** **17(3)**:167-175, 1999.
- CERVANTES, C., JI, G., RAMÍREZ, J. L., SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews** **15**:355-367, 1994.
- DEMBITSKY, V. M. & REZANKA, T. Natural occurrence of arsenic compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science** **165**:1177-1192, 2003.
- GUPTA, A., MORBY, A.P., TURNER, J.S., WHITTON, B.A., ROBINSON, N.J. Deletion within the metallothionein locus of Cd-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly interated palindrome (HIP1). **Molecular Microbiology** **7**: 159-167, 1993.
- KAISE, T. FUJIWARA, S., TSUZUKI, M., SAKURAI, R., SAITOH, T. and MASTUBARA, C. Accumulation of arsenic in a unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied Organometallic Chemistry** **13**:107-111, 1999.
- LEE, R.E. **Phycology**. 2^a ed. Cambridge University Press. New York, 645 p.,1999.
- LIU, T., NAKASHIMA, S. HIROSE, K. UEMURA, Y., SHIBASAKA, M., KATSUHARA, M. and KASAMO, K. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters** (**542**): 159-163, 2003.

- MATSCHULLAT, J., BORBA, R. P., DESCHAMPS, E., FIGUEIREDO, B. R., GABRIO, T. SCHEWENK, M. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry** **15**:193-202, 2000.
- MATSUTO, S., KASUGA, H., OKUMOTO, H., TAKAHASHI, A. Accumulation of arsenic in blue-green alga, *Phormidium* sp. **Comp. Biochemical Physiology** **78C(2)**:377-382, 1984.
- PIRSZEL, J. PAWLIK, B., SKOWRONSKI, T. Cation-exchange capacity of algae and cyanobacteria: a parameter of their metal sorption abilities. **Journal of Industrial Microbiology** **14**:319-322, 1995.
- SANTANHA-FILHO, S. **Impactos do Processo de Drenagem Ácida sobre Recursos Hídricos no Estado de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 173p, 2000.
- SILVER, S., WALDERHAUG, M. Bacterial plasmid-mediated resistances to mercury, cadmium and copper. In: Goyer, R.A., Cherian. M.G. (eds). **Toxicology of Metals. Biochemical Aspects**. Springer –Verlag, Berlin, p. 435-458, 1995.
- SUHENDRAYATNA, OHKI, A., KUROIWA, T. and MAEDA, S. Arsenic compounds in the freshwater green microalga *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite. **Applied Organometallic Chemistry** **13**:127-133, 1999.
- YABARRA, G. R. and WEBB, R. Differential responses of groel and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Conference on Hazardous Waste Research**. 76-86, 1998.

CAPÍTULO 1

ABSORÇÃO E TOXICIDADE DO ARSÊNIO EM *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02

1. Introdução

A contaminação de ambientes aquáticos por arsênio (As) tem se tornado motivo de preocupação das autoridades de saúde pública, devido aos seus efeitos tóxicos para os organismos vivos, principalmente, para o homem. A contaminação da população por As ocorre, principalmente, pela ingestão de água contaminada (BARRA *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000).

A toxicidade do arsênio depende de seu estado de oxidação, sendo as formas inorgânicas trivalentes, As (III), denominado arsenito, cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas, pentavalentes As (V), denominado arseniato (CERVANTES *et al.*, 1994). Formas orgânicas ou metiladas como, monometilarsênico (MMA) e dimetilarsênico (DMA) não são consideradas tóxicas (DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

As causas da contaminação de ambientes terrestres e aquáticos pelo As são devidas às anomalias geológicas e atividades antropogênicas. Entre esta última, se destaca a atividade de mineração, que através do processo de drenagem ácida, disponibiliza o arsênio e outros metais tóxicos no ambiente (SANTANA-FILHO, 2000; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

As espécies de cianobactérias e algas que possuem capacidade de absorção de arsênio e, os processos metabólicos existentes, como os mecanismos de oxidação/redução, permitem aos pesquisadores utilizarem as cianobactérias e as algas eucarióticas como organismos biorremediadores na descontaminação de ambientes poluídos por este elemento (BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

A acumulação de metais pesados, pelas células algais, é feita por biosorção (absorção e adsorção), utilizando-se processos biológicos, químicos e físicos, podendo ocorrer em células vivas ou mortas (GENTER, 1996; CALZADA *et al.* 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Estes mecanismos antecedem as respostas morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas das algas ao estresse (PIRSZEL *et al.*, 1995; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

Pesquisas realizadas com cianobactérias e algas relatam a existência de espécies acumuladoras de arsênio (PLANAS & HEALEY, 1978; MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994, KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999; DEMBITSKY & REZANKA, 2003). Além disso, estas mesmas pesquisas descrevem

mecanismos de biotransformação das formas inorgânicas em formas metiladas, consideradas não tóxicas (PLANAS & HEALEY, 1978; CERVANTES *et al.*, 1994; KAISE *et al.*, 1999).

A absorção de arsênio pelas células algais e seus efeitos fisiológicos e morfológicos, dependem da espécie, da fase de crescimento das células, das condições fisiológicas, da forma química do arsênio e de sua concentração no meio (PLANAS E HEALEY, 1978; KNAUER *et al.*, 1999). Além disso, a concentração de nutrientes no meio de cultura, também influencia a absorção das formas de arsênio. Os maiores valores de absorção foram observados em soluções, em condições nutricionais deficientes, principalmente de fosfato (CALZADA *et al.*, 1999; KAISE *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Isto ocorre, devido à similaridade química entre o arseniato (AsO_4^-) e o fosfato (PO_4^-). O arseniato é absorvido pelas células de algas através do mesmo sítio de absorção do fosfato, podendo também, substituir o fosfato em rotas metabólicas (THIEL, 1988; CALZADA *et al.*, 1999).

Estudos de toxicidade têm sido realizados para avaliar os efeitos dos íons metálicos e metalóides sobre as células procarióticas e eucarióticas, com a finalidade de utilizar os organismos em estudos de remediação de ambientes aquáticos impactados. Tais elementos são avaliados com a finalidade de conhecer, especificamente, em que nível de organização (celular ou bioquímico) as cianobactérias e as algas eucarióticas são afetadas e, se influenciam a taxa de crescimento, o desenvolvimento e a diversidade de populações dos organismos, o que irá refletir, diretamente sobre a comunidade fitoplanctônica (GENTER, 1996).

PIRSZEL *et al.* (1995) observaram que variações estruturais e químicas: organização celular, composição química da parede celular, os diferentes grupos funcionais (carboxílicos, fosfatos, hidroxílicos e aminos) e morfologia do talo podem causar diferenças na capacidade de biosorção entre as cianobactérias e as algas eucarióticas.

Além de escassas informações sobre a toxicidade do arsênio e seus efeitos deletérios sobre as espécies de algas planctônicas, tanto na literatura internacional, como no Brasil, não há relatos sobre estudos com espécies de algas tropicais tolerantes e/ou acumuladoras de arsênio. Este fato torna os estudos sobre absorção, toxicidade e especiação de arsênio, por estes microrganismos, de grande relevância devido à presença de inúmeras áreas de mineração de ouro no estado de Minas Gerais, as quais são potenciais contaminantes de solos, águas superficiais, sedimentos e aquíferos.

São insuficientes os dados que descrevem os mecanismos de resistência, as alterações morfológicas, estruturais e fisiológicas do efeito do arsênio em cianobactérias e algas eucarióticas. Portanto, o presente estudo teve como principais objetivos:

- Determinar a absorção de arsênio em *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, isolados a partir de um ambiente dulcícola;
- Avaliar as alterações morfológicas nas células de *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 submetidas ao arsênio;
- Avaliar a toxicidade do arsênio, em *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, utilizando como parâmetro a produção de biomassa determinada pelo conteúdo de clorofila *a*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Caracterização de cianobactérias e algas eucarióticas

Cianobactérias e algas são microrganismos encontrados em diversos tipos de ambientes, tais como ambientes aquáticos, fontes termais, o solo, a neve, sobre rochas expostas, em associações com fungos formando os líquens ou como epífitas. Mas são nos ecossistemas aquáticos que estes organismos expressam a sua máxima importância ecológica, como produtores primários na cadeia trófica, produzindo material orgânico a partir da luz solar, dióxido de carbono e água, liberando O₂ necessário para organismos consumidores (LEE, 1999).

A capacidade de crescer nos mais diferentes ambientes é uma das características marcantes das cianobactérias e das algas. A presença destes organismos em ambientes tão diversos e distintos se deve a várias estratégias metabólicas que utilizam e, que podem explicar o sucesso dos mesmos em lidar com as pressões seletivas dos ambientes. Além de realizarem fotossíntese e, algumas espécies fixarem nitrogênio atmosférico, as cianobactérias toleram altas temperaturas, altas irradiações de UV, dessecação, presença de sulfetos, além de serem capazes de sobreviver em diferentes intensidades luminosas (LEE, 1999), sendo inclusive capazes de colonizar ambientes poluídos por metais (MATSUTO *et al.*, 1984; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

Os poluentes inorgânicos, como metais e metalóides, são amplamente difundidos nos ecossistemas aquáticos. As diversas fontes poluidoras (processos geoquímicos ou origens antropogênicas) presentes no ecossistema aquático provocam alterações na qualidade da água, refletindo na estrutura da comunidade fitoplanctônica (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2001).

Algumas espécies de cianobactérias e algas eucarióticas possuem a capacidade de tolerar e acumular poluentes (orgânicos e inorgânicos) do meio (BOTTINO *et al.*, 1978; WILDE & BENMANN, 1993; GENTER, 1996; KAISE *et al.*, 1999). Alguns poluentes como, Cu, Cd, Al, As e Zn tem alta afinidade pelos sítios de ligação localizados na parede celular desses microrganismos. Microalgas podem seqüestrar íons metálicos por mecanismos de adsorção e absorção, ou pela formação de fitoquelatinas, as quais são sintetizadas em respostas ao estresse pelos metais tóxicos. A tecnologia que utiliza os processos relacionados com estes microrganismos para descontaminar ambientes aquáticos é denominado biorremoval ou biorremediação (WILDE & BENMANN, 1993; PAWLIK-SKOWRONSKA, 2003).

A utilização da tecnologia de biorremediação pelas células de cianobactérias e algas eucarióticas é vantajosa, devido ao fato de que estes organismos necessitam de condições mínimas (luz, dióxido de carbono e água) para a manutenção de seu metabolismo. Por outro lado, as culturas podem ser produzidas em larga escala fornecendo um constante suprimento de biomassa e acumulando grandes quantidades de elementos tóxicos (WILDE & BENMANN, 1993; CERVANTES *et al.*, 1994; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

Algumas espécies de cianobactérias e algas que apresentam a capacidade de transformar formas inorgânicas de arsênio em formas metiladas, ou formas não tóxicas, utilizando mecanismos de oxidação/redução, são: *Chlamydomonas reihardtii*, *Polyphusa peniculus*, *Chlorella vulgaris* e *Phormidium* sp. (MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994; CALZADA *et al.*, 1999; KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

De acordo com a classificação proposta por WEHR & SHEATH (2003), *Geitlerinema* UFV-E01 pertence ao Phylum Cyanobacteria, ordem Oscillatoriales e família Pseudanabaenaceae. *Stigeoclonium* UFV-E02 pertence ao Phylum Chlorophyta, ordem Chaetophorales e família Chaetophoraceae (LEE, 1999).

2.2 A problemática do arsênio

O Arsênio (As) é um elemento químico ubíquo e abundante, mesmo em baixas concentrações. É encontrado, naturalmente, em alguns minerais como, pirita (FeS_2), arsenopirita (FeAsS), sais de cobre, níquel e outros minerais sulfetados (CERVANTES *et al.*, 1994; SANTANA-FILHO, 2000). As concentrações de As no solo variam entre 0,1 até mais de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e em partículas atmosféricas variam entre 50 e 400 $\mu\text{g}/\text{mg}$. A água do mar pode apresentar níveis acima de 2,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a água doce cerca de 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (CERVANTES *et al.*, 1994).

A toxicidade do arsênio é conhecida há muitos séculos. Compostos contendo arsênio foram, no passado, utilizados para reduzir a febre, usados no tratamento da “Peste Negra” e até mesmo para furúnculos (DEMBITSKY & REZANKA, 2003). Compostos contendo arsênio foram usados, principalmente na agricultura como pesticidas, em pequenas quantidades em produtos de vidro e cerâmica e, ainda, tem sido relatada a sua utilização como aditivos alimentícios e nos processos farmacêuticos (CERVANTES *et al.*, 1994; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

O elemento arsênio (As) pode entrar nos ambientes terrestres e aquáticos através de anomalias geológicas e atividades antropogênicas (DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

Como origens da contaminação de ambientes por As pode-se citar: queima de carvão e combustíveis fósseis em geral, indústrias de fundição de metais, semicondutores e atividade de mineração (CERVANTES *et al.*, 1994).

A atividade de mineração traz o minério contendo o arsênio à superfície, o qual sofre o processo de drenagem ácida tornando-se disponível e, conseqüentemente, contaminando o meio ambiente, principalmente, os corpos d'água (MATSCHULLAT *et al.*, 2000; SANTANA-FILHO, 2000). O processo de drenagem ácida ocorre quando minerais sulfetados, pirita (FeS_2) e arsenopirita (FeAsS), em contato com a água, oxigênio atmosférico e bactérias *Thiobacillus ferroxidans*, sofrem reações químicas e eletroquímicas, reduzindo o pH e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade de metais tóxicos, entre os quais o arsênio. Um dos maiores problemas ambientais causados pela drenagem ácida é a dissolução de metais tóxicos e a lixiviação destes para os aquíferos, podendo resultar na total inutilização da água para o consumo humano (SANTANA-FILHO, 2000). A contaminação da Bacia do São Francisco, no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, está relacionada à intensa atividade de mineração de ouro, no século passado, e aos garimpos atuais (MATSCHULLAT *et al.*, 2000). Esses rejeitos apresentam níveis elevados de minerais contendo arsênio, que são lixiviados para os aquíferos, podendo resultar na total inutilização da água para o consumo humano (SANTANA-FILHO, 2000).

A toxicidade do arsênio depende de seu estado de oxidação, sendo as formas trivalentes, As (III) denominados arsenito, cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas pentavalentes As (V), denominado arseniato (CERVANTES *et al.*, 1994).

As formas de arsênio, As (III) e As (V), são interconvertidos por atividades biológicas ou metilados pela ação de bactérias, fungos e algas (CERVANTES *et al.*, 1994). Ou podem ser acumuladas em concentrações bem acima do nível do ambiente (BOTTINO *et al.*, 1978; CERVANTES *et al.*, 1994). Em ambientes aquáticos, podemos encontrar As (III) e As (V), existindo também formas metiladas resultantes da atividade biológica, sendo estas formas não tóxicas (CERVANTES *et al.*, 1994; KNAUER *et al.*, 1999; BARRA *et al.*, 2000; DEMBITSKY & REZANKA, 2003).

Atualmente, o arsênio tem recebido especial atenção das autoridades governamentais e de saúde pública, devido aos seus efeitos tóxicos, em baixas concentrações e exposição prolongada, para os organismos vivos, principalmente, o homem. A contaminação da população por arsênio ocorre, principalmente, pela ingestão de água contaminada (BARRA *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000). Embora haja relatos de contaminação por inalação, mas esta, geralmente, ocorre em concentrações muito baixas (menores que $1 \mu\text{g}/\text{dia}$)

(LÉONARD & LAUWERYS, 1980). A exposição prolongada ao arsênio induz a ocorrência, no homem, de conjuntivite, hiperkeratose, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele, pulmão, bexiga e rins (CERVANTES *et al.*, 1994; BARRA *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000). Pesquisas comprovam os danos causados ao DNA devido à exposição a diferentes formas químicas de arsênio, resultando em ação mutagênica (CERVANTES *et al.*, 1994).

A concentração máxima permitida para a água de consumo é $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Na legislação brasileira, a Resolução do CONAMA nº 20, 18/06/1986 estabelece $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, para águas de lançamentos e o Ministério da Saúde estabelece na Portaria 518 (2004) o limite máximo permitido para água potável é de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

A toxicidade do As (III) (orgânico e inorgânico) é devido a sua ligação a grupos sulfídricos, inibindo enzimas ativadas pelo sistema tioferredoxina (TioI), como por exemplo: PEP carboxilase, desidrogenase do piruvato, desidrogenase do malato, activase da Rubisco, fosfatase da frutose 1,6-bifosfato, fosfatase da sedoheptulose 1,7-bifosfato e desidrogenase do 3-GAP (LÉONARD & LAUWERYS, 1980; CERVANTES *et al.*, 1994). Além disso, o arsenito é um inibidor do ciclo de Krebs e substitui o fosfato durante a síntese de DNA. O arseniato possui baixa afinidade com grupos hidroxílicos e tióis, portanto, tem baixo poder de inibição das enzimas ativadas pelo sistema tioferredoxina. Mas por outro lado, inibe a oxidase do citocromo. Por ser um análogo do fosfato e competir com este pelo mesmo sítio de absorção, o arseniato afeta atividades de fosforilação (CERVANTES *et al.*, 1994), principalmente a síntese de ATP, devido à inativação da fosforilação oxidativa (LÉONARD & LAUWERYS, 1980).

2.3 A absorção de metais por organismos planctônicos

A absorção de metais por microrganismos vem sendo constantemente, alvo de intensas investigações (CERVANTES *et al.*, 1994; CALZADA *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). As cianobactérias e as algas eucarióticas podem absorver metais pesados em solução e atuar, com um importante papel, como biosorventes (adsorvendo e absorvendo metais) influenciando a concentração e a especiação dos mesmos (CERVANTES *et al.*, 1994; PIRSZEL *et al.*, 1995). Alguns íons metálicos (Hg, Pb, Cd, As, Au) não desempenham funções biológicas e têm efeitos tóxicos (CERVANTES *et al.*, 1994), outros funcionam como nutrientes essenciais a baixas concentrações (Mg, K, Cu, Mo, Fe e Zn), sendo tóxicos apenas quando presentes em altas concentrações (CERVANTES *et al.*, 1994; GENTER, 1996).

A acumulação de metais pesados é feita por biosorção, utilizando processos biológicos, químicos e físicos, podendo ocorrer em células vivas ou mortas (GENTER, 1996; CALZADA *et al.* 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Os principais mecanismos envolvidos na biosorção são adsorção e absorção (GENTER, 1996). Estes mecanismos antecedem as respostas das algas ao estresse (PIRSZEL *et al.*, 1995; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

O mecanismo de adsorção é a primeira fase. É frequentemente rápida, reversível e, geralmente, tem duração de 5-10 minutos nas avaliações feitas em algas (GENTER, 1996; CALZADA *et al.*, 1999). Não é dependente do metabolismo, ou seja, não é influenciada pela luz, temperatura ou pela presença de inibidores metabólicos. Nesta fase, os íons metálicos ligam-se a grupos funcionais na parede celular (carboxílico, amino, tiol, hidroxílico e hidroxil-carboxílico) ou na membrana celular, ou até nos produtos excretados, como mucilagens (GENTER, 1996; CALZADA *et al.*, 1999; XUE *et al.*, 1988; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Essa interação entre metais e cianobactérias/algas é observada em células vivas, ou seja, com atividade biológica e, também, em células mortas, sendo os íons acumulados na superfície celular, sendo facilmente removidos por água destilada ou por um agente quelante, como o EDTA (GENTER, 1996; CALZADA *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

A segunda fase do mecanismo de absorção é lento, dependente do metabolismo e, pode durar horas ou dias. A absorção pode ser inibida por baixas temperaturas, ausência de luz, inibidores metabólicos e desacopladores da cadeia transportadora de elétrons (GENTER, 1996). É influenciado pelo estágio fisiológico das células e pelo meio de cultura. Nesta fase, os íons inorgânicos atravessam a membrana celular (GENTER, 1996; CALZADA *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

Pesquisas realizadas com cianobactérias e algas eucarióticas relatam à existência de espécies acumuladoras de arsênio (PLANAS & HEALEY, 1978; MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994, KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999; DEMBITSKY & REZANKA, 2003). Além disso, estas mesmas pesquisas descrevem os mecanismos de biotransformação de formas inorgânicas, como o As (III) ou As (V), em formas metiladas, como o monometilarsênico (MMA), dimetilarsênico (DMA) (PLANAS & HEALEY, 1978; KAISE *et al.*, 1999), trimetilarsênico (TMA), arsenocolina (AsC) e arsenobetanaína (AsB). De acordo com CERVANTES *et al.* (1994), ainda podem ocorrer outras formas orgânicas, como dimetilarsenoaçúcar (composto hidrossolúvel) e arsenolípídeo.

O transporte de arsênio pelas células é semelhante ao do fosfato, contudo, As (III) pode mover através da bicamada da membrana, passivamente, na sua forma não ionizada ou, ser transportado por uma proteína carreadora semelhante aos compostos orgânicos não ionizados (CERVANTES *et al.*, 1994).

2.3.1 Efeito do arsênio em cianobactérias e algas

Cianobactérias e algas eucarióticas tiveram o seu crescimento reduzido quando foram expostas a concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de arsênio e, continuaram reduzindo a taxa de crescimento com o aumento da concentração de arseniato (PLANAS & HEALEY, 1978). Entretanto, em *Chlamydomonas reinhardtii* a redução observada no crescimento ocorreu a partir de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ de arseniato, enquanto que em *Anabaena variabilis* e *Cryptomonas erosa* o crescimento não foi afetado, mesmo quando a concentração de arseniato foi de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém, a taxa de absorção de fosfato foi afetada nesta concentração de arseniato (PLANAS & HEALEY, 1978).

Phormidium sp., uma cianobactéria filamentosa, quando exposto a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de As (V), durante 65 dias, apresentou uma rápida absorção nos primeiros 15 dias, e logo após, houve um aumento significativo na concentração de As no meio. Isto sugere que houve uma absorção, seguida de excreção. Após 70 dias de experimento, *Phormidium* sp. havia acumulado $19.000 \mu\text{g.mg}^{-1}$ em sua biomassa (MATSUTO *et al.*, 1984).

THIEL (1988) observou que células de *Anabaena variabilis*, cianobactéria filamentosa, cultivadas em meio de cultura em condições nutricionais normais, principalmente de fosfato, foram resistentes aos efeitos tóxicos de arseniato, porém foram sensíveis ao arseniato quando em meio deficiente de fosfato.

Os efeitos fisiológicos e morfológicos, causados pelo arsênio, nas algas dependem da espécie, da fase de crescimento das células, das condições fisiológicas, da forma química do arsênio apresentada no ambiente e de sua concentração no meio (PLANAS E HEALEY, 1978; KNAUER *et al.*, 1999).

De acordo com PIRSZEL *et al.* (1995), o pH influencia a capacidade de troca iônica. Diminuindo o pH, a capacidade de troca iônica diminui, significativamente, sendo este fato mais evidenciado em células de cianobactérias e algas eucarióticas unicelulares. Segundo CALZADA *et al.* (1999), a absorção de As (III) pela alga *Chlorella vulgaris*, uma clorófito unicelular, foi influenciada pelo pH do meio, removendo cerca de 40% do arsenito em solução, na concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$.

De acordo com MAEDA *et al.* (1992) a maior taxa de absorção de arsênio ocorreu durante a fase Log (ou de crescimento exponencial) e, diminuiu quando as células entraram na fase estacionária, onde a excreção de formas de arsênio (inorgânicas e orgânicas) é maior que a absorção do elemento. Outro fator que influencia a absorção de formas de arsênio é o estágio fisiológico das células. Quando são utilizadas células vivas de *Chlorella vulgaris*, a absorção aumenta proporcionalmente ao tempo de exposição, devido ao favorecimento do mecanismo de absorção, o qual é lento (BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Entretanto, a saturação na absorção em células vivas de *C. vulgaris* ocorre após 15 minutos de exposição a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de As (III) (CALZADA *et al.*, 1999) e, em 36 horas de exposição a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de As (III), mantendo a absorção constante até 48 horas de exposição (SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999). KAISE *et al.* (1999) relataram que *Chamydomonas reinhardtii* apresentou absorção máxima, em aproximadamente 6 horas de exposição mantendo-a constante até 48 horas depois.

SUHENDRAYATNA *et al.* (1999) mostraram que a absorção de arsênio total nas células de *C. vulgaris*, expostas ao As por 225 horas, foi muito menor do que em células expostas por 36 horas, provavelmente, devido à excreção do As absorvido pelas células.

Quando células mortas (desidratadas ou liofilizadas) são utilizadas, a adsorção de As (III) aumenta com o aumento da biomassa, ou seja, quanto mais células de algas mais sítios de ligações disponíveis (BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Segundo CALZADA *et al.* (1999) a saturação da adsorção de As (III), em células mortas de *C. vulgaris*, aconteceu após 16 horas de exposição.

A concentração de nutrientes no meio, também influenciou a absorção de diferentes formas de arsênio. Os maiores valores de absorção foram encontrados em soluções com condições nutricionais deficientes, principalmente de fosfato (CALZADA *et al.*, 1999; KAISE *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Isto ocorreu, devido à similaridade química entre o arseniato (AsO_4^-) e o fosfato (PO_4^-). O arseniato foi absorvido pelas células de *C. vulgaris* através do mesmo sítio de absorção do fosfato, podendo também, ter substituído o fosfato em rotas metabólicas (THIEL, 1988; CALZADA *et al.*, 1999).

O fosfato inorgânico (Pi) é a principal forma de fosfato absorvida pelos organismos fitoplanctônicos, incluindo as cianobactérias. Provavelmente, o Pi é o principal nutriente que limita o crescimento do fitoplâncton de águas continentais (THIEL, 1988).

Os sintomas de deficiência de P, em cianobactérias e algas eucarióticas, são citados como: alteração na fotossíntese, baixa produção de ATP e diminuição da taxa de crescimento, havendo bloqueio na fosforilação oxidativa (THIEL, 1988), redução da respiração e da

fixação de carbono (PLANAS E HEALEY, 1978), inibição do metabolismo da glicose e das reações de esterificação (SANDERS, 1979). Vários autores observaram uma rápida formação de corpúsculos de polifosfato em células de cianobactérias, após estas terem sido cultivadas em meio com deficiência de P (PLANAS E HEALEY, 1978; JACOBSON & HALMANN, 1982; THIEL, 1988). Os corpos de polifosfato funcionam como local de armazenamento de fósforo, mas também, como mecanismo de detoxificação (RANGSAYATORN *et al.*, 2002).

SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999, observaram que células de *Chlorella vulgaris* apresentaram taxa de crescimento de 10 a 50% maior quando as células foram expostas as concentrações de 10 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do que quando cultivadas em meio livre de arsênio. Entretanto, concentrações acima de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de arsênio foram tóxicas e o crescimento celular foi suprimido. Foi também observado uma citólise em algumas células quando as concentrações foram iguais a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Visto que o As (V) compete com o fosfato, a concentração externa de fosfato pode ser importante na determinação da toxicidade de As (V) enquanto que a inibição do crescimento pode ser maior em meios onde a concentração de fosfato é baixa.

O arseniato inibiu a fixação de carbono, em algas eucarióticas e cianobactérias, e conseqüentemente inibiu a fotossíntese, em células expostas às concentrações de 67 ng.L^{-1} , em condições nutricionais de deficiência de fosfato, durante as fases log e estacionária de crescimento. Com a adição de fosfato ao meio houve redução nesta inibição da fixação de carbono (PLANAS E HEALEY, 1978; SANDERS; 1979). Durante fase estacionária, as células foram menos afetadas devido à baixa atividade metabólica e, provavelmente, devido à diminuição da absorção de arseniato (PLANAS & HEALEY, 1978).

Quando em altas concentrações de arseniato, a absorção de fosfato segundo PLANAS & HEALEY (1978) foi mais sensível que a taxa de crescimento, em *Anabaena variabilis* e *Cryptomonas erosa*. Observou-se um esgotamento do fosfato, tanto em solução como nas reservas celulares, sem que houvesse sido observada uma redução na taxa de crescimento.

Cianobactérias, como *Anabaena variabilis*, podem ser resistentes aos efeitos tóxicos do arseniato. THIEL (1988) relatou que as células apresentaram sensibilidade somente quando foram cultivadas na ausência de fosfato e na presença de altas concentrações de arseniato. A capacidade do fosfato em proteger as células, tanto de cianobactérias como de algas eucarióticas dos efeitos tóxicos do arseniato pode ser atribuída à competição entre fosfato e arseniato pelas rotas metabólicas, nas quais, preferencialmente as células utilizam o fosfato (THIEL, 1988).

Foram caracterizados a presença, em bactérias, de dois mecanismos de transporte de fosfato: o sistema *Pst* (transporte específico de fosfato) que apresenta alta afinidade pelo fosfato e baixa velocidade de absorção, podendo ser induzido pela deficiência de fosfato em solução; e o sistema *Pit* (transporte de Pi), que apresenta baixa afinidade e alta velocidade de absorção (WILLSKY & MALAMY, 1980; POOLE & HANCOCK, 1984). As células de bactérias, que possuem o sistema *Pit* são sensíveis ao arseniato, enquanto que as células de bactérias que possuem o sistema *Pst* são resistentes e crescem em meio onde a relação arseniato/fosfato é alta (WILLSKY & MALAMY, 1980; CERVANTES *et al.*, 1994). As cianobactérias são organismos procariotos, possuem características semelhantes às bactérias. É provável que, um dos mecanismos de resistência seja a presença dos sistemas de transporte diferenciados entre fosfato e arsênio (THIEL, 1988).

THIEL (1988) relata duas linhagens de *Synechococcus* sp. que são altamente resistentes ao arsênio. O mecanismo de resistência pode estar relacionado com o transporte de fosfato, sendo que o arsênio não inibe o transporte de fosfato, ocorrendo, portanto, um sistema de transporte específico de fosfato (*Pst*).

Segundo MATSUTO *et al.* (1984), nas células de *Phormidium* sp., não foram observadas alterações morfológicas após terem sido submetidas a 65 dias de exposição ao arseniato, em virtude do processo de absorção e excreção serem rápidos. LIU *et al.*, 2003 descreveram mecanismos de exclusão de íons metálicos específicos através de proteínas transportadoras na membrana (ABC transportadores, CPx-ATPase e outros).

O arseniato reduziu o crescimento de *Tetraselmis chuii* em concentrações acima de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BOTTINO *et al.*, 1978). Alterações morfológicas observadas em *T. chui* quando exposto a concentrações acima de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando cultivado em meio de cultura MSW, foram: aumento da deposição de substância mucilagínosa de composição desconhecida sobre as teças; e quando cultivadas em meio de cultura ASW, foram: perda do flagelo e fixação das células na parede do frasco, não havendo produção de mucilagem. O arsênio não afetou a divisão celular *T. chui*.

Arseniato aumentou a taxa de crescimento de *Hymenomonas carterae*, em concentrações menores do que 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BOTTINO *et al.*, 1978). Após 3 dias de exposição a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de As (V) foram observados perda do flagelo e da motilidade e de fixação das células nas paredes do frasco, entretanto as células continuaram a se dividir (BOTTINO *et al.*, 1978).

T. chui e *H. carterae* quando foram expostos a 1 mg.mL^{-1} de arsênio com e sem período de adaptação gradativa, conseguiram sobreviver e reproduzir, em uma velocidade

menor quando estas células foram comparadas com as células mantidas em meio de cultura livre de arsênio. Houve perda do flagelo e alteração do movimento da espécie tanto para *T. chui* quanto para *H. carterei*. Em *H. carterae*, foi observado que a taxa de crescimento e a morfologia foram restaurados quando estas células foram transferidas para um meio de cultura livre de arsênio (BOTTINO *et al.*, 1978).

Em *Ochromonas vallesiaca* foi observado diminuição no tamanho das células quando estas foram expostas a concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de arseniato (PLANAS E HEALEY, 1978).

O principal efeito do arseniato é a indução de características de deficiência relacionadas ao fósforo, devido à interferência da absorção de fosfato, sendo esta mais afetada pelo arseniato nos processo de fixação de carbono e da respiração. O efeito observado foi maximizado durante o crescimento (PLANAS E HEALEY, 1978).

3. Material e Métodos

3.1 Local e Métodos de Coleta

As coletas foram realizadas em três lagoas artificiais da Equiideocultura, pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa - UFV. As lagoas recebem efluentes provenientes do manejo do viveiro de café, do Departamento de Fitopatologia, além de esgoto doméstico e dejetos oriundos da criação de equídeos. A lagoa 1 está localizada a 661 m de altitude, tendo como coordenadas 20°44'58,7''S - 42°51'13,1''W. É a maior lagoa e recebe os dejetos do manejo oriundos do viveiro de café e de esgoto doméstico, provenientes da casa do zelador. Apresenta uma vegetação constituída, principalmente, de *Salvinia* sp. e também representantes de *Elodea* sp., *Nymphae* sp., *Chara* sp. e *Nitella* sp. A lagoa 2 localiza-se a 676 m de altitude, tendo como coordenadas 20°44'59,6'' S - 42°51'19,3''W. Recebe os dejetos e efluentes provenientes da criação de equídeos e sua vegetação é constituída de *Pistia* sp. e *Eichornia* sp. A lagoa 3 localiza-se a 665 m de altitude, tendo como coordenadas 20°44'45,8''S - 42°50'59,9''W. É a menor lagoa, aparentemente limpa, localizada próximo a nascente. Não recebe efluentes do viveiro, da criação de animais ou de esgoto doméstico. Sua vegetação é constituída de *Thypha* sp.

As coletas para a obtenção dos organismos fitoplanctônicos foram realizadas entre 8:00 e 11:00 da manhã, em fevereiro e março de 2003, utilizando-se uma rede de fitoplâncton (abertura de malha = 20 µm), por meio de arraste horizontal. Foram medidos os seguintes parâmetros: concentração de oxigênio dissolvido (%), pH e transparência da água (disco de Secchi).

As amostras de água foram acondicionadas em frascos de vidro, com capacidade para 500 mL, hermeticamente fechados e devidamente identificados. Foram transportadas para o laboratório de Ficologia na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), do Departamento de Biologia Vegetal, UFV.

3.2 Isolamento

O enriquecimento das amostras foi realizado, imediatamente após as coletas, a fim de estimular a germinação de formas de resistência como acinetos, hormogônios e esporos. Para o enriquecimento foi utilizado o meio de cultura BG-11 líquido, suplementado ou não com fontes de nitrogênio (N) (ALLEN & STANIER, 1968, modificado por PONTES, 1988) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição e concentração das soluções estoques do meio BG-11 líquido (ALLEN & STANIER, 1968, modificado por PONTES, 1988)

COMPONENTES	gL ⁻¹	SOLUÇÃO ESTOQUE PARA 1 L
1 – Na₂Mg EDTA	0,1	10 mL
Citrato férrico de amônia	0,6	
Ácido cítrico . H ₂ O	0,6	
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	3,6	
2 - MgSO₄ . 7 H₂O	7,5	10 mL
3 – K₂HPO₄ . 3 H₂O	4,0	10 mL
4 – Na₂CO₃	-	0,02 g
5 – Solução de micronutrientes		1 mL
H ₃ BO ₃	2,86	
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,81	
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,222	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,079	
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,050	
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O ou MoO ₃ (85%)	0,018	
6 – NaNO₃ (somente para BG-11 suplementado com N)	-	1,5 g

Os componentes foram adicionados na ordem listada. O volume foi completado com água destilada. O pH ajustado para 7,3 com HCl 1N. O meio de cultura foi autoclavado a temperatura de 121° C.

Para as amostras coletadas nas lagoas eutrofizadas (lagoas 1 e 2), o enriquecimento foi feito na proporção de 10:1 (10 mL de BG-11 líquido : 1 mL da amostra), enquanto que para as amostras das lagoas oligotróficas (lagoa 3), a proporção foi de 10:2 (10 mL de BG-11 líquido : 2 mL da amostra) (AGUIAR, 1992). As amostras enriquecidas foram mantidas em placas de Petri contendo meio BG-11 líquido, em câmara de crescimento modelo 3740 (Form Scientific), sob condições fotoautotróficas de crescimento, ou seja, a temperatura de 25 ± 2° C, fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro e irradiância média de 115 μmols fótons m⁻²s⁻¹, provenientes de lâmpadas fluorescentes.

O isolamento de espécies fitoplanctônicas foi realizado utilizando-se o método de micropipetagem e plaqueamento, proposto por KUGRENS *et al.* (2000). Os organismos que apresentaram crescimentos diferenciados foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BG-11 líquido e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sob microscópio

estereoscópico (modelo 106954, Wild), foram feitas tentativas para retirar uma “unidade algal”, representada por uma célula, uma colônia ou um filamento. Esse procedimento foi adotado com a finalidade de se obter culturas unialgais. Foram feitas várias repicagens sucessivas até a obtenção de isolados.

Para agilizar a obtenção dos isolados, foi utilizado, posteriormente, o método de plaqueamento em meio BG-11 sólido (STEIN, 1973). “Unidades algais” foram transferidas para as placas de Petri contendo meio BG-11 solidificado com ágar 1,5% (Merck). Com o auxílio de uma alça de platina, devidamente flambada, os inóculos foram estriados na superfície do meio. As placas foram vedadas com “parafilm” e dispostas com a tampa voltada para baixo, a fim de reduzir a possibilidade de contaminação. O acondicionamento das placas foi feito nas mesmas condições fotoautotróficas, anteriormente descritas.

Durante o isolamento foi necessário utilizar o antibiótico Ciclohexamida, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para auxiliar a eliminação de contaminantes eucarióticos nas culturas de cianobactérias. Utilizou-se também o antibiótico Timetin, na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para eliminar os contaminantes procariotos das culturas de algas eucarióticas.

A identificação taxonômica dos organismos foi feita consultando-se a literatura especializada (DESIKACHARY, 1959; BOURRELLY, 1968; BOURRELLY, 1972. KOMAREK & ANAGNOSTIDIS, 1986; KOMAREK & ANAGNOSTIDIS, 1998; LEE, 1999). E com confirmação pelas pesquisadoras do Instituto de Botânica de São Paulo.

3.3 Seleção de espécies e Manutenção das culturas

A seleção das espécies, para os experimentos posteriores, foi realizada baseada na observação visual de crescimento e na produção de biomassa. Produção de biomassa, em menor intervalo de tempo, foi o principal quesito utilizado na seleção, sendo determinada através do conteúdo de clorofila *a* (AGUIAR, 1992).

Foram selecionados os gêneros *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 que, visualmente, apresentavam maior crescimento em menor intervalo de tempo. Para estes organismos selecionados foram descritas curvas de crescimento.

As culturas obtidas, *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 foram mantidas em condições fotoautotróficas sendo monitoradas, periodicamente, para prevenir contaminações. A cada 15 dias, as culturas eram transferidas para um meio de cultura líquido novo, com ou sem fontes de N combinado, de acordo com a exigência nutricional de cada organismo e a presença ou ausência de heterocitos nas cianobactérias isoladas.

3.3.1 Produção de biomassa

A determinação da produção de biomassa seguiu o seguinte protocolo: a partir de três frascos Erlenmeyers de culturas estoques, com idade de 10 dias, os quais foram centrifugados a 3.500 xg, por 10 minutos, em centrífuga Beckman J2. Foram recolhidos os sedimentos, e a seguir, foram acrescentados a estes 30 mL de meio BG-11 líquido. O sedimento foi homogeneizado a 800 rpm, até o completo rompimento dos filamentos, utilizando-se um homogeneizador modelo Potter-S (B. Braun Biotech International).

Alíquotas de 200 µL, resultantes da homogeneização das culturas estoques de *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, foram retiradas e inoculadas em frascos Erlenmeyers com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de meio BG-11 suplementado com fonte de N combinado (AGUIAR, 1992). Foram preparados 30 frascos, os quais foram vedados com tampões de algodão e gaze, para cada isolado. Os frascos Erlenmeyers foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, a temperatura de 25° C e irradiância de 250 µmol fótons m⁻²s⁻¹, provenientes de lâmpadas fluorescentes e sob constante agitação (110 rpm), na sala de crescimento de plantas do laboratório de Biofísica do Departamento de Biologia Geral, UFV.

As determinações de clorofila *a* (chl *a*) foram realizadas em intervalos de 48 horas, durante 20 dias. Em cada extração, triplicatas de cada um dos isolados eram utilizadas.

Para cada leitura, a cultura de três frascos contendo 20 mL, eram transferidos para tubos de centrífuga, individualmente. Eram centrifugados a 20.000 xg, por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o sedimento suspenso em meio BG-11 e, novamente, centrifugado por duas vezes. Após a última lavagem, o sedimento era ressuspendido em 5 mL de meio BG-11. Com auxílio de bastão de vidro e fluxos contínuos feitos com seringas descartáveis as células eram rompidas, antes da extração de chl *a* (AGUIAR, 1992).

Alíquotas de 1 mL, de cada uma das repetições, eram transferidas para tubos de centrífuga envoltos por papel alumínio, evitando a penetração de luz. Nestes tubos era acrescentado metanol 100% (Merck) na proporção de 9:1. Posteriormente, os tubos eram submetidos à vigorosa agitação em “vortex”. Para a extração da clorofila *a*, os tubos eram deixados em repouso durante 15 minutos, no escuro e em temperatura ambiente, com a finalidade de obter extração máxima de clorofila. Logo após, os tubos eram centrifugados por 15 minutos a 6.000 xg para a obtenção do sobrenadante.

O crescimento dos gêneros *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 foi monitorado por meio de mudanças ocorridas na densidade ótica (OD) das amostras,

utilizando-se um espectrofotômetro modelo Hitachi U2000. A determinação da absorvância do extrato metanólico foi lida a um comprimento de onda de 665 nm (A665), usando o metanol puro (branco).

O cálculo da concentração de clorofila *a* foi feito com base na fórmula, descrita por MEEKS & CASTENHOLZ (1971) modificado por FIORE *et al.* (2000):

$C = A \cdot a$, onde

C = concentração de clorofila *a* (µg/mL)

A = absorvância

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

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico, e foi descrita uma curva de crescimento característica para cada gênero selecionado, *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02. Os dados seguiram o modelo logístico expresso matematicamente como: (AGUIAR, 1992).

y =, onde:

y = produção de biomassa.

a = valor da assíntota quando x tende a infinito.

b = inclinação da reta.

c = constante.

x = tempo (horas).

3.4 Análise da absorção de arsênio

Para o experimento de determinação da concentração de arsênio absorvido pela biomassa, foi necessária a obtenção de biomassa maior do que aquela utilizada para as determinações de chl *a*, visto que a absorção de arsênio deve ser expressa em relação ao peso seco da biomassa.

Amostras das culturas estoques dos isolados selecionados foram inoculadas em 12 frascos Erlenmeyers com 100 mL de meio BG-11 líquido. Os frascos foram acondicionados em câmara de crescimento modelo 3740 (Form Scientific), em condições fotoautotróficas de crescimento.

As culturas de *Geitlerinema* UFV-E01 foram mantidas, na câmara de crescimento, durante cinco dias, enquanto que as de *Stigeoclonium* UFV-E02 foram mantidas durante oito dias. Essa diferença se deve ao fato de que para os experimentos as células precisavam estar em fase exponencial.

Após o tempo de incubação, todas as amostras contidas nos 12 frascos foram centrifugadas a 3.5000 xg, por 10 minutos para *Geitlerinema* UFV-E01 e, por 15 minutos para *Stigeoclonium* UFV-E02.

O sobrenadante foi descartado, o sedimento armazenado em uma proveta, completando-se o volume para 30 mL com meio BG-11. A seguir, as células foram homogeneizadas em um homogeneizador modelo Potter-S (B. Braun Biotech International). Esta etapa foi importante para romper os filamentos e tornar o inóculo inicial o mais homogêneo possível.

Como auxílio de uma pipeta automática foram inoculados, em cada frasco Erlenmeyer de 50 mL, 500 µL de células, juntamente com 20 mL de meio BG-11 suplementado com N, 5 mM de tampão MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanosulfônico) (Sigma), mantendo o pH do meio de cultura em 7,3. As concentrações de arsênio utilizadas foram determinadas a partir do limite máximo permitido pelo CONAMA (0,5 mg.L⁻¹) para águas de lançamento. Foram feitos experimentos com as seguintes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0 e 7,5 µg.mL⁻¹. A fonte de arsênio utilizada foi o arseniato de sódio (Na₂AsHO₄). 7 H₂O (Merck). Também, foram utilizados dois tipos de meio de cultura, BG-11. O meio BG-11 A contendo uma concentração de fosfato igual a 17,5 µmol.mL⁻¹ (concentração esta normalmente utilizada na composição do meio BG-11 - Tabela 1) e BG-11 B contendo uma concentração de fosfato igual a 6,5 µmol.mL⁻¹. Os frascos contendo células e meio BG-11 com arsênio foram mantidos em condições fotoautotróficas e, sob agitação constante, 110 rpm.

Os tempos de exposição das células dos gêneros selecionados, *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, ao arsênio foram: 0; 6; 12; 24 e 48 horas (KAISE *et al.*, 1999), com três repetições para cada tratamento.

Após a exposição determinada, as culturas foram novamente centrifugadas a 3.500 xg por 10 e 15 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O sedimento foi lavado com água deionizada, para a retirada de íons de arsênio adsorvidos a parede das células. Adotou-se a lavagem com água deionizada, ao invés de meio de cultura, a fim de minimizar as interferências de nutrientes contidos no meio BG-11 (ALLEN, 1973).

Os sedimentos obtidos foram armazenados em frascos Erlenmeyers, previamente lavados, secados e pesados. Os sedimentos foram secos em estufa, a 50° C por 12 horas. O peso da biomassa seca, para cada tratamento foi determinado a partir da diferença entre os pesos dos frascos antes e após a adição da biomassa.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (5 tempos de exposição X 4 concentrações de arsênio X 2 tipos de meio BG-11). Os dados obtidos

foram analisados através de Análise de Regressão Múltipla, utilizando-se o programa estatístico SAEG.

As amostras foram, posteriormente, mineralizadas através da digestão nítrico-perclórica. Em cada frasco contendo biomassa seca foram adicionados 3 mL de ácido nítrico (HNO₃) P.A. (Nuclear) e 1 mL de ácido perclórico (HClO₄) (Merck) (HARTLEY-WHITAKER, 2001). Os frascos foram colocados sobre uma placa aquecedora, e a temperatura foi sendo aumentada, gradualmente até atingir a marca de 110° C.

O resíduo mineral das amostras digeridas foi diluído em 25 mL de água deionizada e a seguir filtrado. As concentrações de arsênio total absorvido por *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 foram determinadas utilizando-se um Espectrômetro de Emissão em Plasma (ICP), modelo 3300 DV (Optima), com comprimento de onda igual 193,696 nm, pertencente ao Departamento de Solos, UFV.

3.5 Avaliação da toxicidade do arsênio

3.5.1 Análise de crescimento de células expostas ao arsênio

Os gêneros selecionados, *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, foram submetidos ao arsênio nas mesmas concentrações, anteriormente descritas. O meio de cultura foi tamponado com 5 mM de MOPS para manter o pH em 7,3. O meio BG-11 utilizado apresentou duas concentrações de fosfato: BG-11 A (17,5 µmol.mL⁻¹) e BG-11 B (6,5 µmol.mL⁻¹), a fim de avaliar a toxicidade do arsênio na presença de concentrações fosfato no meio de cultura (CALZADA *et al.*, 1999).

As culturas de *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 foram mantidas por cinco dias nas condições descritas anteriormente, no laboratório de Biofísica do Departamento de Biologia Geral, UFV. A toxicidade do arsênio foi avaliada pelo conteúdo de clorofila *a*, determinado conforme descrito no item 2.3.1.

O delineamento utilizado foi em blocos, com cinco repetições. Os dados obtidos foram analisados através de Análise de Regressão, utilizando-se o programa estatístico SAEG.

3.5.2 Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio

Para a avaliação das alterações morfológicas nas células de *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, as culturas foram expostas, por 7 dias, as concentrações de 0 e 7,5 µg.mL⁻¹ de arsênio, sendo também cultivadas nos dois meios de cultura (BG-11 A e BG-11 B) tamponados com 5 mM de MOPS, pH 7,3.

Observações das alterações morfológicas das células foram feitas utilizando-se o material a fresco para a microscopia fotônica. O registro fotográfico foi obtido utilizando-se um microscópio de luz (modelo AX 70, Olympus), acoplado a um sistema de captura de imagem (modelo UPhoto, Olympus), pertencente ao Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, UFV.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a metodologia utilizada foi descrita por AGUIAR (2000). As culturas, em fase de crescimento exponencial, foram fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio a 4%, água deionizada e cloreto mercurioso, na proporção de 3:3:1 (KUGRENS *et al.*, 2000). As células foram deixadas em repouso, durante 2 horas. A seguir, foram filtradas em membrana tipo “Nucleopore” (2 µm de diâmetro do poro), lavadas em água deionizada e, em seguida, submetidas a desidratação em série etanólica. Posteriormente, as células foram submetidas ao ponto crítico de desidratação utilizando-se um equipamento (modelo CPD 030, Baltec, Alemanha). O material desidratado foi colocado sobre “stubs”, e metalizado em um equipamento de “sputter-coater” (modelo 550X, Electron Microscopy Science), cuja espessura da cobertura de ouro foi igual a 20 nm.

As eletromicrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo LEO 1430 VP, Inglaterra), pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM), UFV.

4. Resultados

4.1 Coleta e isolamento

Os parâmetros físico-químicos avaliados, em cada lagoa, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos das lagoas amostradas, Eqüideocultura, UFV.

	LAGOA 1	LAGOA 2	LAGOA 3
O ₂ (%)	49,0	87,0	88,0
pH	6,3	5,6	6,0
Transparência (cm)	61	25	5,0

Utilizando as técnicas de micropipetagem seguida de plaqueamento sucessivo, em meio BG-11, suplementado ou não com fontes de N combinado, líquido ou sólido, foram isolados oito gêneros de organismos fitoplanctônicos (cianobactérias e algas eucarióticas), os quais pertencem aos Phyla Cyanobacteria, gêneros: *Geitlerinema* UFV-E01 e *Gloeotrichia*; Chlorophyta: *Stigeoclonium* UFV-E02, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Selenastrum*. Os locais onde os organismos foram coletados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Organismos fitoplânctônicos isolados das lagoas da Eqüideocultura, UFV.

Lago 1	Lago 2	Lago 3
<i>Chlorella</i> sp.	<i>Geitlerinema</i> UFV-E01	<i>Selenastrum</i> sp.
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>Selenastrum</i> sp.	
<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Gloeotrichia</i> sp.	
	<i>Stigeoclonium</i> UFV-E02	

4.2 Seleção das espécies

Com base na avaliação visual do crescimento dos gêneros isolados, e função da produção de biomassa, foram selecionados os gêneros: *Geitlerinema* UFV-E01, uma cianobactéria e *Stigeoclonium* UFV-E02, uma clorófito para os experimentos posteriores.

Geitlerinema UFV-E01 possui os tricomas envolvidos por uma bainha tênue. Possui movimentos oscilatórios nas extremidades dos filamentos e as células são mais longas que largas. As extremidades dos filamentos podem se apresentar levemente atenuadas, curvadas ou enroladas. Normalmente, as células apresentam proeminentes grânulos de cianoficina (reserva de carboidratos), os quais estão presentes somente em cianobactérias. Nos tilacóides, há presença dos pigmentos: clorofila *a*, ficobiliproteínas e carotenóides. São observados numerosos aerótopos (vesículas de gás que auxiliam na flutuação). Os indivíduos deste gênero são encontrados em diferentes biótipos, geralmente com características alcalinas, como fontes termais e águas contendo H₂S. São encontrados em lagos e, também em águas correntes, água doce, salgada e salobra, sendo capazes de sobreviver em ambientes poluídos (ANAGNOSTIDIS, 1989).

Stigeoclonium UFV-E02 possui o talo diferenciado em uma região de filamentos prostrados, constituído de células largas e outra região de filamentos eretos e longos, constituído de estreitas. Nas extremidades das ramificações, normalmente, ocorrem pêlos incolores. O cloroplasto possui a forma placóide (LEE, 1999). É uma alga comum em ambientes dulcícolas, encontrada geralmente, fixa ou flutuante. Apresenta uma ampla tolerância a poluentes orgânicos e inorgânicos podendo ser utilizada como bioindicador de águas poluídas (LEE,1999). O gênero *Stigeoclonium* apresenta alta plasticidade, sendo organismos capazes de viverem em condições ambientais variadas, tais como variação de pH, salinidade, concentrações de nutrientes e poluentes (PAWLIK-SKOWRONSKA, 2003).

4.3 Produção de biomassa

O padrão de crescimento apresentado pelos gêneros *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-02 são apresentados através das curvas de crescimento (Figuras 1 e 2), características de cada isolado. A Figura 1 mostra as variações ocorridas no crescimento de *Geitlerinema* UFV-E01, em função do tempo. A figura mostra uma fase Lag bem definida com cerca de três dias de duração. A fase Log, ou de crescimento exponencial, foi curta, aproximadamente, com dois dias de duração, enquanto a fase Estacionária foi extensa, com 12 dias de duração.

No gênero *Stigeoclonium* UFV-E02, o padrão de crescimento foi diferenciado e a alga apresentou uma fase Lag curta, com duração de apenas um dia, enquanto que a fase Log foi longa iniciando-se no segundo dia após o início do experimento e, finalizando, 12 dias depois. A fase Estacionária foi observada a partir do 13^o dia de experimento.

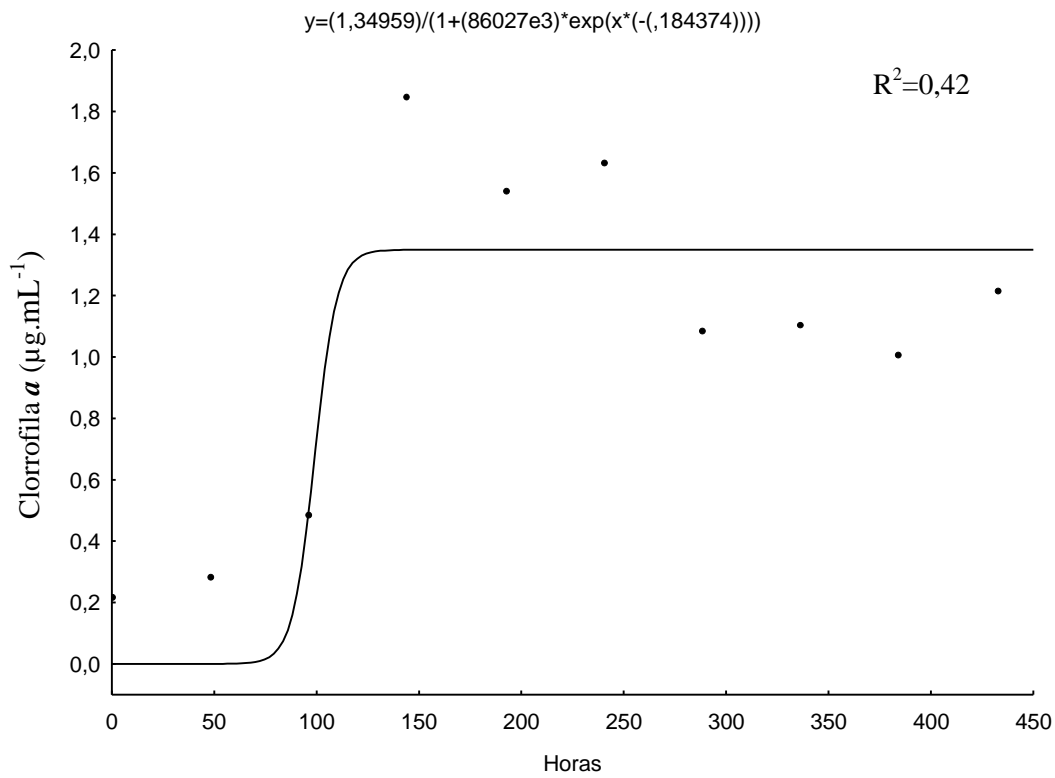


Figura 1: Curva de crescimento de *Geitlerinema* UFV-E01 em função do tempo de incubação (horas), expressa pelo conteúdo de chlo *a* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

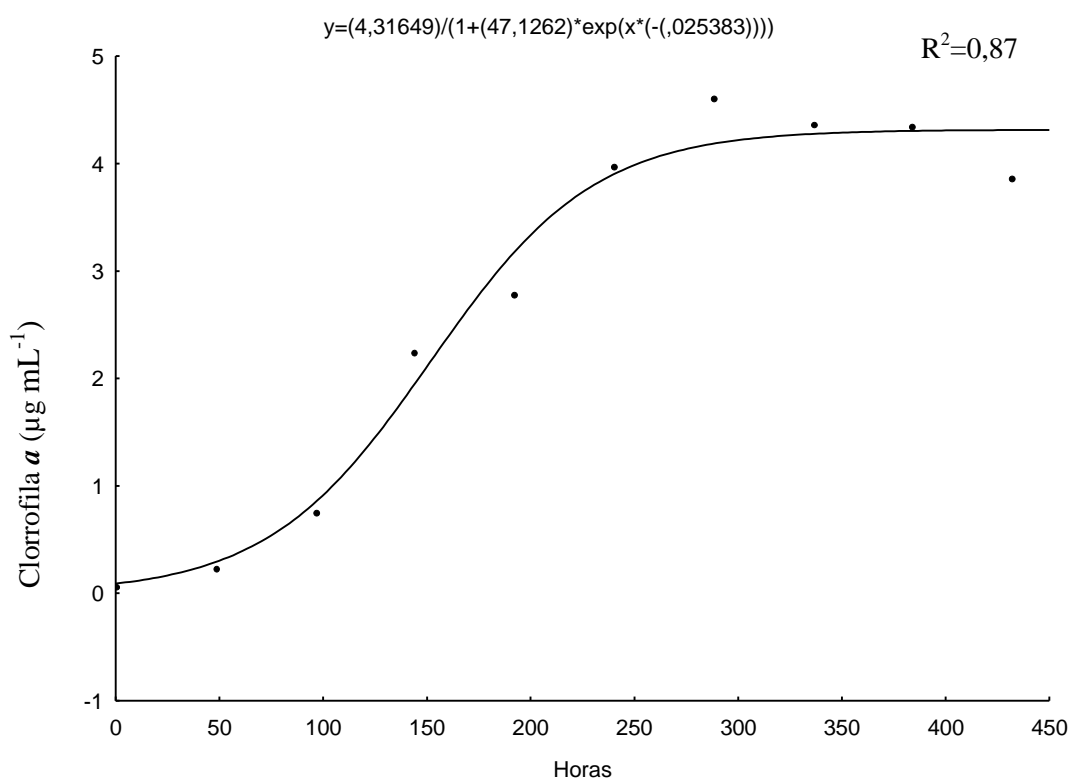


Figura 2: Curva de crescimento de *Stigeoclonium* UFV-E02 em função do tempo de incubação (horas), expressa pelo conteúdo de chlo *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.4 Análise da absorção de arsênio

De acordo com os dados obtidos através de uma regressão múltipla, a absorção de arsênio total pela por *Geitlerinema* UFV-E01 foi influenciada pela concentração de arsênio em solução, pelo tempo de exposição ao metalóide e pela concentração de PO_4^- no meio, conforme os dados ($F = 2,06$, $gl = 12$, $p = 0.0294$) (Tabela 4).

Tabela 4: Equações de regressão relativas à quantidade de arsênio total absorvido pelas células de *Geitlerinema* sp. ($\mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassa seca)

Variável dependente	Equação da Regressão	R ²
Arsênio total BG-11 A	$y = 18,58 + 0,0239\text{As} - 0,00000202\text{As}^2 + 2,469\text{T} - 0,0334\text{T}^2 + 0,00452\text{AsT} - 0,0000699\text{AsT}^2$	0,88
Arsênio total BG-11 B	$y = -33,245 + 0,00977\text{As} - 0,00001052\text{As}^2 + 4,219\text{T} - 0,06123\text{T}^2 + 0,00813\text{AsT} - 0,000129\text{AsT}^2$	0,86

A absorção de arsênio pelas células de *Geitlerinema* UFV-E01 aumentou, proporcionalmente, com o aumento da concentração de arsênio em solução, até 24 horas de exposição (Figuras 3 e 4). Foi observado que houve queda na absorção após 48 horas de

exposição. O valor máximo observado para absorção de arsênio total ocorreu após 24 horas de exposição (Figuras 3 e 4).

Após 24 horas de exposição ao arsênio, nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g As.mL}^{-1}$, a concentração de arsênio total absorvida pelas células de *Geitlerinema* UFV-E01 cultivadas em meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol.mL}^{-1} \text{PO}_4^-$) foi menor que a concentração absorvida pelas células em meio BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol.mL}^{-1} \text{PO}_4^-$). A concentração máxima de arsênio absorvido pelas células em meio BG-11 A foi igual a $665,25 \mu\text{g As.g}^{-1}$ biomassa seca (Figura 3), enquanto que para as células cultivadas em meio BG-11 B, a concentração máxima de arsênio total absorvido foi igual a $1.290,32 \mu\text{g As.g}^{-1}$ biomassa seca (Figura 4).

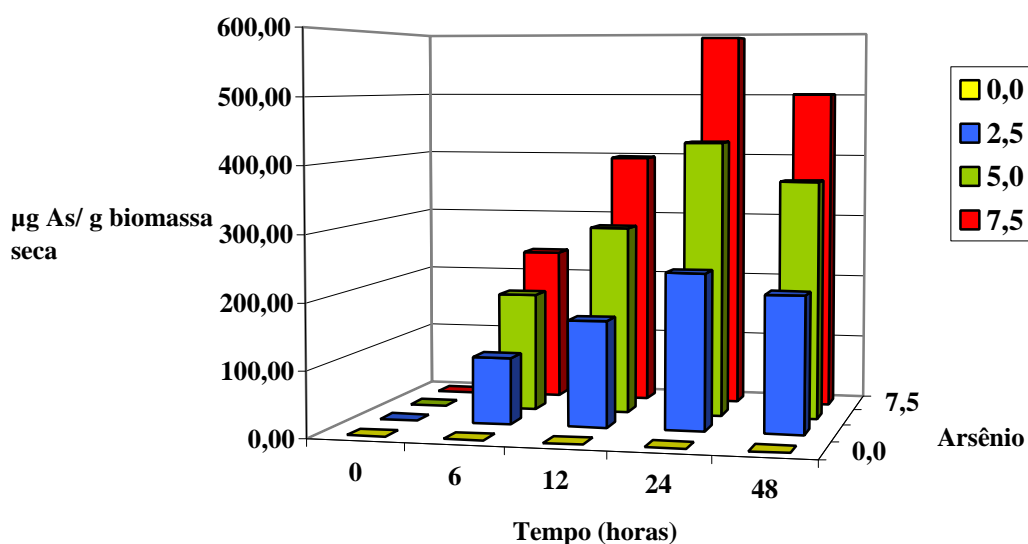


Figura 3: Concentrações de As em *Geitlerinema* UFV-E01 exposta a diferentes concentrações de As (0; 2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g As.mL}^{-1}$) e diferentes períodos de exposição (0; 6; 12; 24 e 48 horas) cultivada em meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- . \text{mL}^{-1}$).

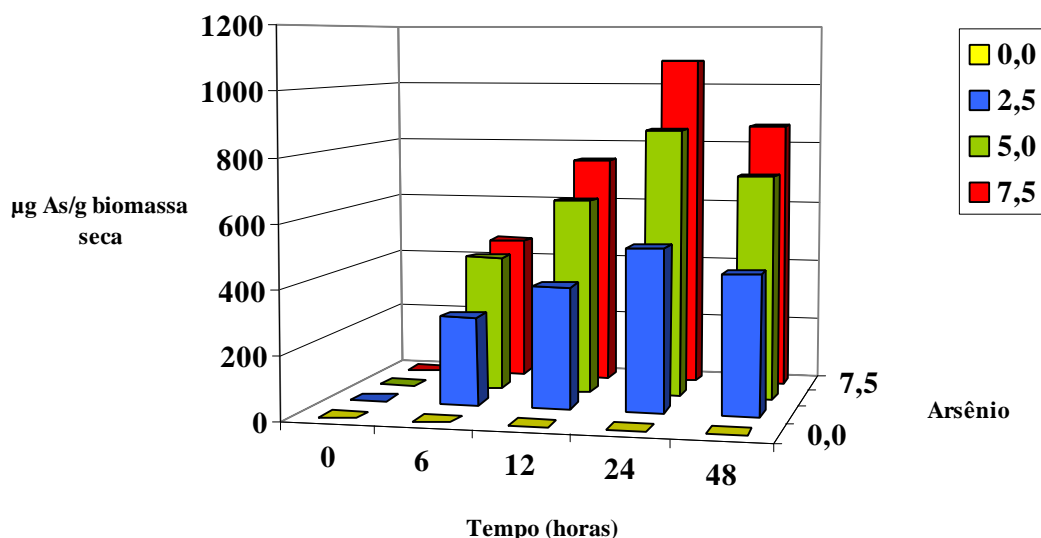


Figura 4: Concentrações de As em *Geitlerinema* UFV-E01 exposta a diferentes concentrações de As (0; 2,5; 5,0 e 7,5 µg de As/mL) e diferentes períodos de exposição (0; 6; 12; 24 e 48 horas) cultivada em meio BG-11 B (6,5 µmol PO₄⁻ . mL⁻¹).

Pela análise de regressão, observa-se que em *Stigeoclonium* UFV-E02 a concentração de PO₄⁻ no meio de cultura não influenciou a absorção de arsênio total (F = 0.93, gl = 12, p = ns). Contudo, a concentração de arsênio em solução e o tempo de exposição influenciaram a absorção de arsênio total (F = 4.37, gl = 12, p = 0.0005) (Tabela 5).

Tabela 5: Equação de regressão relativa à quantidade de arsênio total absorvida por *Stigeoclonium* UFV-E02 (µg As.g⁻¹ biomassa seca).

Variável dependente	Equação da Regressão	R ²
Arsênio total em BG-11	$y = -36,350 + 0,0516As - 0,0000047As^2 + 1,942T + 0,00422T^2 + 0,0102AsT - 0,00015AsT^2$	0,64

A absorção de arsênio, por *Stigeoclonium* UFV-E02, aumentou, proporcionalmente, com o aumento da concentração de arsênio em solução e, também com o aumento do tempo de exposição (Figura 5). O pico máximo de absorção ocorreu após 24 horas de exposição, havendo uma discreta queda após 48 horas, apenas para a concentração de 7,5 µg As.mL⁻¹. Nos tratamentos 0; 2,5; 5,0 µg As.mL⁻¹, houve uma estabilização da absorção após 24 horas de exposição (Figura 5).

Após 24 horas de exposição ao arsênio ($7,5 \mu\text{g As.mL}^{-1}$ em solução), a concentração de arsênio total, absorvida pelas células de *Stigeoclonium* UFV-E02 cultivadas em meio BG-11, atingiu o pico máximo, sendo equivalente a $1.300 \mu\text{g As.g}^{-1}$ peso seco da alga (Figura 5).

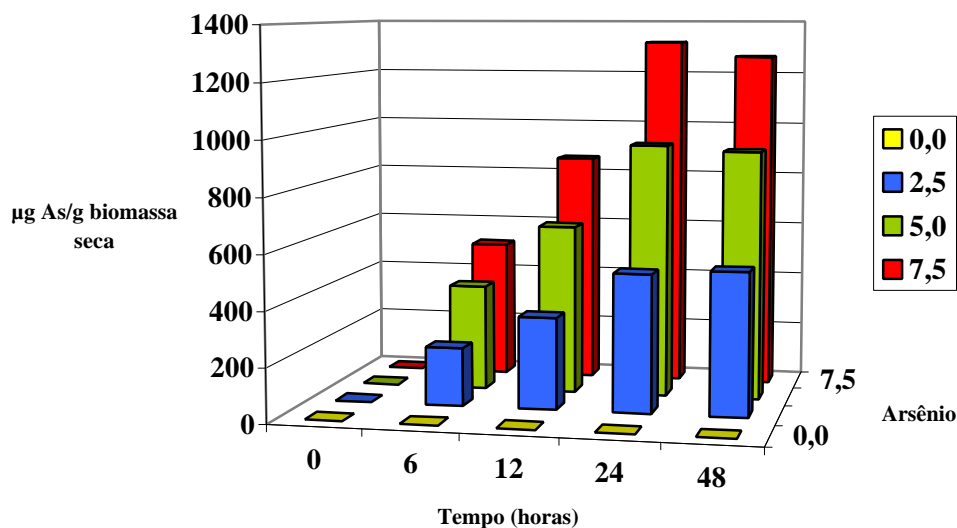


Figura 5: Concentrações de As em *Stigeoclonium* UFV-02 expostas a diferentes concentrações de As (0; 2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g de As/mL}$) e diferentes períodos de exposição (0; 6; 12; 24 e 48 horas) cultivada em meio BG-11.

4.5 Avaliação da toxicidade do arsênio

4.5.1 Análise de crescimento de células expostas ao arsênio

Pelos dados da análise de regressão, o conteúdo de clorofila *a* em *Geitlerinema* UFV-E01, não foi influenciado pelas concentrações de arsênio em solução, assim como pela concentração de PO_4^- no meio de cultura ($F = 0,29$, $gl = 3$, $p = 0,82$).

Ficou evidente que as concentrações de arsênio utilizadas neste trabalho não interferiram no crescimento de *Geitlerinema* UFV-E01, quando as células foram cultivadas tanto em BG-11 A quanto em BG-11 B (Figura 6).

Em *Stigeoclonium* UFV-E02 observou-se uma redução do conteúdo de clorofila *a* nas células que foram submetidas às doses crescentes de arsênio (Figura 7). Pela análise de regressão foi observado que concentrações crescentes de arsênio em solução reduziram o conteúdo de clorofila *a* ($F = 5,46$, $gl = 1$, $p = 0,03$). Houve uma redução mais acentuada no conteúdo de clorofila *a*, quando *Stigeoclonium* UFV-E02 foi cultivado em meio BG-11 B (6,5

$\mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$), comparado com meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$), conforme mostra a Tabela 6.

O maior crescimento registrado para *Stigeoclonium* UFV-E02 foi observado no tratamento controle, como mostra a Figura 7. O crescimento decresceu, proporcionalmente, à medida que as concentrações de arsênio aumentaram. Em *Stigeoclonium* UFV-02, as médias de conteúdo de clorofila *a*, seguidas pelos desvios padrão são apresentadas na Tabela 7.

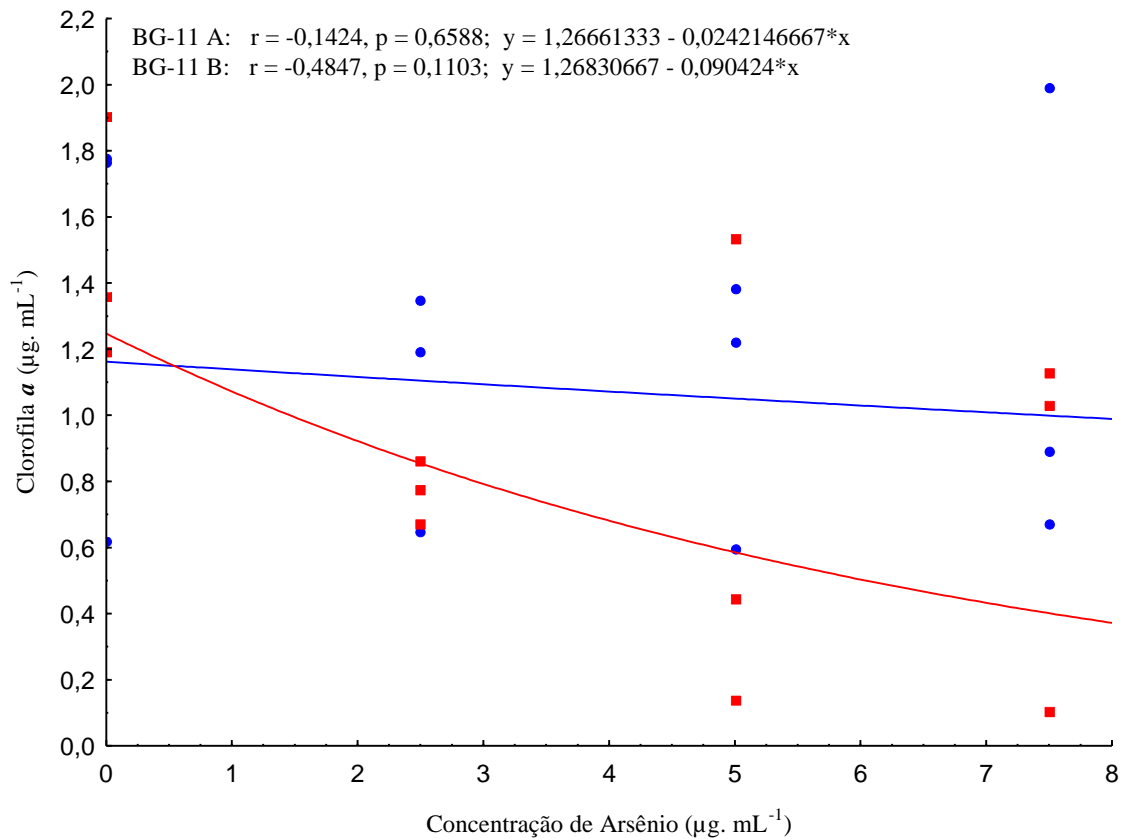


Figura 6: Conteúdo de clorofila *a*, em *Geitlerinema* UFV-E01, cultivado em meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$) e BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$).

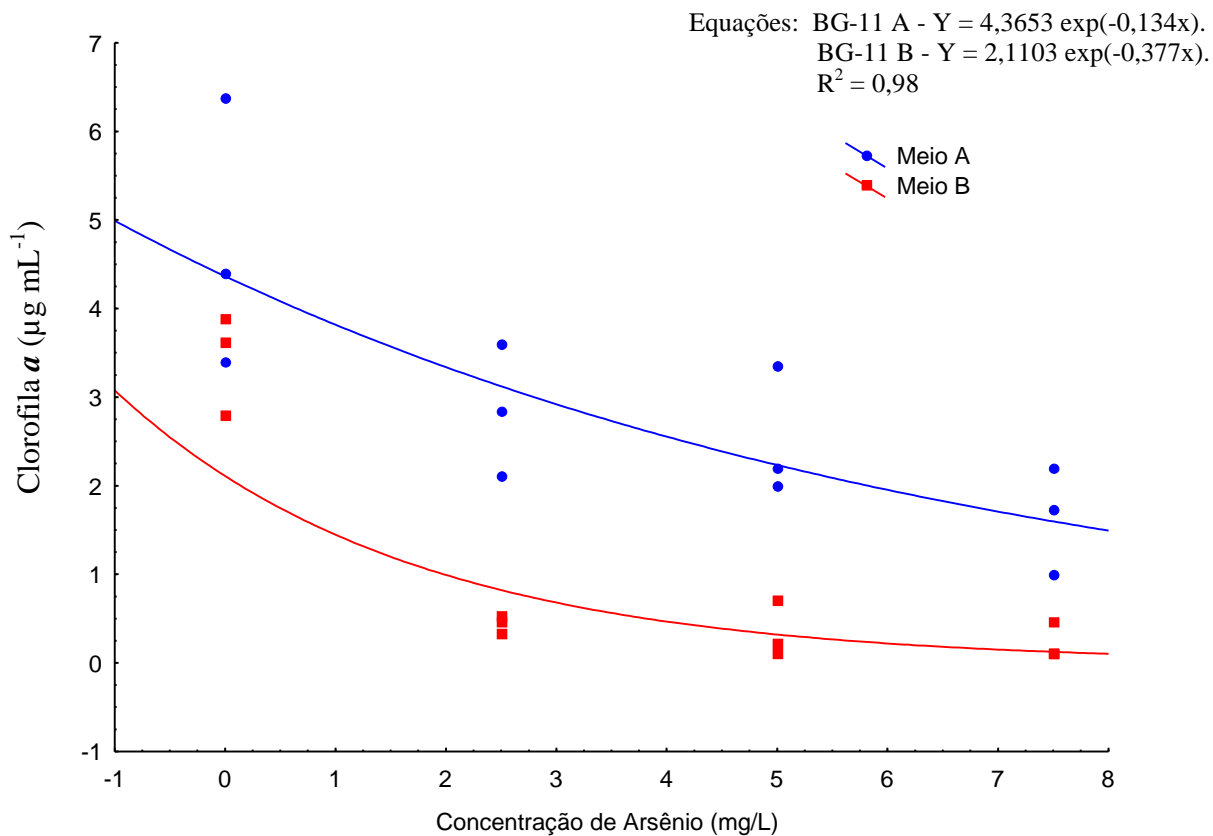


Figura 7: Conteúdo de clorofila *a*, em *Stigeoclonium* UFV-E02, cultivado em meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$) e BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$).

Tabela 6: Valores médios da produção de biomassa em *Stigeoclonium* UFV-E02 cultivado em meios BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$) e BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$), exposto a diferentes concentrações arsênio.

Tipo de meio de Cultura	Médias da produção de biomassa (μg)
BG-11 A	3,50838 a
BG-11 B	1,19253 b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Tabela 7: Médias do conteúdo de clorofila *a*, seguidas dos desvios padrão em culturas de *Stigeoclonium* UFV-E02 cultivadas nos meios BG-11 A e BG-11 B e expostas a diferentes concentrações de arsênio.

Culturas	Concentração de chl <i>a</i>
BG-11 A - controle	4,7244 ± 1,52
BG-11 A - 2,5 µg As/mL	2,8490 ± 0,74
BG-11 A - 5,0 µg As/mL	2,5231 ± 0,73
BG-11 A - 7,5 µg As/mL	1,6425 ± 0,61
BG-11 B - controle	3,4374 ± 0,56
BG-11 B - 2,5 µg As/mL	0,4487 ± 0,45
BG-11 B - 5,0 µg As/mL	0,3513 ± 0,32
BG-11 B - 7,5 µg As/mL	0,2243 ± 0,20

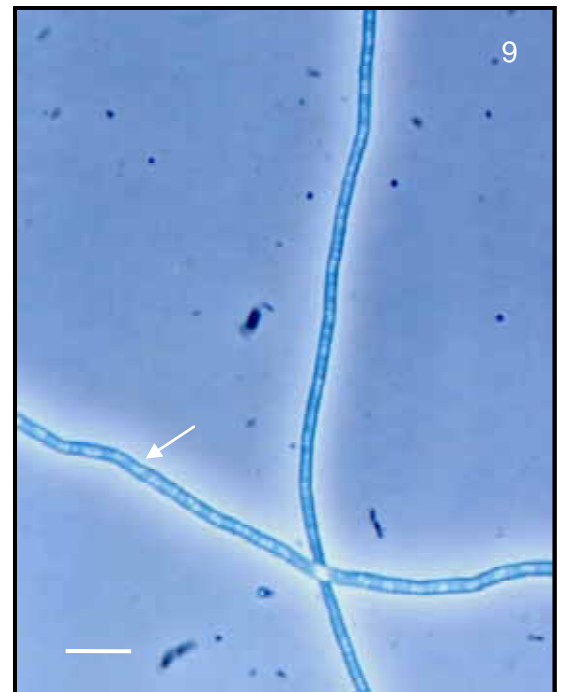
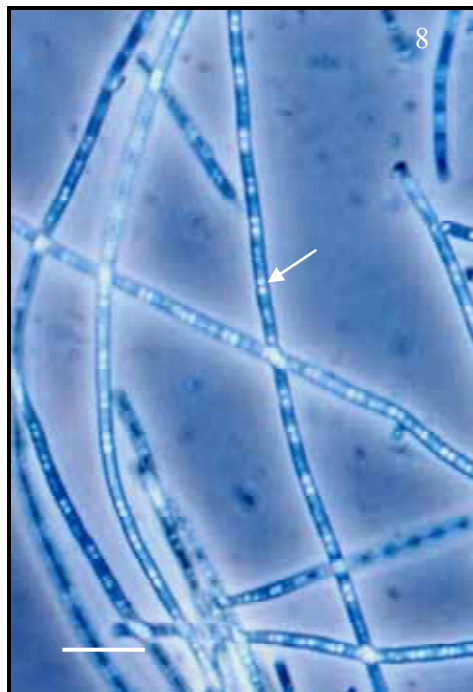
4.5.2 Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio

Foi observado que as culturas de *Geitlerinema* UFV-E01, após 10 dias de exposição ao arsênio, apresentavam coloração amarelada e, após 15 dias, todas as culturas estavam mortas, ocorrendo o mesmo com as culturas controle. As culturas de *Stigeoclonium* UFV-E02 não apresentaram mudanças significativas na coloração, após 15 dias de exposição ao As, ocorrendo o mesmo com as culturas controle.

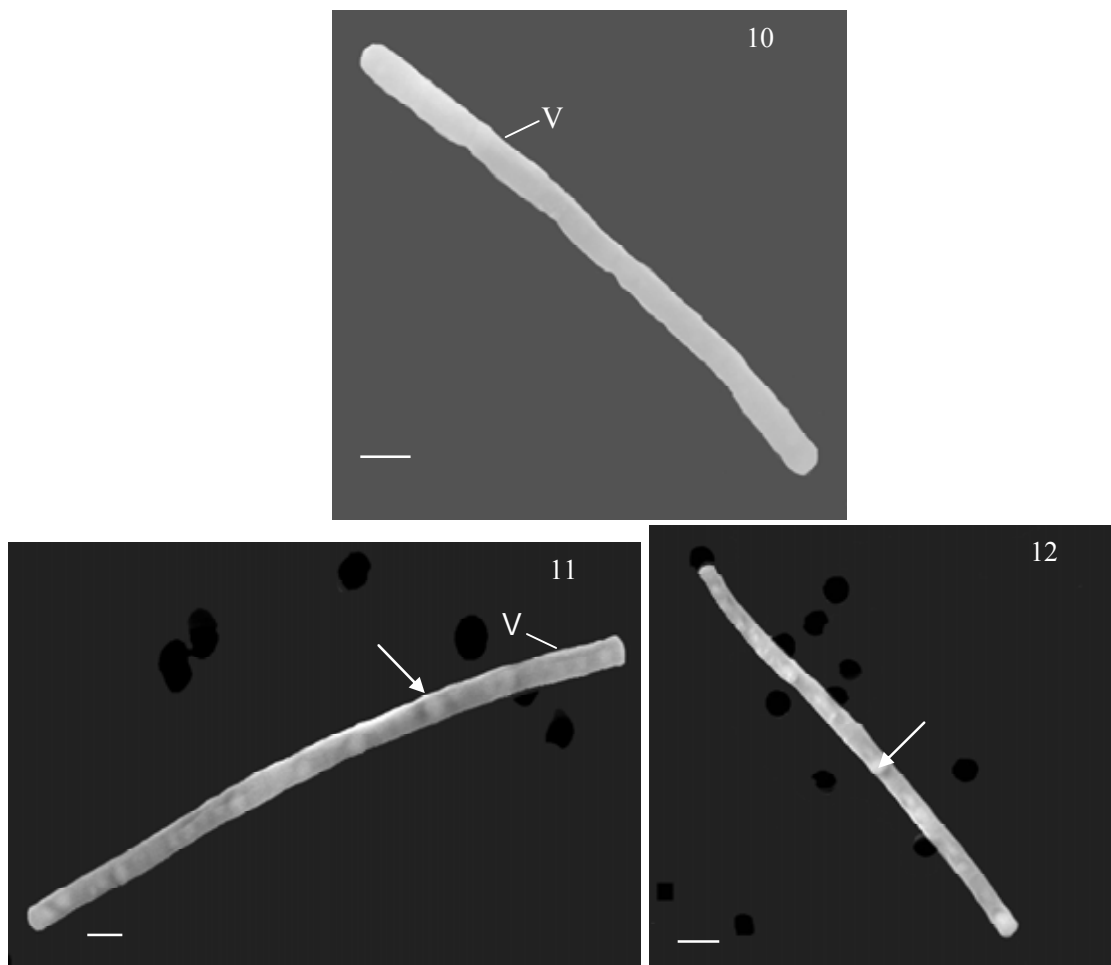
As alterações morfológicas observadas, em microscopia de luz (ML), em células de *Geitlerinema* UFV-E01 expostas ao arsênio na concentração de 7,5 µg As.mL⁻¹ foram: os filamentos, os quais eram envolvidos por bainha nas culturas controle (Figura 8), apresentavam-se com sinuosidades suaves, células de tamanho normal, cujo interior apresentavam aerótopos pouco visíveis em relação ao controle (Figura 9). As alterações morfológicas foram pouco significativas neste gênero. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou as observações feitas na microscopia de luz. Não foram observadas alterações na parede celular das células dos filamentos expostas ao arsênio, comparando com os filamentos do controle (Figuras 10, 11 e 12). Porém, foram observados grânulos densos no citoplasma das mesmas (Figuras 11 e 12). As alterações morfológicas registradas foram observadas em células cultivadas nos meio BG-11 A e B.

As alterações morfológicas observadas em *Stigeoclonium* UFV-E02, através da ML, em células expostas a concentração máxima de arsênio (7,5 µg As.mL⁻¹) foram: as células dos filamentos que eram curtas e largas no controle (Figuras 13, 14, 15 e 16) tornaram-se células mais alongadas e estreitas (Figuras 17 e 18); os cloroplastos de formato placóide e localização parietal, no controle (Figuras 15), reduziram o tamanho e se concentraram na região central das células (Figuras 17 e 18). As alterações morfológicas, observados no MEV foram: as células dos filamentos que são curtas e largas nas culturas controle (Figuras 19, 20

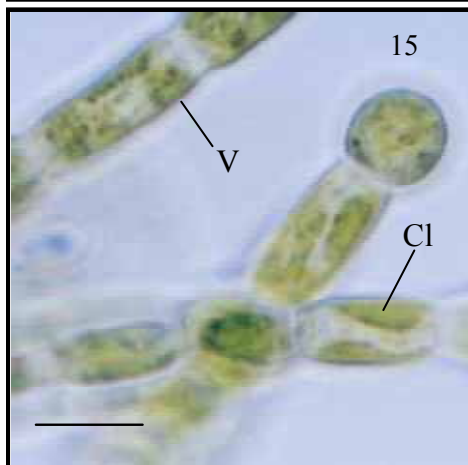
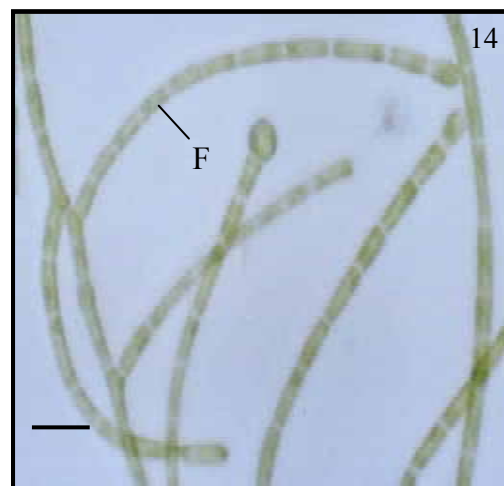
e 21), tornaram-se alongadas e estreitas quando nas culturas expostas ao arsênio (Figuras 22 e 23). Estes resultados confirmam os resultados observados na ML, em nível de parede celular.



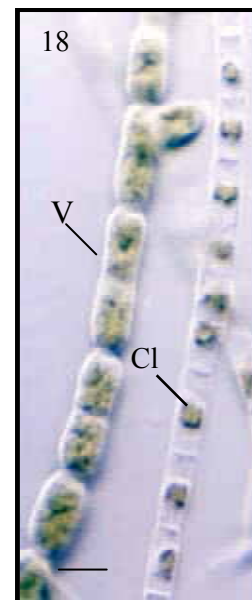
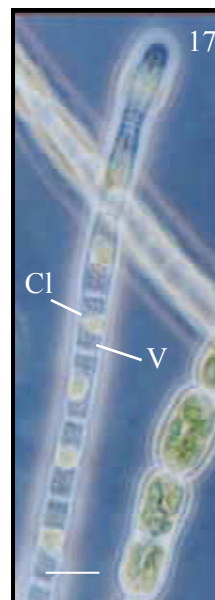
Figuras 8 a 9: Fotomicrografia de Contraste de fase (ML) mostrando filamentos de *Geitlerinema* UFV – E01 cultivados em meio BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol/mL PO}_4$). **Fig. 8-** Células cultivadas sem As (controle). **Fig. 9-** Células cultivadas com As. Seta = aerótopos. Barras = $4 \mu\text{m}$.

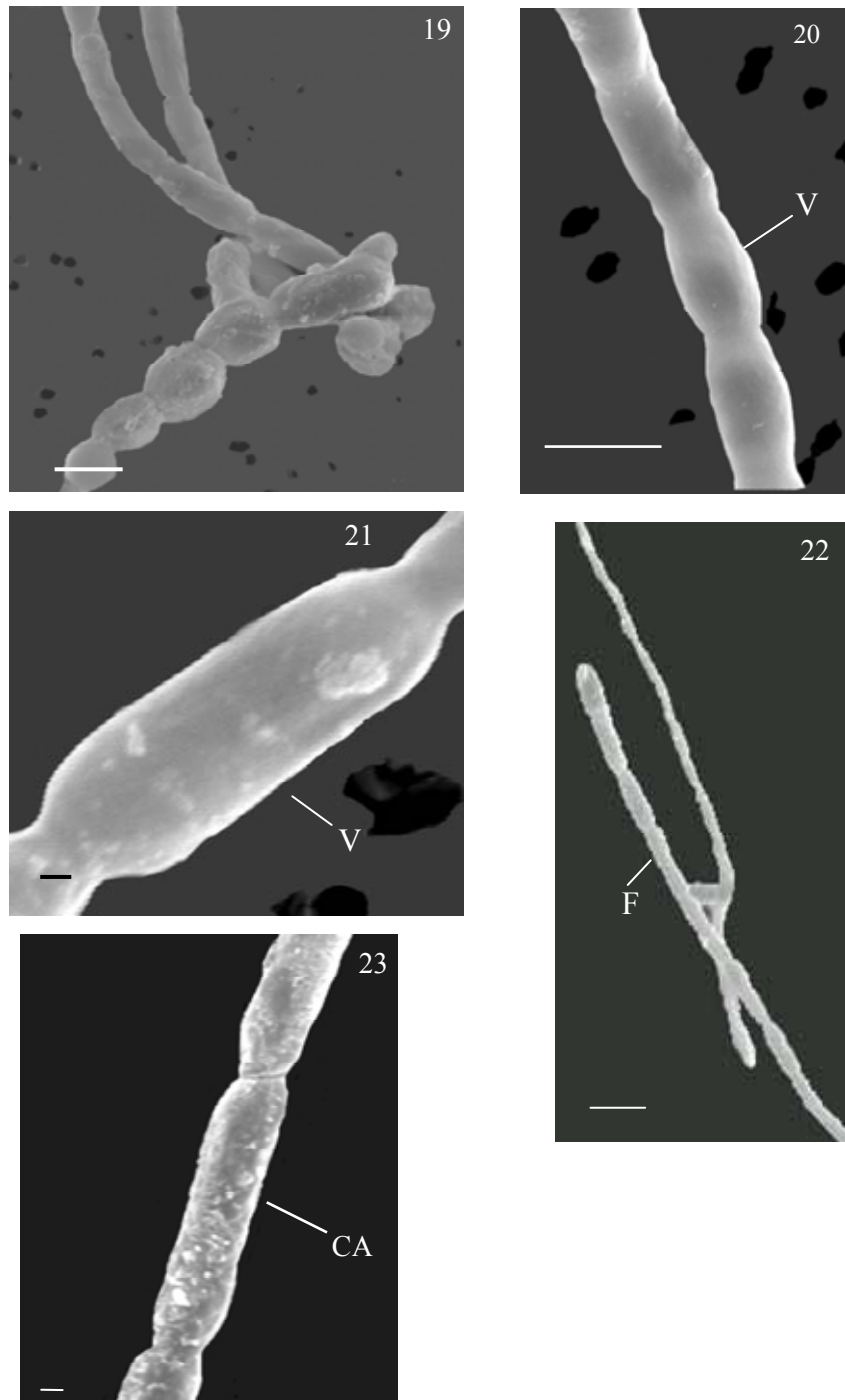


Figuras 10 a 12: Eletromicrografias de varredura (MEV) mostrando filamentos de *Geitlerinema* UFV – E01 **Fig. 10-** Célula vegetativa cultivada em meio BG-11 (controle), detalhe de uma célula vegetativa normal (V). Barra = 2 μ m. **Figs. 11 a 12:** Células cultivadas em meio com As. **Fig. 11-** Detalhe da célula vegetativa (V) cultivada em meio BG-11 A (17,5 μ mol/mL PO₄), evidenciando grânulos densos. Barra = 10 μ m. **Fig. 12-** Detalhe da célula do filamento cultivado em meio BG-11 B (6,5 μ mol/mL PO₄), evidenciando grânulos densos. Setas = grânulos densos. Barra = 2 μ m.



Figuras 13 a 18: Fotomicrografia (ML) *Stigeoclonium* UFV – E02 cultivado em meio BG-11, sem As (controle). **Fig.13** – Organização geral do talo ramificado. Barra = 20 μ m. **Fig.14**– Detalhe do filamento (F). Barra = 10 μ m. **Fig.15**- Células vegetativas (V) normais, contendo cloroplastos parietais (Cl), normais. Barra = 3 μ m. **Fig.16**- Fotomicrografia de contraste de fase (ML). Detalhe de um pêlo (P) na extremidade do filamento, característica taxonômica marcante do gênero. Barra = 3 μ m. **Figs.17 a 18:** Células cultivadas em meio BG-11 com As. **Fig. 17:** ML/contraste de fase, Detalhe da desorganização dos cloroplastos (Cl), e células vegetativas curtas. **Fig. 18:** Detalhe das células vegetativas (V), desorganização dos cloroplastos (Cl) e ramificação. Barras = 3 μ m.





Figuras 19 a 23: Eletromicrografias (MEV) de *Stigeoclonium UFV - E02* **Figs.19 a 21:** Células cultivadas em meio BG-11 sem As (controle). Barra=10 μm . **Fig.19-** Padrão de crescimento do gênero mostrando filamento prostrado com células arredondadas e filamento ereto. Barra=10 μm ; **Fig. 20 -** Detalhe da célula vegetativa (V), normal. Barra =10 μm **Fig. 21-** Detalhe da célula vegetativa (V). Barra = 2 μm . **Figs. 22 a 23:** Células cultivadas em meio BG-11 com As. **Fig. 22-** Detalhe de filamentos (F), células alongadas. Barra = 30 μm . **Fig.23-** Detalhe da célula alongada (CA). Barra = 2 μm .

5. Discussões

5.1 Isolamento dos organismos

O meio de cultura BG-11, utilizado como substrato no isolamento dos organismos e nos experimentos posteriores mostrou ser eficiente e estimulou o crescimento de cianobactérias e algas eucarióticas de diversas formas e táxons (STEIN, 1973; PONTES, 1988; AGUIAR, 1992).

As técnicas de micropipetagem e plaqueamento ajudaram a acelerar o processo de isolamento tanto de cianobactérias quanto de algas eucarióticas, embora tenha sido isolado um maior número de algas, do que de cianobactérias, quando foi utilizado o BG-11 suplementado com N. Apesar da utilização de BG-11 sem N, não foram isolados cianobactérias heterocitadas. A técnica de micropipetagem exigiu habilidade e persistência durante a etapa de isolamento.

A técnica de plaqueamento em meio sólido foi muito útil na obtenção dos isolamentos, principalmente dos gêneros filamentosos, pois o padrão de crescimento destes indivíduos, em meio sólido, individualiza filamentos facilitando o trabalho.

Foram necessários maiores cuidados com a lavagem das vidrarias para evitar contaminações. Sugere-se, trabalhar com as espécies, separadamente. Várias técnicas para isolamento de algas planctônicas têm sido descritas (STEIN, 1973; PONTES, 1988; KUGRENS *et al.* 2000), porém estas metodologias requerem um trabalho árduo e dedicação.

5.2 Seleção de espécies

A seleção de um cianobactéria e de uma alga eucariótica, para estudos posteriores com arsênio, foi proposital. As cianobactérias são organismos simples que possuem uma organização procariótica, enquanto as algas eucarióticas, incluindo as clorófitas, são organismos mais complexos que possuem organização eucariótica (LEE, 1999). Trabalhar com organismos com características tão distintas permitiria avaliar o potencial, a capacidade e o tipo de resposta de cada um deles, frente a diferentes concentrações de arsênio no ambiente.

Pela análise das curvas de crescimento, característica para cada gênero, foi observado que *Geitlerinema* UFV-E01 apresentou crescimento mais rápido, pois apresentou fase log de crescimento com duração de dois dias, comparado com *Stigeoclonium* UFV-E02, cuja fase

concentração de arsênio absorvida reduziu após 40 horas de exposição (SUHENDRAYATNA clorofila *a*. Como ressaltado por AGUIAR (1992), o critério visual é eficiente, porém deve ser fundamentado pela avaliação da produção de biomassa pelo conteúdo de clorofila *a* ou por outros métodos como peso seco, teor de proteínas ou contagem de células. Segundo MEEKS E CASTENHOLZ (1971), dentre os métodos de avaliação da produção de biomassa de algas, a contagem de células/mL é o método mais preciso superando o conteúdo de clorofila *a*, visto que células senescentes ainda podem conter quantidades pequenas de clorofila *a*. Entretanto, o método de contagem de células não foi adotado neste trabalho, devido as células de *Geitlerinema* UFV-E01 serem extremamente difíceis de serem individualizadas para a contagem, o que certamente poderia conduzir a erros de contagem.

As fases distintas do crescimento, Lag (fase adaptativa), Log (fase exponencial) e Estacionária foram bem evidenciadas, para ambos os gêneros. Entretanto, *Stigeoclonium* UFV-E02 apresentou uma fase “Lag” curta, e uma fase “Log” longa, em relação à *Geitlerinema* UFV-E01. É provável que o aparecimento de uma fase “Lag” curta, esteja associado ao volume do inóculo inicial. Quando o inóculo inicial é retirado de culturas em crescimento exponencial, e colocado em novo meio de cultura, este poderá crescer exponencialmente suprimindo a fase “Lag”, na curva de crescimento (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971; AGUIAR, 1992).

Sendo a fase “Log” a de maior aproveitamento de nutrientes e, conseqüentemente, de maior atividade metabólica, todos os experimentos foram feitos com células nesta fase de crescimento.

A temperatura ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C) e a irradiância ($115 \mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) utilizadas proporcionaram um rápido crescimento dos organismos, incrementando significativamente a produção de biomassa (AGUIAR, 1992).

5.3 Análise da absorção de arsênio

Os experimentos comprovaram que a cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 e a clorófita *Stigeoclonium* UFV-E02 absorveram arsênio da solução, proporcionalmente, a concentração do metalóide no meio de cultura.

O tempo de exposição foi um fator preponderante para a absorção de arsênio por *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02. Observou-se que a maior absorção

ocorreu em 24 horas de exposição. Entretanto, a literatura cita que para outras espécies o tempo de exposição varia na obtenção de uma absorção máxima. *Chlorella vulgaris*

Os experimentos comprovaram que a cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 e a clorófito *Stigeoclonium* UFV-E02 absorveram arsênio da solução, proporcionalmente, a concentração do metalóide no meio de cultura.

O tempo de exposição foi um fator preponderante para a absorção de arsênio por *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02. Observou-se que a maior absorção ocorreu em 24 horas de exposição. Entretanto, a literatura cita que para outras espécies o tempo de exposição varia na obtenção de uma absorção máxima. *Chlorella vulgaris* apresentou absorção máxima após 36 horas de exposição, sendo *et al.*, 1999). KAISE *et al.* (1999) estudando duas linhagens de *Chlamydomonas reinhardtii*, uma sensível (AS1) e outra resistente ao arsênio (CW-15), mostraram que na linhagem AS1, o tempo de exposição que proporcionou uma maior absorção ocorreu após 6 horas de exposição; entretanto, na linhagem CW-15 este tempo foi de aproximadamente 12 horas. CALZADA *et al.* (1999) observaram que a maior taxa de absorção de arsênio em *Chlorella vulgaris*, ocorreu após 15 minutos de exposição.

Uma diminuição na absorção de arsênio foi observada em células de *Geitlerinema* UFV-E01, após 48 horas de exposição. Este fato pode ser devido à excreção do arsênio pelas células. Vários trabalhos citam que células de cianobactérias e algas eucarióticas, após um determinado tempo de exposição ao arsênio são capazes de excretar formas metiladas, ou não, deste elemento (MATSUTO *et al.*, 1984; CERVANTES *et al.*, 1994; KAISE *et al.* 1999; DEMBISTSKY & REZANKA, 2003). A absorção de arsênio total, em células de *Chlorella vulgaris*, após 225 horas de crescimento, foi menor do que a absorção após 36 horas de crescimento e, esta diminuição na absorção está relacionada com processos de excreção do arsênio, em solução (SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999). Outros trabalhos também evidenciaram a excreção de arsênio acumulado em células de *Phormidium* sp. (MATSUTO *et al.*, 1984), *Hymenomonas cartearae* e *Tetraselmis chui* (BOTTINO *et al.*, 1978).

Em *Stigeoclonium* UFV-E01 foi observado que a absorção máxima ocorreu em 24 horas de exposição, para todos os tratamentos, sendo mantida constante até 48 horas. Não foi observado uma diminuição na absorção de arsênio pelas células. É provável que as células de *Stigeoclonium* UFV-E01 não tenham atingido o valor de absorção máxima durante os

experimentos e, por isso, seja necessário um maior tempo de exposição das células ao arsênio. Como relatado por BOTTINO *et al.* (1978), a excreção de arsênio absorvido por *Tetraselmis chui* e *Hymenomonas cartearae*, teve início após a absorção ter alcançado o pico máximo.

Não foi constatado se houve biotransformação ou metilação de arsênio pelas células de *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02, visto que neste trabalho foi analisado somente o arsênio total.

Os dados obtidos neste trabalho confirmam a tendência apresentada pela literatura, onde a absorção máxima de arsênio foi alcançada em minutos ou horas após a exposição das células ao arsênio. As diferenças dos dados obtidos neste estudo com os dados fornecidos pela literatura, em relação ao tempo necessário para obter o máximo de absorção, podem ser explicados pelas diferenças entre os organismos estudados. Tais diferenças incluem o tipo de organização celular dos isolados estudados (procarioto/eucarioto), cujas características estruturais e fisiológicas diferem; a composição química da parede celular (peptideoglicano/celulose) e grau de tolerância, intrínseco de cada espécie (BOTTINO *et al.*, 1978; MATSUTO *et al.*, 1984; GENTER, 1996).

Outro fator importante que deve ser considerado em estudos de absorção de arsênio por algas refere-se à quantidade de biomassa necessária para a condução dos experimentos. Apesar de ser este um parâmetro importante, não foi encontrado na literatura uma descrição uniforme da quantidade de biomassa algal que deveria ser utilizada para responder, adequadamente, à exposição ao contaminante, no caso o arsênio. Segundo BECEIO-GONZÁLEZ (2000), quanto maior a quantidade de biomassa produzida, maior será a quantidade de sítios de ligação disponíveis que facilitam os processos de absorção pelas células de algas. Neste sentido, pelo fato dos valores de peso seco obtidos para *Geitlerinema* UFV-E01 e *Stigeoclonium* UFV-E02 terem sido baixos (0,0175g e 0,0127g, respectivamente), sugere-se que novos experimentos sejam conduzidos, a fim de confirmar os resultados obtidos neste estudo.

Portanto, sugere-se que em futuros trabalhos de absorção utilizando células de cianobactérias e algas eucarióticas sejam utilizadas biomassa, igual ou superior a 1,0g de peso seco.

A concentração de fosfato (PO_4^-) disponível no meio de cultura utilizado nos experimentos de absorção de arsênio é outro ponto a ser considerado e muito citado na

literatura (CALZADA *et al.*, 1999; KAISE *et al.*, 1999; SUHENDRAYATNA *et al.*, 1999). Tem sido observado que, independente do meio de cultura escolhido, a absorção de arsênio tem sido maior naquelas células cultivadas em meio de cultura contendo baixas concentrações de fosfato. Entretanto, BOTTINO *et al.* (1978) obtiveram maior taxa de absorção de arsênio quando utilizaram o meio de cultura (ASW), com maior concentração de P. Os autores obtiveram uma taxa baixa de absorção de arsênio quando utilizaram o meio MSW contendo 1/7 de P.

No presente trabalho, os resultados obtidos para absorção de arsênio em *Geitlerinema* UFV-E01, corroboram com os dados da literatura e mostram a importância da composição do meio de cultura utilizado, sendo que foi observado maior absorção de arsênio em meio BG-11 B (contendo menor concentração de fosfato). No entanto, a absorção de arsênio por *Stigeoclonium* UFV-E02, não foi influenciada pelo tipo de meio utilizado, ou seja, a concentração de fosfato dos meios, BG-11 A e BG-11 B, não influenciaram a absorção de arsênio por esta clorófito, respaldando os resultados obtidos por BOTTINO *et al.*, (1978).

5.4 Avaliação da toxicidade do arsênio

5.4.1 Análise de crescimento de células expostas ao arsênio

O crescimento de *Geitlerinema* UFV-E01 não foi influenciado ou alterado pelas concentrações de arsênio utilizadas neste trabalho (2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{gAs.mL}^{-1}$), nas quais, as células foram cultivadas utilizando-se os meios BG-11 A ou B.

PLANAS & HEALEY (1978) mostraram que em *Anabaena* sp. e *Cryptomonas* sp. o crescimento não foi afetado quando as células foram cultivadas a uma concentração igual a 30 $\mu\text{g/mL}$ de arsênio no meio. A exposição ao As, também não foi tóxica para *Skeletonema costatum*, quando indivíduos foram expostos às concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de 2,7 $\mu\text{g/mL}$ de P no meio de cultura (SANDERS, 1979).

Foi observado que a cianobactéria *Anabaena variabilis* foi resistente ao As, mas as células cultivadas em meio de cultura deficiente de P tiveram o crescimento inibido quando expostas ao As (THIEL, 1988). Segundo o autor, a inibição do crescimento foi imediatamente remediada quando houve a adição de P no meio de cultura.

As cianobactérias, em geral, são relatadas como sendo organismos mais resistentes aos efeitos do arsênio do que as algas eucarióticas (MATSUTO, 1984; THIEL, 1988). Provavelmente, devido à capacidade que as cianobactérias apresentam de formar corpúsculos

de polifosfato intracelular, os quais armazenam fosfato em condições de estresse (JACOBSON e HALMANN, 1982).

Stigeoclonium UFV-E02 apresentou efeitos tóxicos relacionados como o arsênio, diferentemente de *Geitlerinema* UFV-E01. Nas culturas de *Stigeoclonium* UFV-E02 o crescimento foi influenciado tanto pelas concentrações de arsênio quanto pelos tipos de meio de cultura BG-11. Foi observado uma diminuição do crescimento da alga proporcional a concentração de arsênio em solução. Esta redução foi acentuada em células cultivadas em meio BG-11 B (contendo menor concentração de fosfato), evidenciando a competição entre o fosfato e o arsênio pelos sítios de ligação. Este resultado sugere que *Stigeoclonium* UFV-E02 é sensível aos efeitos tóxicos do arsênio, e estes dados vão ao encontro com as observações descritas por BOTTINO *et al.* (1978) para *Tetraselmis chuii* e *Hymenomonas carterae*; por SUHENDRAYATNA *et al.* (1999) para *Chlorella vulgaris*; e por KAISE *et al.* (1999) para *Chamydomonas reinhardtii*.

A importância da concentração de fosfato na redução dos efeitos tóxicos do arsênio em algas tem sido demonstrado por vários autores (PLANAS E HEALEY, 1978; SANDERS, 1979; THIEL, 1988; CALZADA *et al.*, 1999) e, estas observações foram evidenciadas no presente trabalho. Entretanto, THIEL (1988) sugeriu que a competição entre estes elementos (arsênio e fosfato) pode ser pelas rotas metabólicas e não, exatamente, pelo transporte. O fosfato reduz os efeitos tóxicos do arsênio, sobre as células, de duas maneiras: primeiro, prevenindo a entrada de arsênio dentro das células da alga; segundo, uma vez dentro das células, o arsênio causa poucos danos quando o fosfato está presente, provavelmente devido à competição que ocorre pelas rotas metabólicas.

A toxicidade de arsênio ficou evidente para *Stigeoclonium* UFV-E02, ocorrendo uma redução acentuada no crescimento dos organismos, pelo fato de que o fosfato é um nutriente essencial que participa de várias rotas metabólicas importantes como a fosforilação oxidativa e a síntese de membranas. O fato de o arsênio competir dentro da célula com o fosfato, pelas rotas metabólicas e sínteses, da qual o P participa, obviamente, estas serão comprometidas e, conseqüentemente, irão comprometer o crescimento e a produção de biomassa.

5.4.2 Alterações morfológicas nas células expostas ao arsênio

De acordo com a literatura, poucos trabalhos relatam modificações morfológicas ou ultraestruturais ocorridas nas células de cianobactérias/algas expostas ao arsênio. Sendo

descritas como alterações: deposição de mucilagem sobre as peças de *Tetraselmis chui*, cultivadas em meio MSW; perda de flagelo e, conseqüentemente, da motilidade em células de *Hymenomonas carterae* cultivadas em meio MSW, na presença de 0,1 µg/mL de As; perda de flagelo em *T. chui* cultivado em meio ASW, contendo 1 µg/mL de As e, movimentos erráticos em *T. chui* e *H. carterae* quando expostas a 1 mg/mL de As no meio (BOTTINO *et al.*, 1978).

Segundo MATSUTO *et al.* (1984), a cianobactéria *Phormidium* sp., cultivado em meio contendo 10 µg/mL de As, não apresentou alterações morfológicas. Isto ocorreu devido à transformação de As, pelas células de *Phormidium* sp. E, a sua excreção rápida no meio, não chegando a causar alterações significativas na morfologia das células dos filamentos.

No presente trabalho, ficou demonstrado que as alterações observadas nas células estão relacionadas com funções desempenhadas pelo P nas células, tais como: redução do crescimento observado em *Stigeoclonium* UFV-E02; formação de grânulos densos no citoplasma em *Geitlerinema* UFV-E01, provavelmente corpúsculos de polifosfato, relatados na literatura (PLANAS E HEALEY, 1978; SANDERS, 1979; JACOBSON & HALMANN, 1982; THIEL, 1988; CERVANTES *et al.*, 1994).

Devido à escassez de relatos sobre os efeitos do arsênio na morfologia de cianobactérias e algas, é fundamental que estudos mais detalhados de microscopia de luz e de ultraestrutura destes microrganismos sejam realizados. Com o objetivo de serem evidenciadas as alterações causadas pelo arsênio, no citoplasma, em organelas como os cloroplastos, as mitocôndrias e os vacúolos (em células eucarióticas), e na parede celular e nos tilacóides em células de cianobactérias, visto serem estas estruturas as mais diretamente afetadas nas células destes organismos quando são submetidos a estresses causados por poluentes.

6. Conclusões

A cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 e a alga eucariótica *Stigeoclonium* UFV-E02 absorveram arsênio, na forma de arseniato.

Geitlerinema UFV-E01 apresentou os menores valores de absorção de arsênio comparado com *Stigeoclonium* UFV-E02. O efeito da concentração de arsênio, do tempo de exposição e do tipo de meio BG-11 influenciaram a absorção de arsênio, em *Geitlerinema* UFV-E01. No meio de cultura BG-11 A, a absorção de arsênio foi menor em relação ao meio de cultura BG-11 B, em 24 horas de exposição ao As, para todos os tratamentos. Entretanto, em *Geitlerinema* UFV-E01 foi observado diminuição dos valores de arsênio absorvido, após 48 horas de exposição. Apesar dos valores de absorção, as doses de arseniato não interferiram no crescimento.

O tipo de meio BG-11 não influenciou a absorção de arsênio, ou seja, a concentração de PO_4^- no meio de cultura não influenciou a absorção de As por *Stigeoclonium* UFV-E02. O pico máximo de absorção em 24 horas de exposição manteve-se constante até 48 horas, em todos os tratamentos. *Stigeoclonium* UFV-E02 foi mais sensível ao arseniato, apresentou redução no crescimento em todas as concentrações de As quando comparado ao controle, principalmente em células cultivadas em meio com concentrações menores de PO_4^- (BG-11 B). Foram evidenciadas alterações morfológicas e estruturais relacionadas com a deficiência de fosfato.

A importância da concentração de fosfato na redução dos efeitos tóxicos do arsênio ficou evidente no presente trabalho e também foi demonstrado por muitos autores (THIEL, 1988; CERVANTES *et al.*, 1994; KAISE *et al.*, 1999; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Foi observado que o fosfato previne os efeitos tóxicos de arsênio com relação à absorção e ao crescimento. Esta proteção ocorreu nos experimentos com concentrações baixas de arsênio, conduzidas no presente trabalho.

A partir dos fatos apresentados, e dos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que a utilização de cianobactérias e algas podem abrir novos caminhos na especiação de arsênio e desintoxicação, necessitando de estudos mais detalhados e otimização de protocolos.

7. Referências Bibliográficas

- AGUIAR, R. M. **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos.** Piracicaba: ESALQ, Tese de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo 122 p., 1992.
- AGUIAR, R. M. **Systematics and Ultrastructure of New and Rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming Lakes.** Fort Collins-Colorado USA. Tese de Doutorado. Colorado State Universty, 277 p., 2000.
- ANAGNOSTIDIS, K. *Geitlerinema*, a new genus of oscillatoriacean cyanophytes. **Plant Systematics Evolution** **164**: 33-46, 1989.
- BARRA, C. M., SANTELLI, R. E., ABRÃO, J., GUARDIÃ, M., Especiação de arsênio – uma Revisão. **Química Nova** **23(1)**:58-70, 2000.
- BECEIRO-GONZÁLEZ, E., CALZADA, A.T., RODRÍGUEZ, E. A., LOPEZ-MAHÍA, P., MUMATEGUI-LORENZO, S., PRADA-RODRIGUES, P. Interaction between metallic species and biological substrates: approximation to possible interaction mechanisms between the alga *Chlorella vulgaris* and arsenic (III). **Trends in analytical chemistry** **19(8)**:475-480, 2000.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. and MOURA, A.N. Influence of abiotic variables and polluting source in the structure of the phytoplankton community in Tibagi river, Paraná state, south Brazil. **Algology Study** **101**: 73-93, 2001.
- BOTTINO, N. R., NEWMAN, R. D., COX, E. R., STOCKTON, R., HOBIN, M., ZINGARO, R. A. and IRGOLIC, K.J. The effects of arsenate and arsenite on the growth and morphology of the marine unicellular algae *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) and *Hymenomonas carterae* (Chrysophyta). **Journal Exp. Marine Biological Ecological** **33**:153-168, 1978.
- BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, 1: les algues vertes.** Paris, Éditions N. Boubée. V1., 1968.
- BOURRELLY, P. **Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, 2: les algues jaunes et brunes, les Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées.** Paris, Éditions N. Boubée. V2., 1972.
- CALZADA, A. T., LOJO, M. C. V., BECEIRO-GONZÁLEZ, E., RODRIGUES, E. A., RODRIGUES, D. P. Determination for arsenic species in environmental samples: use alga *Chlorella vulgaris* for arsenic (III) retention. **Trends in analytical chemistry** **17(3)**:167-175, 1999.

- CERVANTES, C., JI, G., RAMÍREZ, J. L., SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews** **15**:355-367, 1994.
- DEMBITSKY, V. M. and REZANKA, T. Natural occurrence of arsenic compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science** **165**:1177-1192, 2003.
- DESIKACHARY, T. V. **Cyanophyta**. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research, 686p., 1959.
- FIGLIO, M.F., MOON, F.H., TSAI, S.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods** **39**: 159-169, 2000.
- GENTER, R. B., Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In: **Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems**. Academic Press, INC, San Diego, 761p.,1996.
- HARTLEY- WHITAKER, J. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology** **126**: 299-306, 2001.
- JACOBSON, L. and HALMANN, M. Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research** **4(3)**: 481-488, 1982.
- KAISE, T. FUJIWARA, S., TSUZUKI, M., SAKURAI, R., SAITOH, T. and MASTUBARA, C. Accumulation of arsenic in a unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied Organometallic Chemistry** **13**:107-111, 1999.
- KNAUER, K., BEHRA, R., HEMOND, H. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. **Aquatic Toxicology** **46**:221-230, 1999.
- KOMÁREK, J and ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2. Chroococcales. **Algology Study** **43**: 157-226, 1986.
- KOMÁREK, J & ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota**, 1. Teil Chroococcales. In: Ettl, H. *et al.* (eds), Siisswasserflora von Mitteleuropa 19(1), Gustav Fischer Verlag, Jena. 548p., 1998.
- KUGRENS, P., CLAY, B.L. & AGUIAR, R. Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, gen. Et SP. NOV. (Chlorophyta, Characiosiphonaceae), an unusual coenocyte from Colorado. **Journal Phycology** **36**: 421-432, 2000.
- LEE, R.E. **Phycology**. 2^a ed. Cambridge University Press. New York, 645 p.,1999.

- LÉONARD, A., LAUWERYS, R.R. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. **Mutation Research** **75**:49-62, 1980.
- MAEDA, S., OHKI, A., KUSADOME, K., KUROIWA, T. YOSHIFUKU, I. and NAKA, K. Bioaccumulation of arsenic and its fate in a freshwater food chain. **Applied Organometallic Chemistry** **6**:213-219, 1992.
- MATSCHULLAT, J., BORBA, R. P., DESCHAMPS, E., FIGUEIREDO, B. R., GABRIO, T. SCHEWENK, M. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry** **15**:193-202, 2000.
- MATSUTO, S., KASUGA, H., OKUMOTO, H., TAKAHASHI, A. Accumulation of arsenic in blue-green alga, *Phormidium* sp. **Comp. Biochemical Physiology** **78C(2)**:377-382, 1984.
- MEEKS, J. C. & CASTENHOLZ, R. W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* – I. Effect of temperature on fluorescence and enhancement of CO₂ assimilation. **Journal thermal Biology** **3**:11-18, 1971.
- PAWLIK-SKOWRONSKA, B. Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. Coming from habitats of different heavy metal concentrations. **Aquatic Botany** **75**: 189-198, 2003.
- PIRSZEL, J. PAWLIK, B., SKOWRONSKI, T. Cation-exchange capacity of algae and cyanobacteria: a parameter of their metal sorption abilities. **Journal of Industrial Microbiology** **14**:319-322, 1995.
- PLANAS, D. and HEALEY, F.P. Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. **Journal of Phycology** **14**: 337-341, 1978.
- PONTES, M. C. F. **Contribuição de nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 161p., 1988.
- POOLE, K. and HANCOCK, R. E. W. Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa* involvement of a periplasmic phosphate-binding protein. **FEBS**. 1984.
- SANDERS, J.G. Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonem costatum* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology** **15**: 424-428, 1979.

- SANTANHA-FILHO, S. **Impactos do Processo de Drenagem Ácida sobre Recursos Hídricos no Estado de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 173p, 2000.
- SUHENDRAYATNA, OHKI, A., KUROIWA, T. and MAEDA, S. Arsenic compounds in the freshwater green microalga *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite. **Applied Organometallic Chemistry** **13**:127-133, 1999.
- STEIN, J. R. **Handbook of Phycological Methods Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge Press, Cambridge. Melbourne, 1973.
- THIEL, T. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology** **170 (3)**: 1143-1147,1988.
- WEHR, J. D. & SHEATH, R.G. **Freshwater Algae of North America. Ecology annual classification**. Academic Press. V(1): 469p., 2003.
- WILDE, E. and BENEMANN, J.R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotechnology Advance** **11**:781-812, 1993.
- WILLSKY, G. R. and MALAMY, M. H. Characterization of two separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** **140(1)**: 356-365, 1980.
- WHO, Guidelines for drinking water quality. Vol. 1, Recommendations 2^a ed., Geneva, 1993.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE MOLECULAR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM *Geitlerinema* UFV-E01 (CYANOBACTERIA)

1. Introdução e Revisão Bibliográfica

As águas poluídas por metais pesados tem sido um fato preocupante. Metais, incluindo cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e arsênio (As), podem se acumular ao longo da cadeia trófica e causar danos para organismos aquáticos e, eventualmente, para o homem. Entre os métodos utilizados para remover os íons metálicos da água poluída, a aplicação da engenharia genética em microrganismos aquáticos (algas e cianobactérias) tem se tornando promissor.

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são um amplo e diversificado grupo de procariontes fotossintéticos. Elas necessitam de quantidades traço de alguns metais, como Zn e Ni, para o crescimento e o funcionamento celular. No entanto, em quantidades elevadas, os metais tornam-se tóxicos. As cianobactérias possuem mecanismos que regulam a acumulação de íons metálicos, quando estes estão em excesso e, para aqueles que não possuem atividade biológica evitando desta forma a sua toxicidade (YABARRA & WEBB, 1998; SHAO *et al.*, 2002).

Pesquisas apontam algumas espécies de cianobactérias como organismos altamente resistentes a metais pesados (CERVANTES *et al.*, 1994; YABARRA & WEBB, 1998). As cianobactérias possuem ampla variedade de mecanismos envolvidos na tolerância a metais pesados em níveis celulares. Estudos fisiológicos têm mostrado que o principal mecanismo de tolerância envolve complexação de íons metálicos no citosol, através das metalotioneínas (MTs) ou fitoquelatinas (SILVER & WALDERHAUG, 1995; GUPTA *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2003).

Vários mecanismos de tolerância aos metais, pelas cianobactérias, têm sido descritos na literatura (YABARRA & WEBB, 1998). Um dos mecanismos envolve ligações extracelulares. As células sintetizam e liberam materiais orgânicos que quelam os íons metálicos e reduzem sua disponibilidade ou, os íons metálicos podem ligar-se à superfície externa da célula e, geralmente, estes complexos não são transportados para dentro da célula devido à complexidade de sua estrutura. O segundo mecanismo envolve transportadores, como bombas de efluxos, seno os íons metálicos liberados através da excreção. O terceiro mecanismo envolve o seqüestro do metal, internamente, sendo este um dos mais importantes mecanismos pelo qual, as bactérias combatem a exposição aos metais pesados. Em cianobactérias, o seqüestro do íon metálico é feito pelas metalotioneínas Classe II.

As metalotioneínas Classe II são proteínas que se ligam a metais evitando a toxicidade de íons metálicos, potencialmente, tóxicos às células (SILVER & JI, 1994; YBARRA & WEBB, 1998; LIU *et al.*, 2003). São proteínas (polipeptídeos) de baixo peso molecular (<10 kD) que possuem a capacidade de complexar íons metálicos bivalentes através dos grupos tióis provenientes dos resíduos de cisteínas (TURNER & ROBINSON, 1995). As metalotioneínas são encontradas associadas aos metais essenciais, como zinco e cobre, mas também se associam aos metais tóxicos como cádmio, mercúrio e chumbo e metalóides, como o arsênio. A produção de metalotioneínas é um importante mecanismo de resistência, pois são sintetizadas em condições de concentrações elevadas de alguns metais como cromo, cádmio, cobre e chumbo (YABARRA & WEBB, 1998).

Os genes envolvidos na síntese das metalotioneínas são arranjados em um operon, sendo o locus denominado *smt*, o qual contém o gene *smtA* (codifica a MT) e o gene *smtB* (repressor, regulador da proteína). O *smtB* é o gene repressor que inibe a expressão da região operon/promotor do gene *smtA* e, conseqüentemente, a produção de MT. A presença de íons metálicos na célula inibe a expressão do gene *smtB* e, desta forma, permite que o gene *smtA* seja expresso (YABARRA & WEBB, 1998; ROBINSON *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2003). A cianobactéria, unicelular *Synechococcus* sp. PCC7942 tem sido utilizada em estudos de avaliação de estresse devido a causas naturais tais como temperatura, intensidade luminosa, nutrientes, de origem antrópica (deficiência e excesso), exposição a metais pesados como o As. Nesta cianobactéria foi identificado o gene *smtA* (ERBE *et al.*, 1995; TURNER & ROBINSON, 1995; YBARRA & WEBB, 1998). O gene *smtA* foi também relatado para outros gêneros e espécies de cianobactérias como *Synechocystis* PCC 6714 e *Synechocystis* ATCC 22663 (YBARRA & WEBB, 1998).

A perda do gene repressor *smtB* pode ser vantajosa para os organismos que são submetidos constantemente a estresse com altos níveis de Cd, Cu, As, Pb e outros poluentes (ERBE *et al.*, 1995). As células desprovidas do repressor funcional (*smtB*) apresentam elevada concentração de transcritos de RNA mensageiro do *smtA*, mesmo na ausência de um indutor. A expressão da metalotioneína é induzida por elevadas concentrações dos íons metálicos. Estes se ligam aos grupos tiol da proteína reguladora da repressão *SmtB*, induzindo a transcrição da MT (GUPTA *et al.*, 1993; YABARRA & WEBB, 1998).

Nas células de *Synechococcus* PCC 7942, expostas a 100 µM de As em presença de fosfato não foram observados efeitos do arseniato sobre a evolução do oxigênio e, também, não houve transcrição da MT. Contudo, células expostas ao As em concentrações variando de 10 a 100 µM, em condições limitadas de fosfato apresentaram alterações na evolução de

oxigênio, sendo que a MT não foi transcrita, provavelmente, devido à semelhança na estrutura com o fosfato. Posteriormente, como consequência dos efeitos tóxicos do As ou, a contínua ausência de fosfato, as MT foram transcritas (YABARRA & WEBB, 1998).

Em *Oscillatoria brevis* foi identificado, através da técnica de PCR, os genes *bmtA* e *bxa1*, que conferem resistência a metais pesados. O gene *bmtA* sintetiza uma proteína homóloga a SmtA (MT identificada em *Synechococcus* PCC 7942) e o gene *bxa1* sintetiza um transportador de membrana, CPx-ATPase (Bxa1), que exclui o íon metálico do citosol. A presença de ambos os mecanismos torna essa espécie de cianobactéria muito tolerante a metais pesados (LIU *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003).

Em cianobactérias que apresentam resistência aos altos níveis de As, acredita-se que à presença de dois sistemas de transporte de fosfato sejam os responsáveis pela tolerância. Sabe-se que o arsênio é um análogo do fosfato entrando na competição por seus transportadores. Vários autores caracterizaram o sistema de transporte específico de fosfato (Pst), que é altamente específico, discriminando entre arsênio e fosfato e, o sistema de transporte de fosfato inorgânico (Pit), o qual não é específico, permitindo a entrada de arsênio (JACOBSON & HALMANN, 1982; THIEL, 1988; CERVANTES *et al.*, 1994; YABARRA & WEBB, 1998). Mutantes deficientes do sistema de transporte Pit são, normalmente, resistentes ao arseniato (CERVANTES *et al.*, 1994; VAN VEEN *et al.*, 1994).

A espécie *Geitlerinema* UFV-E01, pertence à Ordem Oscillatoriales. Nessa ordem está incluída a espécie *Oscillatoria brevis*, a qual possui dois mecanismos de resistência (produção de metalotioneína e transportador de membrana, CPx-ATPase). Assim, torna-se interessante verificar se a tolerância ao As apresentado pela *Geitlerinema* UFV-E01, usada no presente estudo, é devido a um desses dois mecanismos encontrados em *Oscillatoria brevis*.

A utilização de técnicas moleculares na caracterização de cianobactérias tem permitido a identificação, rápida e precisa, destes organismos. Também tem permitido a detecção de linhagens produtoras de cianotoxinas, sendo a presença destas linhagens, no ecossistema aquático, motivo para constantes monitoramentos e medidas corretivas (LORENZI, 2004).

A microcistina, uma cianotoxina bastante comum, é produzida por linhagens de cianobactéria de vários gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (TILLET *et al.*, 2000; LORENZI, 2004). Para a identificação de microcistinas em amostras ambientais pode-se utilizar o teste imuno enzimático ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (LORENZI, 2004). Algumas culturas mantidas em laboratório apresentam resultados negativos para o teste ELISA, mas em análise de campo, o teste ELISA mostrou resultados

positivos para a microcistina (JARDIM, 1999). Acredita-se que vários estresses ambientais podem estar envolvidos com a produção de toxinas em linhagens de cianobactérias. Até o momento, entretanto, não se sabe ao certo quais os fatores que induzem a produção de toxinas (LORENZI, 2004). Antes de se recomendar uma linhagem de cianobactéria para uso em biorremediação é importante verificar se ela é ou não uma produtora de cianotoxina. A espécie *Geitlerinema* UFV-E01, pertence à Família Pseudanabaenaceae que possui membros produtores de cianotoxinas. Assim, torna-se importante verificar se a linhagem estudada produz cianotoxina no ambiente.

A produção de MT por algumas cianobactérias, a presença de sistemas de transporte que discriminam entre o arsênio e o fosfato e a transformação de arsênio em compostos metilados e dimetilados, evidenciam a possibilidade de manipulação ou super-expressão destes mecanismos de tolerância e a utilização destes organismos para a remoção de resíduos metálicos do ambiente.

Portanto, os fatos justificam a tentativa de utilizar a técnica de PCR para a detecção rápida e precisa do gene *smtA* (codificador da metalotioneína) e do gene *mycA* (envolvido na biossíntese de microcistinas) em *Geitlerinema* UFV-E01 exposta ao As. O presente estudo teve como objetivos:

- Verificar se *Geitlerinema* UFV-E01 produz cianotoxina (microcistina) utilizando o teste imuno enzimático e a detecção do gene *mycA* envolvido na biossíntese de microcistina.
- Detectar, por meio da técnica de PCR, a presença ou não do gene *smtA*, codificador da proteína metalotioneína, em *Geitlerinema* UFV-E01.

2. Material e métodos

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, Campus “Luiz de Queiroz” - Piracicaba, SP.

2.1 Teste imuno enzimático (ELISA) para detecção de cianotoxina

Foi realizado o teste ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para detecção e quantificação das seguintes cianotoxinas: microcistina-LR, microcistina-RR, microcistina-YR e nodularina, utilizando-se o Kit Beacon Microcistinas – Placa (Beacon Analytical Systems Inc., Portland, ME, EUA).

Para a realização do teste foram utilizadas culturas puras de *Geitlerinema* UFV-E01, controle e tratamento ($7,5 \mu\text{g As.mL}^{-1}$), de *Synechococcus* PCC 7942, utilizado como controle negativo para produção de microcistinas, e *Microcystis panniformis* SPC 702, sendo o controle positivo para a produção de microcistinas. As cianobactérias utilizadas como controles (negativo e positivo) pertencem à coleção de cianobactérias do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP. As cianobactérias *Geitlerinema* UFV-E01 (com e sem o As) e *Synechococcus* PCC 7942 foram crescidos em meio de cultura líquido BG-11 (ALLEN, 1968) enquanto a *Microcystis panniformis* SPC 702 foi cultivada em meio líquido ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964). A forma de As utilizada foi arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck).

Um volume de 3 mL das culturas foi coletado e concentrado por centrifugação a $10.000 \times g$, por 5 minutos, para a obtenção do sedimento. Posteriormente, as células de cianobactérias foram rompidas com o auxílio de um processador ultrassônico (CPX 600, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA) e através de procedimento de congelamento/descongelamento usando nitrogênio líquido e banho-maria a 40°C durante três minutos.

A placa de ELISA possui poços contendo os anticorpos policlonais para microcistinas imobilizados. Em um dos poços foi adicionado 100 μL do calibrador (branco). Nos demais, foi adicionado 100 μL das amostras de células rompidas. Em seguida, em todos os poços foram colocados 100 μL do conjugado enzimático (microcistina-enzima) e, após uma breve agitação, a placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente. Caso exista microcistina na amostra, esta compete com o conjugado microcistina-enzima por um número limitado de sítios de ligação de anticorpos. Após este intervalo, o conteúdo dos poços foi descartado, lavando-se cada poço com água ultrapura esterilizada, sendo adicionado 100 μL do substrato e, novamente, a placa foi incubada por 30 minutos. Na presença do conjugado

microcistina-enzima, o substrato é convertido num composto de cor azul. Assim, se na amostra testada existir uma concentração alta de microcistina a solução ficara azul clara, e caso não haja microcistina a solução ficara azul escura. Após o período de incubação, foi adicionado uma solução de ácido clorídrico 1 N (denominada “STOP”).

A leitura das placas foi feita a 450nm utilizando-se um leitor de placa Quick ELISA (Beacon Analytical Systems Inc).

2.2 Extração de DNA genômico

A metodologia utilizada neste trabalho para a extração de DNA de *Geitlerinema* UFV-E01 foi baseada em FIORE *et al.* (2000).

A extração de DNA foi realizada utilizando-se 3 mL de cultura unialgal de *Geitlerinema* UFV-E01 (controle e tratamento com $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de As) e das culturas *Synechococcus* PCC 7942 e *Microcystis panniformis* SPC 702. Para confirmar a integridade do DNA extraído utilizou-se 5 μL da amostra, acrescido de 1 μL do tampão de carregamento (“loading buffer”) e 1 μL de SYBR green (corante utilizado para eletroforese), o qual foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). O padrão de DNA utilizado foi o marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III (Promega, Madison E.U.A.). A documentação do gel foi feita utilizando-se o programa “Multi Analyst” do “Flúor-STM MultiImager (BioRad, Hercules, Califórnia E.U.A.), posteriormente as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C .

2.3 Amplificação do gene *mycA*

O DNA extraído das células das cianobactérias *Geitlerinema* UFV-E01 (exposta e não exposta ao As), de *Synechococcus* PCC 7942 e de *Microcystis panniformis* SPC 702 foi utilizado na amplificação de um pequeno fragmento do gene *mycA* que codifica a região do N-metiltransferase (NMT) do domínio de adenilação da enzima sintetase de peptídeo não-ribossômico. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (OmetF: 5' – TTATTCCAAGTTGCTCCCCA – 3' e OmetR: 5' – GGAAATACTGCACAACCGAG – 3'), confeccionados pela Invitrogen, foram desenhados para gerar um fragmento de aproximadamente 200 pares de bases (LORENZI, 2004). *Microcystis panniformis* SPC702 foi utilizada como controle positivo, uma vez que produz microcistina e *Synechococcus* PCC 7942, como controle negativo, pois não produz microcistina.

A reação de amplificação utilizada continha: água ultrapura e esterilizada (Mili-Q Milipore) para obtenção de um volume final igual a 25 µL, tampão para PCR 10 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), MgCl₂ 50 mM, dNTPs 10mM, 5 µmol/µL de cada oligonucleotídeo; 2,0 µL das amostras de DNA; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 94° C/4 min; 30 ciclos 94° C por 20 s, 55° C por 30 s, 72° C por 1 min; extensão final 72° C por 7 min. O marcador molecular utilizado foi o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), para verificação e quantificação do DNA. A integridade dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose a 1%.

2.4 Amplificação de gene *smtA*

A amplificação do gene *smtA*, a partir dos DNAs extraídos das cianobactérias, foi realizada utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeo iniciador 1F (5' – CGCGAATTCATGACCTCAACAACGTTGGTC - 3') e 2R, (5' – ATAGGATCCTTAGCCGTGGCAGTTACAGC - 3'), confeccionado pela Invitrogen, os quais amplificam uma seqüência de 177 pares de bases (HUCKLE *et al.*, 1993). A reação de amplificação foi realizada em solução contendo: água ultrapura e esterilizada (Mili-Q Milipore), para obtenção de um volume final igual a 25 µL, dNTPs 10 mM, tampão para PCR 10 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), MgCl₂ 50 mM, formamida; 0,5 µL do oligonucleotídeo de cada iniciador; 1,0 µL de cada amostra de DNA, 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 1 ciclo 94°C por 2 min, 53° C por 2 min, 72°C por 1 min; 25 ciclos 94° C por 30 s, 53° C por 1 min, 72° C por 30 s; extensão final 72° C por 10 min. Para o controle positivo foi utilizada a cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942, uma vez que essa linhagem é conhecida por produzir a proteína metalotioneína (HUCKLE *et al.*, 1993).

3. Resultados e Discussões

3.1 Teste imuno enzimático (ELISA) para detecção de cianotoxina

O resultado do teste ELISA para detecção da cianotoxina do tipo microcistina em culturas de *Geitlerinema* UFV-E01 (exposta e não exposta ao As), *Synechococcus* PCC 7942 e *Microcystis panniformis* SPC 702 estão apresentados na Tabela 1. O resultado foi interpretado, visualmente, sendo que as culturas com coloração azul escuro, ao final do teste, não apresentaram produção de microcistina, enquanto que culturas com coloração azul claro apresentaram produção de microcistina.

O resultado visual foi confirmado pela medida da absorbância, onde amostras com valores abaixo de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ são consideradas negativas para microcistina e resultados acima deste valor são considerados positivos. As culturas de *Geitlerinema* UFV-E01 não apresentaram produção de microcistina, pelo teste ELISA, ou seja, apresentaram coloração azul escuro e valores de absorbância menores que $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 1). Como pode ser observado em *Microcystis panniformis* SPC 702, utilizada como controle positivo, os valores apresentados foram altos para microcistina.

Tabela 1: Resultado obtido com o Teste Elisa.

Cultura	Leitura (absorbância)	Resultado ($\mu\text{g/L}$)
<i>M. panniformis</i> SPC 702	0,041	18,49
<i>Geitlerinema</i> (controle)	1,029	0,07
<i>Geitlerinema</i> (controle)	1,041	0,07
<i>Geitlerinema</i> ($7,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ As)	1,174	0.00
<i>Geitlerinema</i> ($7,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ As)	1,169	0.00
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	1,132	0,04

Pelo teste ELISA, *Geitlerinema* UFV-E01 não produziu microcistina, em condições de laboratório. Este resultado é de grande importância para a utilização deste gênero como organismo biorremediador de ambientes aquáticos contaminados por arsênio. O resultado do teste, contudo, não garante que esta linhagem não possa produzir microcistina, uma vez que pode estar havendo algum fator que esteja inibindo a produção da toxina. Tem sido relatado que linhagens de cianobactérias, potencialmente tóxicas, em condições de laboratório, não produzem toxinas, mas que em condições de campo produzem (JARDIM, 1999). A interferência de fatores ambientais, como por exemplo, a herbivoria (zooplâncton) pode estimular a produção de toxinas no (JARDIM, 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*,

2001). Portanto, para solucionar esta questão, foi utilizada a técnica de PCR, visando detectar a presença de genes envolvidos na biossíntese de microcistina na linhagem estudada.

3.2 Extração de DNA genômico de culturas puras

A metodologia utilizada para a extração de DNA mostrou-se rápida e eficiente. O DNA total extraído apresentou boas condições de ampliações por PCR, pureza elevada, e bom rendimento, sendo portanto viável para ser também utilizado em outras técnicas moleculares. O perfil eletroforético do DNA extraído, dos três gêneros de cianobactérias está apresentado na Figura 1.

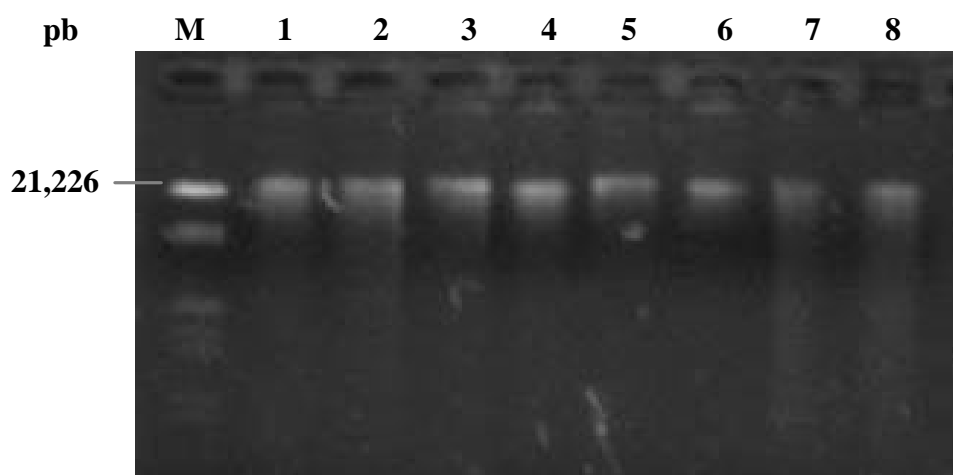


Figura 1 – DNA total extraído das culturas de cianobactérias. **M** marcador molecular Lambda DNA *EcoR* I + *Hind* III; **1 e 2** – *Geitlerinema* UFV-E01; **3 e 4** – *Geitlerinema* UFV-E01 exposta a 7,5 µg/mL As; **5 e 6** – *Microcystis panniformis* SPC 702; **7 e 8** – *Synechococcus* PCC 7942.

O DNA extraído de culturas em fase log apresentou rendimento maior que em outras fases do crescimento, devido ao fato das células, em fase log, apresentarem metabolismo mais elevado para a biossíntese de DNA (FIORE *et al.*, 2000).

3.3 Amplificação do gene *mycA*

Pela técnica de PCR, utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores OmetF/OmetF que amplificam uma região de 200 pb do *mycA*, não mostrou seqüências de DNA amplificado para a linhagem estudada (Figura 2). Esse resultado confirmou os dados obtidos pelo teste ELISA. O controle positivo, *Microcystis panniformis* SPC 702, apresentou o fragmento de DNA do tamanho esperado (aproximadamente 200 bp), demonstrando que a técnica de PCR foi bem sucedida. Este resultado indicou que a linhagem de *Geitlerinema*

UFV-E01 estudada neste trabalho, não possui o gene *mycA*, o qual é um dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina.

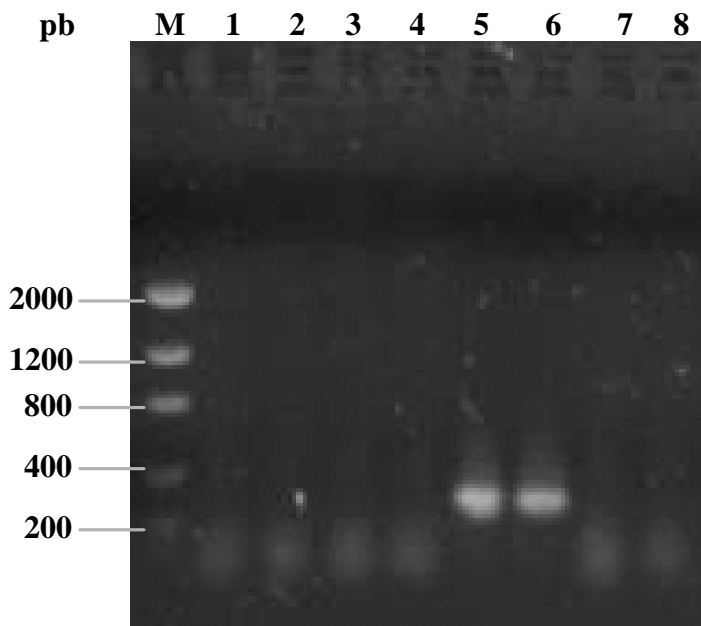


Figura 2 – Amplificação de um fragmento do gene *mycA* utilizando os iniciadores OmetF/OmetR. **M** - Marcador molecular Low DNA Mass Ladder; **1** e **2**– *Geitlerinema* UFV-E01; **3** e **4**– *Geitlerinema* UFV-E01 exposta a 7,5 µg/mL de As; **5** e **6**– *Microcystis panniformis* SPC 702; **7** e **8**– *Synechococcus* PCC 7942.

3.4 Amplificação de gene *smtA*

O perfil eletroforético de *smtA* dos três gêneros de cianobactérias utilizadas neste estudo são mostrados na Figura 3. Como pode ser observado, o gene *smtA* não foi encontrado nas amostras de *Geitlerinema* UFV-E01. Entretanto, o controle positivo, *Synechococcus* PCC 7942 apresentou um produto de amplificação de aproximadamente 177 pb, o qual é o tamanho esperado para o gene *smtA*.

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que a *Geitlerinema* UFV-E01, não utiliza a produção da proteína metalotioneína (*SmtA*) como um mecanismo de resistência ao arsênio, uma vez que não apresentou o gene *smtA* que codifica a proteína. Na Família Pseudanabaenaceae, Ordem Oscillatoriales, a qual pertence o gênero *Geitlerinema*, está também incluída a espécie *Oscillatoria brevis*, a qual apresenta o gene *bmtA* que codifica a proteína *BmtA*, a qual é homóloga a proteína *SmtA* encontrada em *Synechococcus* PCC 7942 (LIU *et al.*, 2003). Além da proteína *BmtA*, *O. brevis* apresenta outro mecanismo de

resistência, ATPase-CPx (bomba de efluxo). Dessa forma, é importante dar continuidade aos estudos moleculares

CPx em *Geitlerinema* UFV-E01.

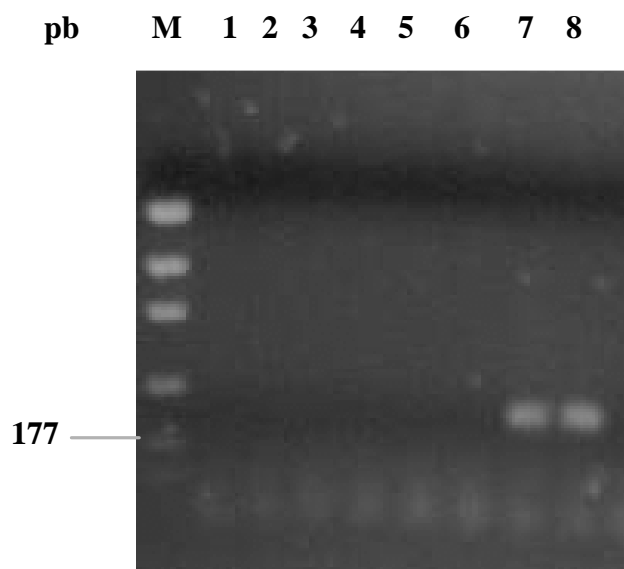


Figura 3 – Amplificação do gene *smtA* utilizando os iniciadores 1F e 2R. **M**- Marcador molecular Low DNA Mass Ladder; **1** e **2** – *Geitlerinema* UFV-E01; **3** e **4** – *Geitlerinema* UFV-E01 exposta a 7,5 µg/mL de As; **5** e **6** – *Microcystis panniformis* SPC 702; **7** e **8** – *Synechococcus* PCC 7942.

Esta linha de pesquisa, que utiliza as MTs, poderá tornar-se um caminho promissor que permitirá aos cientistas aumentar a resistência das cianobactérias aos metais pesados.

As cianobactérias resistentes a altos níveis de arsênio possuem um sistema de transporte de fosfato diferenciado, ou seja, apresenta o sistema Pst (específico para o fosfato) de acordo com CERVANTES *et al.* (1994). Acredita-se que mutantes que contenham este sistema são, normalmente, resistentes ao As (JACOBSON & HALMANN, 1982, THIEL, 1988; YABARRA & WEBB, 1998). Através de técnicas moleculares, as quais oferecem resultados rápidos e precisos, existe a possibilidade de identificação deste sistema (Pst), ou de um outro mecanismo de resistência ao As, em *Geitlerinema* UFV-E01. Assim sendo, sugere-se que seja dada continuidade aos estudos de avaliação do potencial dessa linhagem para ser utilizada como biorremediadora de áreas contaminadas com As, antes de recomendá-la para aplicação em ambientes aquáticos impactados.

4. Conclusões

Neste estudo foi possível verificar que a cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 não produz microcistina, constado pelo teste ELISA e, posteriormente, confirmado pela análise de um fragmento do gene *mcyA*, por meio de PCR, o qual não foi amplificado. Estes resultados são promissores e potencializam a utilização do gênero em estudos de biorremediação, uma vez que essa linhagem não produziu a cianotoxina que causa danos à saúde de animais e do homem.

Geitlerinema UFV-E01, não apresentou o gene *smtA*, o qual codifica a proteína metalotioneína (*SmtA*). Entretanto, deve ser investigado qual será o mecanismo de resistência de *Geitlerinema* UFV-E01 ao arsênio.

Existem outros mecanismos de resistência que são utilizados pelas cianobactérias para sobreviverem em ambientes poluídos, entre eles destacam-se proteínas análogas a *SmtA*, bombas de efluxos e rotas metabólicas que podem metilar o composto, além de sistemas de transportadores que selecionam a absorção entre nutrientes e o metal.

A principal toxicidade causada pelo arsênio em cianobactérias é a deficiência de fósforo e, existem cianobactérias, altamente, resistentes ao arsênio. É possível, portanto, que o mecanismo de resistência em *Geitlerinema* UFV-E01 esteja ligado ao transporte de fosfato.

Estudos mais detalhados se fazem necessários para a identificação de espécies tolerantes ao As e o tipo de mecanismo utilizado. Através da engenharia genética é possível desenvolver linhagens de cianobactérias que expressem estes mecanismos de tolerância, tornando-as potencialmente eficientes para serem utilizadas como biorremediadoras.

5. Referências Bibliográficas

- ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology** 4:1-4, 1968.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., OLIVEIRA, M.C., YUNES, J.S. Cianobactérias tóxicas. **Revista Biotecnologia** 23: 44-47, 2001.
- CERVANTES, C., JI, G., RAMÍREZ, J. L., SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews** 15:355-367, 1994.
- ERBE, J.L., TAYLOR, K.B., HALL, L.M. Metalloregulation of the cyanobacterial *smt* locus: Identification of the *smtb*-binding sites and direct interaction with metals. **Nucleic Acid Research**. 23(12): 2472-2478, 1995.
- FIORE, M.F., MOON, F.H., TSAI, S.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods** 39: 159-169, 2000.
- GORHAM, P.R., MCLACHLAN, J.R., HAMMER, V.T., KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. **Verhandlungen – Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie** 15:796-804, 1964.
- GUPTA, A., MORBY, A.P., TURNER, J.S., WHITTON, B.A., ROBINSON, N.J. Deletion within the metallothionein locus of Cd-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). **Molecular Microbiology** 7: 159-167, 1993.
- HUCKLE, J.M., MORBY, A.P., TURNER, J.S., ROBINSON, N.J. Isolation of the *smtA* gene encoding a prokaryotic metallothionein. **Molecular Microbiology** 7: 177-187, 1993.
- JACOBSON, L., HALMANN, M. Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Plankton Research** 4(3): 481-488, 1982.
- JARDIM, F. A. **Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA MG.** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Escola de Engenharia - Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 120p., 1999.
- LIU, T., NAKASHIMA, S., SHIBASAKA, M., KATSUHARA, M., KASAMO, K. A novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance. **Journal of Bacteriology** 184(18): 5027-5035, 2002.
- LIU, T., NAKASHIMA, S., HIROSE, K., UEMURA, Y., SHIBASAKA, M., KATSUHARA, M., KASAMO, K. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters** 542: 159-163, 2003.

- LORENZI, A.E. **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. Piracicaba.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, 92p., 2004.
- ROBINSON, N.J., WHITEHALL, S.K., CAVET, J.S. Microbial metallothioneins. **Advances in Microbial Physiology 44**: 183-213, 2001.
- SHAO, Q., SHI, D.J., HAO, F.Y., MA, L.N., CHEN, Z.J., YU, M. M., RU, B.G. Cloning and expression of metallothionein mutant a-KKS-a in *Anabaena* sp. PCC 7120. **Marine Pollution Bulletin (45)**: 163-167, 2002.
- SILVER, S., JI, G. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals, **Environmental Health Perspectives 102(3)**: 107-113, 1994.
- SILVER, S., WALDERHAUG, M. Bacterial plasmid-mediated resistances to mercury, cadmium and copper. In: Goyer, R.A., Cherian. M.G. (eds). **Toxicology of Metals. Biochemical Aspects.** Springer –Verlag, Berlin, p. 435-458, 1995.
- THIEL, T. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology 170 (3)**: 1143-1147, 1988.
- TILLET, D., DITTMANN, E., EHHAED, M., DOHERN, H., BORNER, T., NEILAN, B. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology 7**: 753-764, 2000.
- TURNER, J.S., ROBINSON, N.J. Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. **Journal of Industrial Microbiology 14**: 119-125, 1995.
- VAN VEEN, H.W., ABEE, T., KORTSTEE, G.J.J., KONINGS, W.N., ZEHNDER, A.J.B. (1994) **Phosphate inorganic transport (Pit) system in *Escherichia coli* and *Acinetobacter johnsonii***, p. 43-49. In Torriani-Gorini, A.M., Silver, S., and Yagil, Y. (eds.), Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, p.43-49, 1994.
- YABARRA, G.R., WEBB, R. Differential responses of groEL and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Conference on Hazardous Waste Research.** 76-86, 1998.

Conclusões Gerais

A cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 e a clorófito *Stigeoclonium* UFVE02 absorveram arsênio, na forma de arseniato de sódio adicionado ao meio de cultura.

Geitlerinema UFV-E01 apresentou menores valores de absorção de arsênio comparado com *Stigeoclonium* UFVE02.

A absorção de arsênio por *Geitlerinema* UFV-E01 teve influência das concentrações de arsênio em solução, do tempo de exposição e o tipo de meio de cultura. O pico máximo de absorção foi atingido em 24 horas de exposição a todas as doses de arsênio. Apresentou redução na absorção de arsênio, em 48 horas de exposição. Independente das doses de arsênio utilizadas, o crescimento das células não foi afetado; portanto, para as condições experimentais deste trabalho, *Geitlerinema* UFV-E01 foi tolerante as concentrações de arsênio utilizadas. No meio BG-11 A ($17,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$), houve menor absorção de arsênio pelas células de *Geitlerinema* UFV-E01 em relação ao meio BG-11 B ($6,5 \mu\text{mol PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$), onde as células de *Geitlerinema* UFV-E01 absorveram maiores concentrações.

A absorção de arsênio por *Stigeoclonium* UFV-E02 foi influenciada pelas concentrações de arsênio em solução e pelo tempo de exposição. A maior taxa de absorção observada foi em 24 horas de exposição ao arsênio, mantendo-se constante até 48 horas após, em todas as doses de arsênio avaliadas.

Nas condições experimentais deste trabalho, *Stigeoclonium* UFV-E02 foi mais sensível às doses usadas de arsênio, em solução, ocorrendo redução no crescimento em todos os tratamentos quando comparados com o controle.

Ficou demonstrado, neste trabalho que, as concentrações de fosfato, presentes no meio de cultura escolhido, irão maximizar ou reduzir os efeitos na absorção e no crescimento (concentração de clorofila *a*).

Foi verificado que a cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 não produz microcistina, evidenciado pelo teste ELISA e confirmado pela análise de um fragmento do gene *mcyA* por meio de PCR. Estes resultados potencializam a utilização deste gênero em estudos de biorremediação, uma vez que essa linhagem não produz essa cianotoxina que pode causar danos à saúde de animais e humanos.

Geitlerinema UFV-E01 não possui o gene *smtA* que codifica para a proteína metalotioneína (SmtA). Entretanto, deve haver outro mecanismo de resistência ao arsênio.

Os microrganismos fotossintéticos, como as cianobactérias e algas eucarióticas, são promissores para serem utilizados em futuros estudos de fitorremediação de ambientes aquáticos poluídos, além de apresentarem crescimento rápido exigirem baixo custo de

manutenção, em laboratório. Algumas espécies são resistentes a altas concentrações de metais, como o arsênio. Absorvem e em alguns casos transformam em formas menos tóxicas, como, por exemplo, formas metiladas.