



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Carolina Barbosa Marini

**Toxicidade e bioacumulação de cobre em
micro-organismos fotoautotróficos**

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Carolina Barbosa Marini

**Toxicidade e bioacumulação de cobre em
micro-organismos fotoautotróficos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Ciências em Engenharia Química

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Prof^a. Dr^a. Márcia Monteiro Machado Gonçalves

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

M339 Marini, Carolina Barbosa.
Toxicidade e bioacumulação de cobre em micro-organismos fotoautótrofos / Carolina Barbosa Marini. - 2009.
86f.

Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa.
Orientador: Márcia Monteiro Machado Gonçalves.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Cianobactéria - Teses. 2. Microalga – Teses. 3. Cobre - Teses. 4. Toxicidade – Teses. 5. Bioacumulação – Teses. I. Costa, Antonio Carlos Augusto da. II. Gonçalves, Márcia Monteiro Machado. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 546.56

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Carolina Barbosa Marini

**Toxicidade e bioacumulação de cobre em
micro-organismos fotoautotróficos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Ciências em Engenharia Química

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (orientador)
IQ/UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Monteiro Machado Gonçalves (orientador)
IQ/UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Selma Gomes Ferreira Leite
EQ/UFRJ

Prof. Dr. Fábio Merçon
IQ/UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Marta Antunes Pereira Langone
IQ/UERJ

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

À minha família e aos meus amigos, por estarem ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Márcia Monteiro Machado Gonçalves por seu incentivo, dedicação, amizade, competência e orientação na execução desse trabalho;

Ao Prof^o Antônio Carlos Augusto da Costa, um agradecimento sincero pela orientação, pelas oportunas críticas e sugestões e pelos ensinamentos transmitidos;

Aos amigos do laboratório de Bioprocessos Márcia Carreira e Gustavo, pela ajuda e amizade;

À Prof^a Sandra Azevedo da UFRJ, por disponibilizar as linhagens dos micro-organismos;

Aos meus colegas do Mestrado pelo apoio, compreensão e amizade;

À Deus por estar sempre iluminando e guiando meus passos;

Aos colegas e amigos de trabalho (acadêmicos, funcionários e professores), que de forma pessoal ou profissional me deram apoio, sugestões e/ou me disponibilizaram infra-estrutura.

Ao meu pai e minha irmã que sempre estiveram ao meu lado por seu apoio irrestrito e confiança em minhas realizações.

Enfim, a todos que contribuíram nas mais diversas formas, para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

MARINI, Carolina Barbosa. *Toxicidade e bioacumulação de cobre em micro-organismos fotoautotróficos*. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Microalgas e cianobactérias têm sido amplamente recomendadas para biomonitoração de metais pesados e outros poluentes, sendo considerados indicadores sensíveis às alterações ambientais e utilizados como organismos testes na regulamentação dos níveis de metal. Estes micro-organismos fotossintetizantes são produtores primários da base da cadeia alimentar aquática e são os primeiros a serem afetados pela poluição por metais pesados. O cobre é um metal normalmente considerado como nutriente essencial para a vida aquática mas pode ser tóxico para algumas espécies. Portanto, neste estudo foram avaliados o efeito tóxico e a bioacumulação de cobre (II) em quatro espécies de micro-organismos fotoautotróficos componentes do fitoplâncton dulcícola, duas cianobactérias filamentosas (*Anabaena* sp. e *Oscillatoria* sp) e duas microalgas da classe das clorofíceas (*Monorraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp.). O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi o ASM-1 com e sem a presença de cobre (0,6 mg/L a 12 mg Cu²⁺/L) onde, o efeito tóxico do metal foi monitorado por contagem celular para as microalgas e por peso seco para as cianobactérias. A bioacumulação do metal foi avaliada da mesma forma para todos os micro-organismos, através de coletas de amostras no decorrer do experimento e determinação da concentração de cobre em solução por espectrometria de absorção atômica com chama. Os resultados obtidos mostram que o efeito tóxico do metal é diretamente proporcional à concentração inicial para os micro-organismos estudados, mas que o cobre (II) foi mais tóxico para as cianobactérias que para as microalgas verdes. A bioacumulação teve uma relação direta com o efeito tóxico do metal sobre os micro-organismos. Os resultados obtidos permitem sugerir que cobre (II) tem efeito negativo no fitoplâncton, inibindo o crescimento e alterando parâmetros metabólicos como a fotossíntese. A bioacumulação do metal pode comprometer os níveis tróficos da cadeia alimentar, afetando seu transporte para seres superiores.

Palavras chaves: Cianobactérias, microalgas verdes, cobre, toxicidade, bioacumulação.

ABSTRACT

Microalgal and cyanobacterial cells are widely used in the biomonitoring of metal contaminated areas as well as other pollutant agents, being considered sensitive microorganisms in relation to environmental changes and also used as test-organisms in the regulation of low levels of metals. These photosynthesizing microorganisms are primary producers in the aquatic food chain, and are the first ones to be affected by heavy metal pollution. Copper is a metal usually considered as an essential nutrient for aquatic forms of life, however toxic for some species. In this way, in the present study, the toxic effect of copper ion and its bioaccumulation by photoautotrophic microbes from freshwater phytoplankton: two filamentous cyanobacteria (*Anabaena* sp. and *Oscillatoria* sp) and two chlorophyte microalgae *Monorraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp.). The culture medium used in the tests was the ASM-a medium in absence and contaminated with copper ion (0,6 mg/L to 12 mg Cu²⁺/L). The toxic effect of copper was monitored through cell count (microalgal cells) and dry weight measurements (cyanobacterial cells), and copper bioaccumulation was evaluated for all the species tested, through determination of the residual metal concentration in solution, by flame atomic absorption spectrometry. Results obtained indicated that the toxic effect of the metal was directly proportional to the initial concentration of the ion for all the species tested; however, copper ion was more toxic to cyanobacterial than to microalgal cells. The bioaccumulation of copper was directly related to the toxic effect of the ion over the microorganisms. Results obtained suggest that copper ion has a negative effect on the phytoplankton, inhibiting cell growth and also affecting metabolic parameters such as photosynthesis. The bioaccumulation of the metal can markedly affect the trophic levels in the food chain, thus affecting its transport to higher species.

Key-words: Cyanobacteria, green microalgae, copper, toxicity, bioaccumulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema de uma célula cianofícea representando uma estrutura de um acineto e de um heterocisto -----	17
Figura 2- Representação das camadas de uma parede celular Gram negativa, mostrando a membrana citoplasmática, o periplasma e a membrana externa -----	18
Figura 3- Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D glicose -----	20
Figura 4- Representação esquemática de mecanismo de acumulação de metal classificados de acordo com a dependência do metabolismo celular -----	22
Figura 5- Representação esquemática de mecanismo de acumulação de metal classificados de acordo com o sítio onde o metal é removido -----	22
Tabela 1- Tabela onde são apresentados trabalhos sobre toxicidade e bioacumulação -----	24
Figura 6- Fotomicrografia de <i>Monorraphidium</i> sp. em microscópio ótico, aumento de 400x -- -----	29
Figura 7- Fotomicrografia de <i>Scenedesmus</i> sp. em microscópio ótico, aumento de 1000 x ----- -----	30
Figura 8- Fotomicrografia de <i>Anabaena</i> sp. em microscópio ótico, aumento de 1000 x ----- -----	30
Figura 9- Fotomicrografia de <i>Oscillatoria</i> sp. em microscópio ótico, aumento de 400 x ----- -----	30
Quadro 1- Classificação dos micro-organismos -----	31

Tabela 2 -Meio de cultura ASM-1 usado na manutenção das cianobactérias e microalgas verdes -----	33
Tabela 3 -Suplementação do meio nutricional ASM-1 para as microalgas verdes -----	34
Figura 10 -Foto de uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal -----	35
Figura 11 -Representação das divisões da câmara Fuchcs-Rosenthal -----	35
Figura 12 -Direção da contagem dos micro-organismos na câmara Fuchs-Rosenthal (a) e representação de células dentro dos quadrados (b) onde aos círculos fechados representam células que não são contadas-----	36
Tabela 4 -Tabela que faz a conversão de número de células em densidade celular, onde f = fator de diluição, A = representação da quadra maior, \square = o menor quadrado e núm = células contadas -----	37
Tabela 5 -Concentrações de Cu^{++} no meio ASM-1 utilizadas nos experimentos para cada micro-organismo-----	39
Figura 13 -Crescimento da <i>Anabaena</i> sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH =6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 1,4 mg/L, 1,8 mg/L, 4,1 mg/L e 8,8 mg/L -----	42
Figura 14 -Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de <i>Anabaena</i> sp. nas concentrações iniciais do metal de 1,4 mg/L, 1,8 mg/L, 4,1 mg/L e 8,8 mg/L -----	44
Figura 15 -Cultivos de <i>Anabaena</i> sp. isento de Cu^{++} e na presença de concentração inibitória do metal-----	46
Figura 16 -Crescimento da <i>Oscillatoria</i> sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH= 6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,6 mg/L, 0,9 mg/L, 4,6 mg/L e 12,0 mg/L -----	47

Figura 17 -Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de <i>Oscillatoria</i> sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,6 mg/L; 0,9 mg/L; 4,6 mg/L e 12,0 mg/L -----	49
Figura 18 -Cultivos de <i>Oscillatoria</i> sp. isento de metal e na presença de concentração inibitória de Cu(II) -----	51
Figura 19 -Crescimento de <i>Monorraphidium</i> sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH=6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L -----	52
Figura 20 -Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de <i>Monorraphidium</i> sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L -----	54
Figura 21 -Cultivos da microalga verde <i>Monorraphidium</i> sp. isento de Cu ⁺⁺ e na presença de concentração inibitória do metal -----	56
Figura 22 -Crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH= 6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L -----	57
Figura 23 -Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de <i>Scenedesmus</i> sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L -----	58
Figura 24 -Cultivos da <i>Scenedesmus</i> sp. isento de metal e na presença de concentração inibitória de Cu(II) -----	60
Tabela 6 - Acúmulo de cobre para as concentrações iniciais e crescimento celular -----	62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Fitoplâncton	16
2.1.1 Cianobactérias	16
2.1.2 Microalgas verdes	19
2.2 Mecanismos captação de metal por micro-organismos	21
2.3 Toxicidade e Bioacumulação	23
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Micro-organismos	29
3.2 Cultivo e Manutenção das culturas	32
3.3 Quantificação dos micro-organismos	34
3.3.1 <u>Contagem direta</u>	34
3.3.2 <u>Peso seco</u>	37
3.4 Ensaios de Toxicidade e Bioacumulação	38
3.4.1 <u>Metal</u>	38
3.4.2 <u>Clorofíceas</u>	40
3.4.3 <u>Cianofíceas</u>	40
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	42

4.1 Cianobactérias	42
4.1.1 <u>Anabaena sp.</u>	42
4.1.2 <u>Oscillatoria sp.</u>	47
4.2 Microalgas verdes	52
4.2.1 <u>Monorraphidium sp.</u>	52
4.2.2 <u>Scenedesmus sp.</u>	57
4.3 Comparação dos resultados dos micro-organismos	61
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	64
5.1 Sugestões para trabalhos futuros	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO

Os metais pesados se encontram entre os contaminantes mais estudados devido à sua toxicidade aos organismos e persistência no ecossistema. Uma definição de metal pesado é todo elemento químico que apresenta peso específico superior a 5 g.cm^{-3} e número atômico maior que 20. As definições do termo metal pesado, variam de acordo com o ramo da ciência que o aborda. Em geral são elementos metálicos que estão associados com poluição e toxicidade e que em altas concentrações são extremamente tóxicos à vida apresentando maiores riscos ambientais em razão de seu uso intenso e ampla distribuição (BAIRD, 2002). O termo inclui os metais-traço que são necessários pelos organismos em pequenas quantidades, tais como o Cr, Cu, Ni, V, e Zn bem como aqueles que não são essenciais e são tóxicos, sempre em concentrações relativamente baixas como o Cd, Hg e o Pb (CRANE *et al.*, 2001 apud BENDO, 2002; ANDERSEN, 2005).

Diversos efluentes industriais contendo metais tóxicos têm sido descartados no meio ambiente, sendo estes as principais fontes de contaminação por metais pesados das águas. Uma vez lançados no ambiente, os cátions de alguns metais pesados podem ser acumulados através da cadeia alimentar mesmo que presentes em baixas concentrações nos efluentes, pois não são biodegradáveis e assim são facilmente incorporados, tornando-se fatores de concentração perigosos em peixes e animais que, posteriormente, são consumidos pelo homem. Também levando em consideração os efeitos bioacumulativos e crônicos que um metal pode causar à comunidade planctônica, caso este metal esteja presente em concentrações relativamente altas, isto pode implicar no comprometimento de toda a cadeia trófica. As microalgas, como produtoras primárias da cadeia alimentar aquática, são as primeiras a serem afetadas pela poluição por metais pesados (SATOH *et al.*, 2005).

O cobre é um elemento químico metálico, de símbolo Cu, vermelho-amarelado, e apresenta-se em compostos estáveis com estado de oxidação +1 e +2, denominados cuproso e cúprico, respectivamente. O estado de oxidação +2 é mais comumente encontrado e o único em solução. O íon monovalente Cu^+ sofre desproporcionamento em água e, em consequência, só existe em compostos sólidos insolúveis ou em complexos (LEE, 2000).

O metal cobre é um nutriente essencial para a vida aquática, sendo um dos elementos considerados micronutrientes. Está presente em concentrações naturais entre 1 nmol/L e 1 µmol/L no ambiente e torna-se tóxico em níveis mais elevados. As fontes de cobre no meio ambiente podem ser naturais ou antropogênicas, ou seja, decorrentes de atividades humanas, particularmente as atividades industriais. Aumentos relativamente pequenos na concentração de cobre são suficientes para causar efeitos tóxicos e causar a bioacumulação em organismos aquáticos (SATOH *et al.*, 2005).

Exemplos das atividades que podem contribuir para a adição de cobre ao meio ambiente são corrosão de tubos de cobre e de latão por águas ácidas, o uso de algicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas, os quais são usados na preservação da madeira. No entanto, a indústria de mineração, fundição, galvanoplastia e refino são as principais fontes de contaminação (STAUBER e DAVES, 2000). Depósitos de lixo também são responsáveis em lançar no meio ambiente uma variedade de metais, incluindo o cobre e que poluem o solo ou lençóis d'água. Ainda a manufatura de semi-condutores e outros componentes elétricos utiliza cobre, que pode causar a contaminação do meio ambiente no decorrer da produção destes componentes e dispositivos (BENO, 2002).

O cobre também é um elemento essencial para toda biota e estudos nutricionais demonstraram que cobre é um dos metais necessários para o crescimento ótimo de plantas e animais (WHO, 1998 *apud* PEDROSO, 2001). Por outro lado, cobre em concentrações sub-letais para os micro-organismos primários, pode ser bioacumulado por células dessas microalgas e cianobactérias através de mecanismos de captação, difusão para o interior da célula ou ligações com proteínas e outros sítios (KUYUCAK e VOLESKY, 1989). Com isso o metal pode ser magnificado ao longo da cadeia alimentar, sendo acumulado nos peixes, ostras, camarões, crustáceos até chegar á organismos superiores, como os mamíferos e consequentemente o homem. O mecanismo de toxicidade do cobre envolve, com freqüência, a competição do metal por sítios ativos de enzimas normalmente ocupados por outros metais como o zinco, por exemplo. Esta substituição de um elemento pelo outro acaba alterando funções vitais dentro do organismo e pode levá-lo até a morte. Metais pesados na forma livre, como o Cu (II) são rapidamente adsorvidos na superfície celular de algas, ou nas guelras dos peixes através de interações entre o metal e proteínas. O metal adsorvido vai lentamente se difundindo pela membrana celular para o interior da célula, onde este pode participar de reações prejudiciais para o organismo.

O cobre foi reconhecido como um metal essencial ao organismo humano e geralmente, penetra no organismo por via oral. Este é necessário à síntese da hemoglobina e está ligado ao metabolismo de diversas enzimas tais como (SANTANA, 2003):

- Ceruloplasmina, proteína que permite o transporte do cobre e a utilização do ferro e quando este transportador está saturado, a sua absorção pelo intestino é diminuída (SANTANA, 2003);

- Citocromo-oxidase, enzima necessária à etapa terminal das oxidações. Um déficit desta enzima provoca alteração celular ou mesmo a morte (SANTANA, 2003);

- Transaminases, enzimas que participam do metabolismo dos aminoácidos (SANTANA, 2003);

- Lisina-oxidase, que favorece a reticulação do colágeno e da elastina que em caso de déficit haverá falhas na reticulação do colágeno, problemas na plasticidade e solidez dos tecidos, em particular ao nível das artérias. Pode-se também observar fraturas ósseas, aneurismas e dissecações arteriais (SANTANA, 2003);

- Amino-oxidases, que permitem o metabolismo das aminas biógenas (SANTANA, 2003);

- Tirosinase que possui um papel na pigmentação da pele (LEE *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2000)

Por outro lado, o excesso desse elemento pode desenvolver doenças e toxicidade. O fígado é o órgão de armazenamento e, portanto, mais susceptível à toxicidade. A captação continuada de cobre, mesmo em baixas doses, produz considerável acúmulo no fígado (WHO, 1998 apud SANTANA, 2003) e absorvido em doses tóxicas, afeta principalmente os rins, o fígado (causando a cirrose) e o sistema nervoso central (causando depressão seguida de excitabilidade) (BRITO, 1988). A intoxicação em longo prazo provoca hemólise e uma hepatite crônica, devido ao acúmulo de cobre no fígado, que pode levar à cirrose ou à necrose maciça. Altas doses de cobre (toxicidade aguda) podem produzir náuseas, vômitos, diarreia, danos hepáticos, gengivites, dermatites, descoloração da pele e/ou do cabelo (CHAN *et al.*, 1998).

Para evitar a contaminação e o comprometimento dos organismos aquáticos, os níveis de cobre dissolvido na água são regulamentados em quantidades limitadas, sendo o teor máximo de cobre dissolvido permitido em águas doces de 0,009mg/L a 0,013 mg/L e para água salinas de 0,005 mg/L (Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005).

Dessa forma, o objetivo principal da presente dissertação é avaliar os efeitos inibitórios do cobre no crescimento de cianobactérias e microalgas, além de investigar a bioacumulação do metal nesses micro-organismos. Isto considerando que os micro-organismos investigados constituem-se na base da cadeia alimentar, podendo ser os precursores da transmissão da contaminação. Embora a toxicidade e a bioacumulação do cobre pelos micro-organismos tenham sido amplamente estudados, existe pouca informação sobre a relação entre eles.

Como objetivos específicos, foram realizados estudos para:

- Avaliar a toxicidade do íon Cu (II) em espécies de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Oscillatoria* e espécies de microalgas verdes dos gêneros *Monorrraphidium* e *Scenedesmus*.
- Verificar o efeito da presença do Cu (II) no meio de cultura das espécies estudadas.

A apresentação deste trabalho está dividida em cinco capítulos.

Neste capítulo é feita uma introdução acerca do tema desenvolvido juntamente com os objetivos e a estrutura organizacional do trabalho.

No capítulo 2 é apresentada uma breve revisão bibliográfica na qual são abordados temas como características relevantes das cianobactérias e microalgas verdes, toxicidade e bioacumulação e mecanismos de captação de metais por micro-organismos.

No capítulo 3 é descrita a metodologia adotada no estudo.

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos, juntamente com as discussões sobre a toxicidade e a bioacumulação do cobre pelas espécies selecionadas.

Finalmente, no capítulo 5 são apresentadas, as principais conclusões e sugestões sobre o tema desenvolvido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitoplâncton

Em todos os corpos d'água pequenas células fotossintetizantes e minúsculos animais ocorrem como plâncton suspenso. As algas e as cianobactérias que juntas constituem o fitoplâncton, são o início da cadeia alimentar dos organismos heterotróficos que vivem nos oceanos e nos corpos de água doce. Esses micro-organismos são elementos crucialmente importantes dos ecossistemas aquáticos, produzindo oxigênio e servindo como alimento para os animais (ALMEIDA, 2007) e são considerados os produtores primários mais importantes da cadeia trófica (BONEY, 1989 apud CAMPELO, 1999).

Tanto as cianobactérias quanto as microalgas verdes são micro-organismos fotoautotróficos que têm a clorofila-a como pigmento fotossintético primário embora sejam estruturalmente diferentes (LEE, 2008).

2.1.1 Cianobactérias

As cianobactérias (cianofíceas) são células procarióticas que não possuem organelas delimitadas por uma membrana tais como núcleo, complexo de Golgi, mitocôndrias etc. São bactérias fotossintéticas, possuidoras de clorofila **a** e realizam fotossíntese oxigênica. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. Algumas espécies possuem acinetos ou células de resistência, heterocistos (células que têm a característica de fixar nitrogênio atmosférico) (Figura 1), vacúolos gasosos ou aerótopos utilizados para o deslocamento da célula na coluna d'água (SMITH, 1987; WETZEL, 1993; MUR *et al.*, 1999 apud MATSUZAK, 2007).



Figura 1: Esquema de uma célula cianofícea representando uma estrutura de um acineto (a) e de um heterocisto (h).

Fonte: http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cianobac_Diferenciacion/Imagenes/Cianobacteria%20filamentosa.jpg

As cianobactérias exibem uma grande variedade de formas e arranjos, de cocos unicelulares a bacilos, de células filamentosas a células filamentosas ramificadas multicelulares. Não possuem flagelos, mas as espécies filamentosas geralmente possuem movimento deslizante e podem migrar através de superfícies úmidas. Apesar de serem organismos microscópicos, o tamanho de suas células pode variar muito (0,5 μ m para células de tamanho bacteriano a 40 μ m para a espécie *Oscillatoria princeps*) (MADIGAN *et al.*,2004).

A capacidade de crescimento nos mais diferentes ecossistemas é uma das características marcantes das cianobactérias (habitats terrestres, de água doce, e marinhos), sendo algumas espécies capazes de sobreviver em condições ambientais extremas. Os ambientes dulcícolas são os mais propícios para o crescimento das cianobactérias, pois a maioria das espécies se desenvolve melhor em águas neutro-alcálinas (pH de 6,0 a 9,0), temperaturas em torno de 25°C e alta concentração de nutrientes (MADIGAN *et al.*,2004).

A parede celular das cianobactérias é basicamente a mesma das bactérias Gram negativas e confere rigidez e forma ao micro-organismo (LEE, 2008). Essa parede celular corresponde a uma estrutura complexa formada por várias camadas (Figura 2).

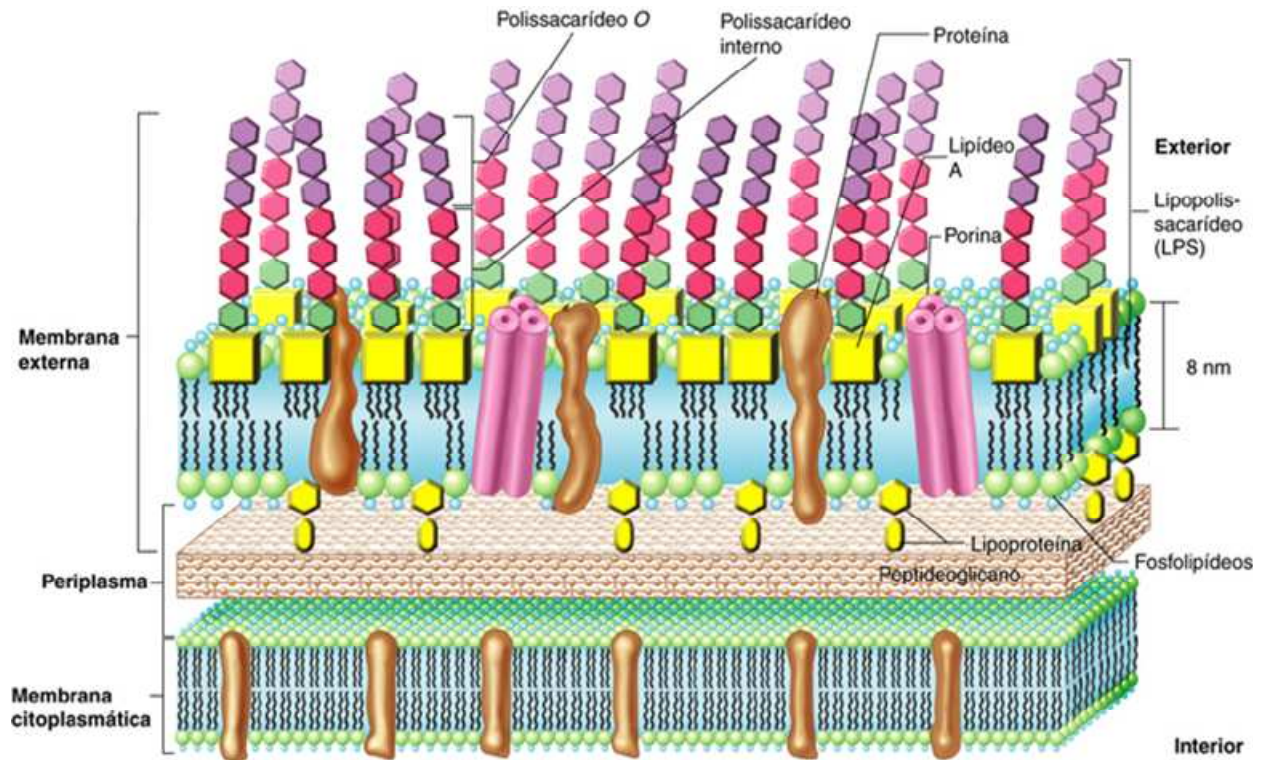


Figura 2: Representação das camadas de uma parede celular Gram negativa, mostrando a membrana citoplasmática, o periplasma e a membrana externa.

Fonte: Madigan *et al.*(2004).

Além da membrana citoplasmática, a parede da célula apresenta uma fina camada formada por peptídeooglicanos (cerca de 10%) e uma membrana externa. Os peptídeooglicanos formadores da camada interna são compostos por dois derivados de açúcares (N-acetilglicosamina e ácido N acetilmurâmico) e um pequeno grupo de aminoácidos (MADIGAN *et al.*,2004).

Já a membrana externa da parede é composta por lipídios, fosfolipídios e polissacarídeos (MADIGAN *et al.*,2004).

Entre as camadas da parede, está o espaço periplasmático. Esse espaço contém vários tipos de proteínas, incluindo enzimas hidrolíticas (promovem a degradação inicial dos nutrientes), proteínas de ligação (iniciam os processos de transporte de substratos) e quimiorreceptores (correspondem a proteínas envolvidas na resposta quimiotática) e principalmente as porinas. Essas porinas são as proteínas transmembrânicas que se associam formando canais que permitem a entrada e a saída de substâncias hidrofílicas de baixo peso

molecular, tornando a membrana externa permeável á moléculas pequenas (MADIGAN *et al.*,2004).

Outra característica típica das cianobactérias é que a parede celular pode não ser a camada mais externa, uma vez que pode ser coberta por uma superfície externa de polissacarídeos e proteínas, como cápsula, bainha e camada limosa (PHOENIX *et al.*, 2002).

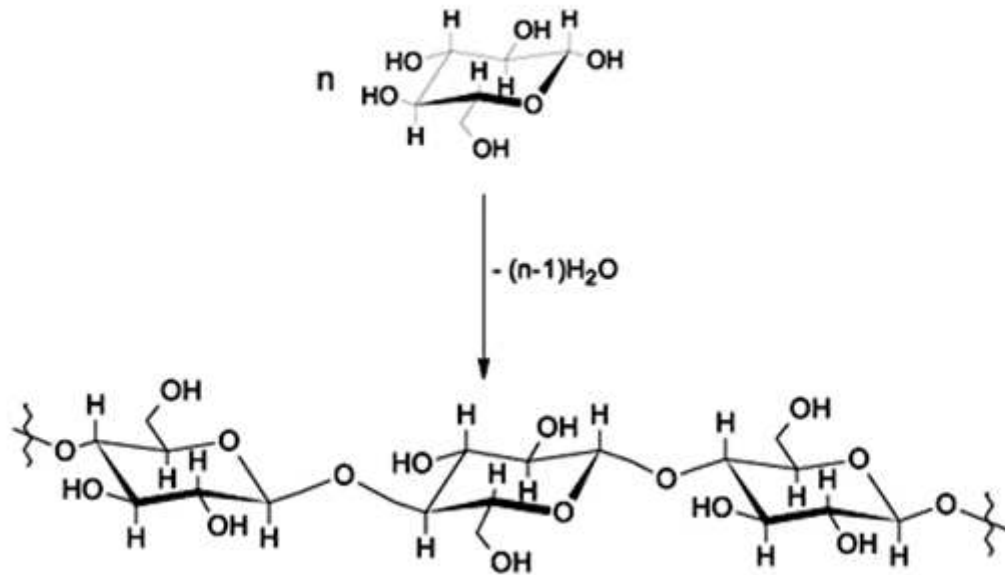
2.1.2 Microalgas verdes

O termo microalga verde faz referência às algas eucarióticas (células que possuem organelas definidas por uma membrana) da classe das Clorofíceas. Essas algas contêm pigmentos clorofila a e a clorofila b, possuem o amido como substância de reserva, são fotoautotróficas (embora algumas cresçam heterotroficamente) e através da fotossíntese, produzem oxigênio e utilizam o dióxido de carbono como sua fonte de carbono. Sendo organismos autotróficos, utilizam o ATP como fonte de energia para a fixação do CO₂ (PELCZAR, 1997).

A Chlorophyta é a maior e mais diversificada divisão das algas aquáticas. É o grupo predominante do plâncton de água doce (90%), embora algumas poucas espécies planctônicas unicelulares ocorram em águas marinhas costeiras (HAVEN, 2001). Morfologicamente, é um grupo muito diversificado, existindo formas unicelulares, coloniais, filamentosas e parenquimatosas. Algumas formas coloniais apresentam um número definido de células para a espécie (cenóbios), formando grupamentos que variam até 8 células. Quanto às formas filamentosas, estas podem ser celulares ou cenocíticas. As formas cenocíticas não apresentam paredes transversais, e são multinucleadas (HAVEN, 2001).

A parede celular das algas é rígida e dá suporte e formato ao micro-organismo, sendo constituída por uma rede de fibras de celulose que é usualmente modificada pela adição de outros polissacarídeos (pectina, xilose, manose, ácidos algínicos, ou ácidos fuccínicos). A celulose (Figura 3) é uma cadeia polimérica linear com um grande número de grupamentos hidroxila. Sua estrutura molecular é formada por unidades repetidas de β-D glicopirranose

ligadas covalentemente através de funções acetal entre os grupamentos hidroxila dos átomos de carbono C_4 e C_1 (ligação glicosídica β -1,4) (WANG e CHEN, 2009).



n = unidade repetida (glicose)

Figura 3: Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D glicopiranosose.

Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/rarv/v29n3/a14fig01.gif>

Além disso, uma alta percentagem da parede das microalgas verdes também é constituída por proteínas ligadas aos polissacarídeos para formarem glicoproteínas (ROMERA *et al.*, 2006 *apud.* WANG e CHEN, 2009).

A parede celular das algas é permeável para constituintes de baixo peso molecular e impermeável para moléculas grandes ou macromoléculas. A parede contém poros de cerca de 3-5 μm de largura que permite somente a passagem das moléculas pequenas como a água, íons inorgânicos, gases e outras substâncias nutrientes para o metabolismo e crescimento da microalga (WANG e CHEN, 2009).

2.2 Mecanismos de captação de metal por micro-organismos

Micro-organismos possuem a capacidade de adsorver e/ou absorver íons metálicos dissolvidos. Entre eles estão bactérias, microalgas e fungos (VOLESKY, 1986).

A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acumulação, variam de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a linhagem. As células microbianas têm capacidade de remoção ou captação de metais de soluções, empregando metabólitos excretados, parede celular e polissacarídeos. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade da captação (BOLTON e GORBY, 1995; GADD, 1992; MULLEN *et al.*, 1989; GALUN *et al.*, 1987).

Existem tipos distintos de captação/ acúmulo de metais pelos micro-organismos, estes podem ser por mecanismos independentes do metabolismo celular (biossorção) ou dependentes (bioacumulação). A biossorção se dá através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros materiais associados à face externa da membrana celular. A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário o gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (GADD, 1992).

Diferentemente, na bioacumulação o transporte de íons de metais pesados é feito através da membrana celular e sua acumulação intracelular é dependente do metabolismo, ou seja, ocorre somente em células vivas, capazes de gerar energia. Ou ainda, a bioacumulação é um processo de acúmulo ou captação de metal em condições de crescimento celular.

Devido à complexidade da estrutura dos micro-organismos, o processo de acúmulo ou captação implica na existência de muitos caminhos para as células capturarem o metal. Segundo Veglió e Beolchini (1997), os mecanismos de captação de metal podem ser classificados de duas formas distintas: através da dependência do metabolismo celular (Figura 4) ou de acordo com a localização do sítio de captação do metal (Figura 5).

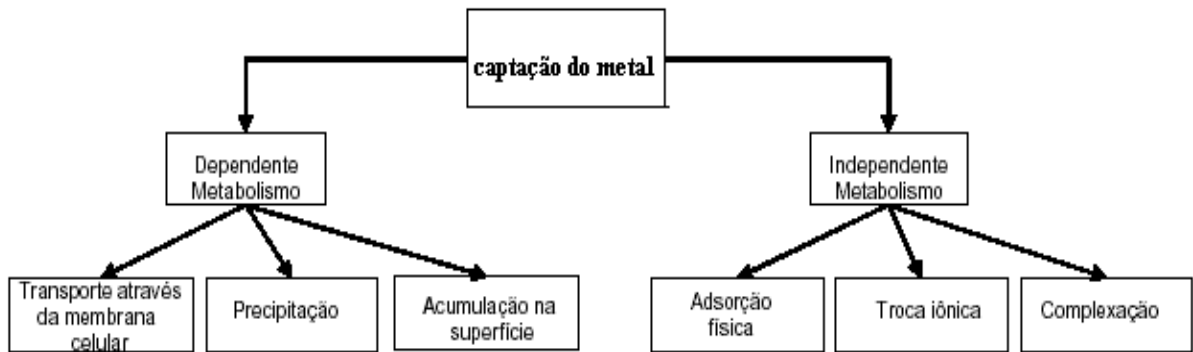


Figura 4: Mecanismo de acumulação de metal de acordo com a dependência do metabolismo celular. Fonte: adaptação Veglió e Beolchini (1997).

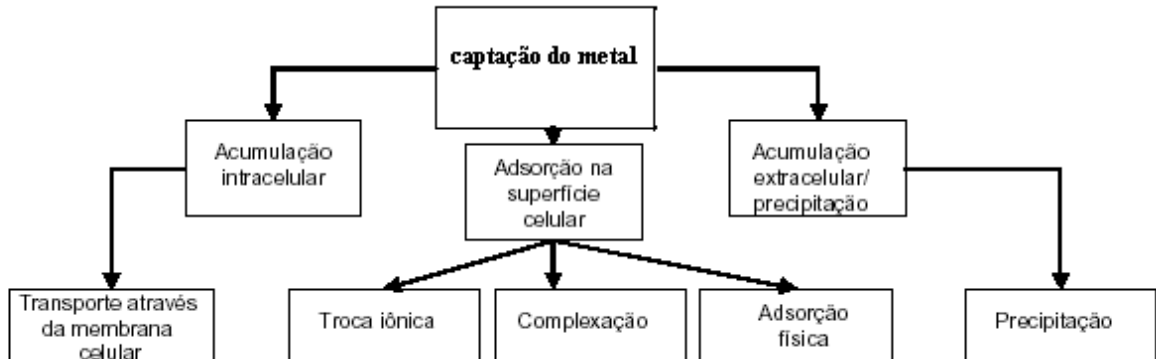


Figura 5: Mecanismo de acumulação de metal de acordo com o sítio onde o metal é removido. Fonte: adaptação Veglió e Beolchini (1997).

Quando há dependência do metabolismo celular a captação envolve o transporte ativo de metais através do envoltório celular para o interior da célula. Do contrário, os metais são capturados na superfície do micro-organismo (VEGLIÓ e BEOLCHINI 1997).

De acordo com o sítio onde o metal é captado, a captação pode ser classificada como um processo de acumulação extracelular, sorção na superfície da célula acompanhada de precipitação e acumulação intracelular. Este último processo depende do metabolismo da

célula e normalmente está associada com o sistema de defesa de micro-organismos, os quais reagem na presença de metais tóxicos (VEGLIÓ e BEOLCHINI 1997).

Já para o caso de ocorrerem interações entre o metal e os grupos funcionais presentes na superfície celular, baseadas em fenômenos físico-químicos (adsorção química, troca iônica e complexação), tem-se uma sorção na superfície da célula onde às vezes não depende do metabolismo (biossorção com células mortas, por exemplo). O fenômeno físico-químico na captação metálica é um mecanismo não dependente do metabolismo celular, que é relativamente rápido e pode ser reversível. Quando ocorre a precipitação, a classificação não é única, a precipitação do metal pode ocorrer na solução ou na superfície celular (VEGLIÓ e BEOLCHINI 1997).

Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação de metais pelos micro-organismos são pouco conhecidos. Uma das suposições seria a de que esses elementos podem ser captados pelos sistemas de transporte de metais essenciais para o desenvolvimento microbiano (GADD, 1988). Uma vez dentro da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou podem estar ligados a proteínas, deslocando os íons adequados de suas posições, prejudicando as funções metabólicas (GADD, 1992b).

Os micro-organismos, na presença do metal tóxico, podem produzir compostos que favorecem a precipitação das espécies metálicas o qual se converte num mecanismo dependente, além disso, a precipitação pode acontecer pela interação do metal com algum grupo funcional presente na superfície celular (VEGLIÓ e BEOLCHINI 1997).

2.3 Toxicidade e Bioacumulação de cobre em microalgas e cianobactérias

A toxicidade e a bioacumulação do cobre para microalgas e cianobactérias já foram estudadas por vários autores. Foram usadas diferentes condições de cultivo, faixas de concentrações do metal e avaliação de parâmetros distintos. Dessa forma, cada autor evidencia conclusões variadas. A seguir, na Tabela 1 é apresentado um resumo desses trabalhos, onde foi avaliado o efeito do cobre sobre esses micro-organismos.

Tabela1 : Toxicidade e bioacumulação de cobre em microalgas e cianobactérias.

Organismo	Metal	Observações	Referência
<i>Nostoc calcicola</i>	Cobre	- duas etapas de captação do metal: parede celular e captação intracelular	Verma e Singh (1990)
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Cobre	- duas etapas de captação: adsorção reversível rápida e intracelular lenta e irreversível;	Knauer et al. (1997)
<i>Scenedesmus obliquus, Chlorella pyrenoidosa, Closterium lunula</i>	Cobre	- <i>C. lunula</i> é mais tolerante e <i>Scenedesmus obliquus</i> é a mais sensível; - baixa bioacumulação do cobre inversamente proporcional alta tolerância do micro-organismo.	Yan e Pan (2002)
<i>Tetraselmis chui</i>	Cobre	- Não foi observado inibição do crescimento pela adição de Cu (II) no meio de cultura; - maior bioacumulação ocorreu nas concentrações mais elevadas de cobre.	Yilmaz et al. (2005)
<i>Minutocellus polymorphus, Dunaliella tertiolecta, Phaeodactylum tricornutum, Micromonas pusilla, Tetraselmis sp., Heterocapsa niei, Isocrysis sp., Gephyrocapsa oceanica, Emiliana huxleyi.</i>	Cobre	- <i>M. polymorphus</i> mais sensível ao cobre e <i>D. tertiolecta</i> mais tolerante; - diferença na sensibilidade dos micro-organismos ao cobre tanto pela diferença na captação através da membrana plasmática, por mecanismos de ligações internas e/ou mecanismos de detoxificação .	Levy et al. (2007)
<i>Phaeodactylum tricornutum, Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis sp.</i>	Cobre	- <i>Phaeodactylum tricornutum</i> foi a espécie mais sensível e <i>Dunaliella tertiolecta</i> foi a mais tolerante; - A maior tolerância ao cobre de <i>D. Tertiolecta</i> pode ser por mecanismo de exclusão efetiva do metal da célula.	Levy et al. (2008)

Tabela 1 : Continuação

Organismo	Metal	Observações	Referência
<i>Tetraselmis chui</i> , <i>Rhodomonas salina</i> , <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nanochloropsis gaditana</i>	Cobre e Chumbo	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Tetraselmis chui</i> mais tolerante e <i>R. salina</i> a mais sensível; - <i>T. chui</i> acumulou alta concentração embora <i>R. salina</i> tenha acumulado a mais alta concentração de cobre; - sem relação específica entre a tolerância da célula e metal acumulado; - interação do metal com a superfície celular, pode revelar os mecanismos de internalização do metal e a toxicidade 	Debelius et al. (2009)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> , <i>Chlorella kessleri</i>	Cobre	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilidade e mecanismos de proteção diferentes; - polissacarídeos complexos da parede celular de <i>S. vacuolatus</i> foram uma barreira eficiente para evitar que o metal entrasse no citoplasma ; - clorofila-a/clorofila-b mais afetadas - tamanho e volume celular, capacidade de internalização do cobre, e diferenças na composição da parede celular, podem explicar as diferenças de tolerância ao metal. 	Sabatini et al. (2009)

A seguir serão comentados de forma mais detalhada os trabalhos apresentados na Tabela 1.

Experimentos de captação de cobre ao longo do tempo pela cianobactéria *Nostoc calcicola* demonstraram que a remoção do cobre ocorre em duas etapas (VERMA e SINGH, 1990). A primeira fase envolveu uma rápida ligação/captação dos cátions metálicos pela parede celular seguida por uma segunda fase de captação intracelular dependente do metabolismo. A comparação entre as duas fases sugeriu que os níveis de metal que entram na célula por processos metabólicos dependentes de energia são muito maiores do que ligações dos cátions metálicos com a superfície celular ou mecanismos passivos.

A adsorção e captação de cobre pela microalga verde *Scenedesmus subspicatus* (KNAUER *et al.*, 1997) apresentou o mesmo comportamento observado com a cianobactéria *Nostoc calcicola* (VERMA e SINGH, 1990), onde a captação de cobre pelo micro-organismo consistiu em duas fases. Verificou-se que para *Scenedesmus subspicatus* uma fase rápida de adsorção seguida por uma captação intracelular ativa e lenta. O primeiro passo foi reversível e compreendeu os mecanismos de adsorção, troca iônica, coordenação, complexação, quelação e microprecipitação. Na segunda etapa, geralmente irreversível, podem ocorrer alguns mecanismos como: precipitação superficial, reações redox, ou mais comumente, a difusão para o interior da célula e ligações com proteínas e outros sítios intracelulares.

Estudos feitos sobre o efeito da toxicidade e bioacumulação de cobre foram realizados com três espécies de microalgas: *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Closterium lunula* (YAN e PAN, 2002). As concentrações de metal utilizadas estiveram compreendidas entre 0 e 200 µg/L. A *Scenedesmus obliquus* foi a espécie mais sensível ao metal enquanto *Closterium lunula* foi a mais tolerante. Verificou-se que a baixa bioacumulação inicial de *C. lunula* explica sua maior tolerância ao metal, sendo a bioacumulação de cobre proporcional à concentração inicial. Por outro lado, para qualquer uma das microalgas, verificou-se que quanto maior foi a concentração inicial de cobre, menor foi a concentração de microalgas que se obteve ao fim do experimento.

A bioacumulação e toxicidade do cobre à microalga *Tetraselmis chuii* foram pesquisadas por Yilmaz *et al.* (2005). As culturas foram divididas em cinco grupos distintos e expostas a concentrações de cobre que foram 0,23 mg/L, 0,32 mg/L, 0,64 mg/L, 0,96 mg/L e 1,28 mg/L. No fim do estudo, não verificou-se a inibição do crescimento da microalga na

presença do Cu (II) no meio de cultura a essas concentrações. A relação de crescimento do micro-organismo foi similar para todas as concentrações de metal, embora fossem diferentes a quantidade de cobre acumulado e o fator de bioconcentração. Verificou-se que o acúmulo de cobre pela microalga nas concentrações de 0,96 mg/L e 1,28 mg/L foi maior que nas concentrações mais baixas.

Já no trabalho de Levy *et al.* (2007) foi estudada a relação entre a ultra-estrutura da parede celular e o tamanho da célula na adsorção e toxicidade do cobre em onze algas de diferentes grupos taxonômicos. A concentração de cobre que afetou o crescimento das espécies em 50% variou de 0,6 µg/L para *Minutocellus polymorphus* e 530 µg/L para a clorófito *Dunaliella tertiolecta*. As diferenças de sensibilidade ao cobre não tem relação com o tamanho celular, tipo da parede ou o grupo taxonômico das espécies microalgais, podendo ser atribuídas à captação do metal através da membrana plasmática, mecanismos de ligações internas e ou através dos mecanismos de detoxificação de cada uma das espécies de algas.

Em outro estudo de Levy *et al.* (2008) foi investigado a adsorção e a internalização do cobre em três microalgas marinhas com diferentes sensibilidades ao cobre (EC50 72h que é a concentração de cobre que inibe a relação de crescimento em 50% em 72 horas) a saber: *Phaeodactylum tricornutum* (EC50 72h = 8,0 µg/L); *Tetraselmis* sp. (EC50 72h = 47 µg/L) e *Dunaliella tertiolecta* (EC50 72h = 530 µg/L). Nessas concentrações, *Tetraselmis* sp. teve concentração intracelular de cobre muito mais alta que *Phaeodactylum tricornutum* e *Dunaliella tertiolecta* sugerindo que a microalga *Tetraselmis* sp. detoxifica cobre dentro da célula. Quando a concentração externa de cobre é a mesma (50 µg/L) para todas as microalgas, *Dunaliella tertiolecta* parece excluir melhor o cobre do que *Tetraselmis* sp. Os resultados mostraram que a sensibilidade das microalgas ao cobre provavelmente dependa fortemente de mecanismos de detoxificação na célula.

Debelius *et al.* (2009) estudaram a toxicidade e a bioacumulação de cobre e chumbo em cinco microalgas marinhas: *Tetraselmis chuii*, *Rhodomonas salina*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis gaditana*. Testes que avaliaram a concentração de metal que inibe o crescimento em 50% (EC50) das microalgas foram feitos com concentrações de 0 a 600 µg/L de cobre e de 0 a 6000 µg/L para o chumbo. Para ambos os metais, os resultados do testes mostraram que *Tetraselmis chuii* foi a microalga mais tolerante (EC50_{cobre} = 330 µg/L) e *Rhodomonas salina* a mais sensível (EC50_{cobre} = 50 µg/L). Foram também avaliadas as concentrações de metal em solução e as quantidades de metal acumulado

na/ou pela célula. *T chuii* que foi a espécie mais tolerante, acumulou alta concentração de cobre e *R salina* a espécie mais sensível, acumulou a mais alta quantidade de metal. Resultados mostraram que não houve relação específica entre a tolerância da célula ao metal e a quantidade de metal acumulado na/ou pela célula ou ainda com tamanho celular, classe taxonômica e com a capacidade de sorção da célula.

Sabatini *et al.* (2009) avaliaram o “stress” oxidativo e as defesas antioxidantes de duas microalgas verdes expostas ao cobre. O objetivo do trabalho foi medir os efeitos da exposição de cobre ao longo de uma semana pelas microalgas *Scenedesmus vacuolatus* e *Chlorella kessleri* nas concentrações de 0,39 mg/L, 6,8 mg/L, 13,3 mg/L e 26,2 mg/L do metal no meio. As espécies mostraram diferença na sensibilidade ao cobre. Para *Scenedesmus vacuolatus* o aumento na concentração de cobre no meio altera significativamente parâmetros metabólicos (clorofila, atividade enzimática, quantidade de lipídeos e quantidade de proteínas) a partir das concentrações mais baixas. Já para *Chlorella kessleri* não houve mudança significativa nos parâmetros para as concentrações de 0,39 mg/L e 6,8 mg/L sendo, as duas variáveis mais sensíveis a exposição ao cobre foram a relação de clorofila a/ clorofila b e a atividade da enzima catalase, mesmo quando uma diminuição do crescimento celular não foi verificada. O aumento na concentração de cobre no meio de cultura foi seguido por um significativo aumento no total de cobre em *S. vacuolatus*, enquanto que em *C. kessleri* não mostrou diferença de acúmulo do metal nas concentrações de 0,39 mg/L e 6,8 mg/L. Em *S. vacuolatus*, a proporção de cobre intracelular diminuiu com o aumento na concentração de cobre no meio de cultura. A diferença na capacidade em acumular cobre extra e intracelular por *S. vacuolatus* e *C. kessleri* indica que essas espécies têm mecanismos diferentes de proteção contra a exposição ao metal. Uma possibilidade é que polissacarídeos complexos da parede celular de *S. vacuolatus* foram uma barreira eficiente e evitaram que o metal entrasse no citoplasma, resultando assim em uma baixa acumulação intracelular. Supôs-se também que a diferença da tolerância ao cobre pelas espécies pode ser explicada pela diferença no tamanho e volume celular, na diferença da capacidade de internalização do cobre pela microalga, assim como as diferenças na composição da parede celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram quatro espécies fotoautotróficas selecionadas entre os Domínios *Bacteria* e *Eukarya*: duas cianobactérias e duas clorófitas respectivamente. As cepas dos micro-organismos foram cedidas pelo banco de algas do laboratório de toxicologia de cianobactérias do departamento de biofísica CCS/ UFRJ. Os fatores que determinaram a escolha dessas cepas para este estudo foram a facilidade de cultivo em laboratório, a rapidez de crescimento, a não toxicidade, e a busca por duas cepas de micro-organismos unicelulares (Figura 6 e 7) e duas cepas de morfologia filamentosa (Figura 8 e 9). O Quadro 1 apresenta a classificação dos micro-organismos.



Figura 6: Fotomicrografia de *Monoraphidium* sp. (microscópio ótico, aumento de 400x).



Figura 7: Fotomicrografia de *Scenedesmus* sp. (microscópio ótico, aumento de 1000 x).



Figura 8: Fotomicrografia de *Anabaena* sp. (microscópio ótico, aumento de 1000 x).



Figura 9: Fotomicrografia de *Oscillatoria* sp. (microscópio ótico, aumento de 400 x).

Quadro 1 : Classificação dos Micro-organismos.

	<i>Monorraphidium sp.</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Anabaena sp.</i>	<i>Oscillatoria sp.</i>
Dominio	<i>Eukarya</i>	<i>Eukarya</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlorophyta</i>	<i>Cyanophyta</i>	<i>Cyanophyta</i>
Classe	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Cyanophyceae</i>	<i>Cyanophyceae</i>
Ordem	<i>Chlorococcales</i>	<i>Chlorococcales</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Oscillatoriales</i>
Familia	<i>Oocystaceae</i>	<i>Scenedesmaceae</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>
Gênero	<i>Monorraphidium</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Oscillatoria</i>

3.2 Cultivo e manutenção das culturas

As cepas doadas foram inoculadas separadamente em frascos erlenmeyer de 200 mL, contendo 100 mL de meio de cultura ASM-1 (Gorhan *et al*, 1964) sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. (Tabela 2). Previamente, foi feito o ajuste do pH do meio (pH= 8,0 ideal) (medido em medidor de pH da marca Quimis Modelo Q 400/m11.). Os frascos com as culturas foram vedados com tampão de algodão para permitir as trocas gasosas e então esterilizados (em autoclave a 121°C durante 20 minutos). Com o objetivo de complementar as necessidades nutricionais das microalgas verdes (clorofíceas), uma solução de micronutrientes (Tabela 3) foi adicionada ao meio ASM-1 esterilizado.

Os cultivos das microalgas foram mantidos em câmara de germinação da marca Fanem modelo 347-CDG, sob condições controladas de luz (ciclo claro-escuro de 12h em 12h iluminado por quatro lâmpadas fluorescentes 20 W L.D cada) e temperatura de 23 °C.

A manutenção das culturas dos micro-organismos para a utilização nos experimentos foi feita através de subculturas sucessivas. Este procedimento consiste em transferir em ambiente estéril a cada sete dias alíquotas de 10 mL de inóculo usando pipetas estéreis para 100 mL de meio ASM-1 recém preparado. Essas subculturas visam fornecer os nutrientes necessários para o contínuo crescimento dos micro-organismos.

Tabela 2: Meio de cultura ASM-1 usado na manutenção das cianobactérias e microalgas verdes (Gorham *et al*,1964).

Obs: O pH =8,0 é o pH ideal do meio.

	Peso (g)	Observações
Solução estoque A		
NaNO ₃	1,70	Completar o volume para 200mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
Solução estoque B		
K ₂ HPO ₄ ou	0,87	Completar o volume para 100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,14	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou	1,78	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,33	
Solução estoque C		
H ₃ BO ₃	2,48	Completar o volume para 100 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
ZnCl ₂	0,335	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
CuCl ₂	0,0014	
Solução estoque D		
Na ₂ .EDTA	1,86	Completar o volume para 100 mL
Para Cada litro de ASM-1:		
Estoque A = 20,0 mL; Estoque B = 2,0 mL; Estoque C = 0,1 mL; Estoque D = 0,4 mL		
Completar para 1000 mL. Ajustar o pH para 8,0 (pH ideal)		

Tabela 3: Suplementação do meio nutricional ASM-1

Vitaminas	Concentração	Observação
Tiamina HCl	0,1 mg/L	Fazer solução estoque (1L) 1000x mais concentrada e usar 1 mL/L de meio
Biotina	0,5µg/L	
B ₁₂	0,5µg/L	

3.3 Quantificação dos micro-organismos

Para a quantificação da biomassa presente num determinado volume, foram utilizados dois métodos distintos: contagem por microscopia direta e o método do peso seco.

O método da contagem direta foi utilizado para medir a densidade celular das clorofíceas em indivíduos por volume (n° indivíduos /mL) e o peso seco foi a forma de quantificar as células filamentosas das cianofíceas em massa por volume (mg/L).

3.3.1 Contagem direta

O crescimento populacional das clorofíceas pode ser medido por meio de contagem de número de células numa alíquota da cultura empregando o microscópio óptico Axioskop 40 da marca Zeiss e uma câmara especial de contagem *Fuchs-Rosenthal* (Figura 10). Essa câmara corresponde à uma lâmina de vidro que apresenta uma grade quadriculada (*grid*) (Figura 11), onde os quadrados têm área conhecida e dimensões exatas: profundidade de 0,2 mm, área superficial do menor quadrado de $0,0625 \text{ mm}^2$ e concentração mínima de células de

10^3 células. As células que devem ser contadas são aquelas que estão dentro dos quadrados menores e aquelas que estão sobre as linhas triplas do lado superior e lado esquerdo.

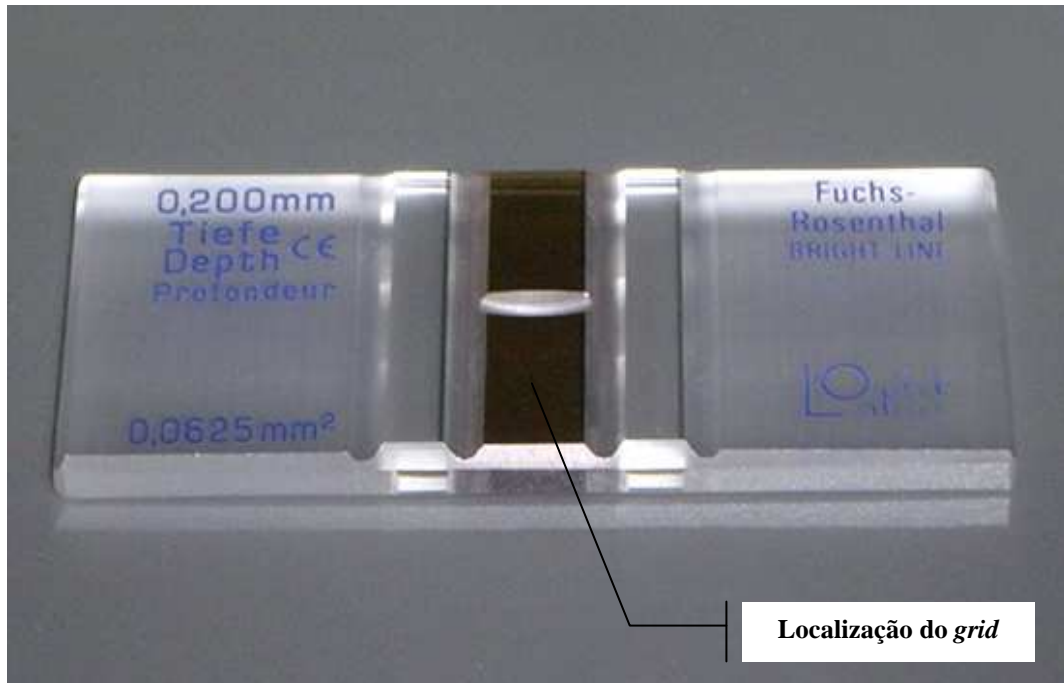


Figura 10: Câmara *Fuchs-Rosenthal*.

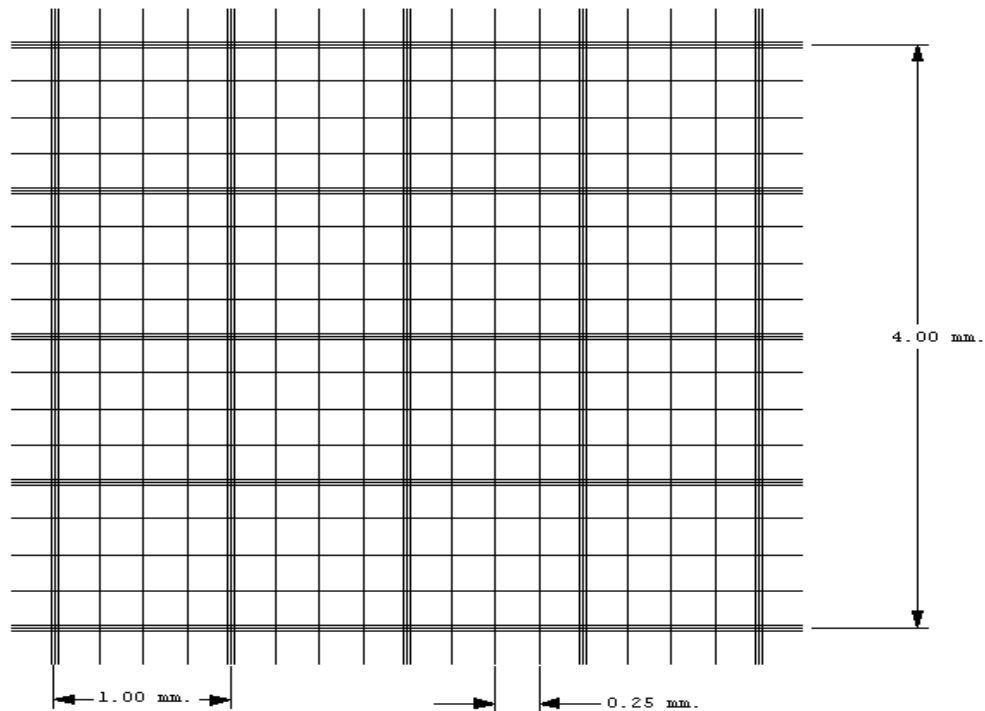


Figura 11: Divisões da câmara *Fuchcs-Rosenthal*.

Cada quadrado do *grid* comporta um volume muito pequeno, precisamente mensurado e conhecido. Cada lado da câmara possui 16 quadras grandes, medindo 1×1 mm, de um volume total de $0,2 \mu\text{L}$. Essas quadras grandes estão delimitadas por linhas triplas e cada área é subdividida em 16 quadrados. Colocou-se uma gota de amostra sob o reticulado da câmara utilizando pipeta Pasteur estéril, e os micro-organismos que se encontram dentro ou sob as 16 quadrículas que formam uma das diagonais desta câmara foram contados (Figura 12). A ampliação usada foi a de 200 vezes. O número mínimo de células contadas na diagonal deve ser igual ou maior que 200. Caso o número de células na diagonal seja inferior a 200, conta-se outra diagonal. Se ainda assim o número de células for inferior, continua-se a contagem de outras fileiras (verticais ou horizontais). Algumas vezes, foi necessário diluir a suspensão para possibilitar a contagem das células. O cálculo da densidade celular das microalgas verdes foi feito conforme especificado na Tabela 4. Lembrando que o resultado deve ser multiplicado obrigatoriamente pelo fator de diluição para determinação da densidade.

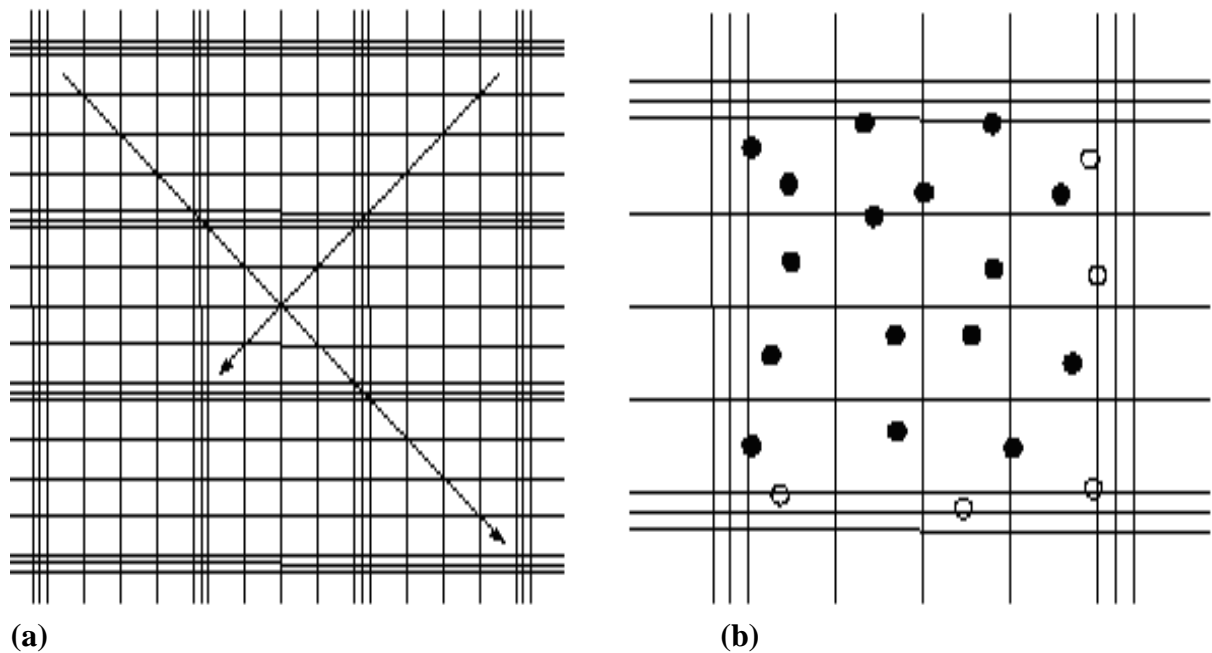


Figura 12: Direção da contagem dos micro-organismos na câmara *Fuchs-Rosenthal* (a) e representação de células dentro dos quadrados (b) onde aos círculos claros representam células que não são contadas.

Tabela 4: Conversão de número de células em densidade celular, A = quadra maior, □ = menor quadrado e núm = células contadas.

Área contada	Número.de elementos .mL ⁻¹
1/16 de A	Núm X 8000 X10
1/8 de A	Núm X 4000 X 10
1/4 de A (4□)	Núm X 2000 X 10
1/2 de A (8□)	Núm X 1000 X 10
1A (16□)	Núm X 500 X 10
2A (32□)	Núm X 250 X 10
4A (64□)	Núm X 125 X 10
8A (128□)	Núm X 62,5 X 10
16A (256□)	Núm X 31,25 X 10

Fonte: UFRJ¹

3.3.2 Peso seco

O método do peso seco consistiu em pesar previamente os cadinhos de volume de 20 mL vazios (em balança analítica Bioprecisa modelo FA2104N) após secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Em seguida, adicionar nos cadinhos vazios o material que foi previamente centrifugado (50 mL de cultivo) em centrífuga Fanem modelo 208N durante 1 minuto na velocidade máxima e lavado com água destilada, secar em estufa a 105 °C até o peso constante. A quantidade de biomassa determinada pela diferença entre o peso do cadinho contendo a bioamassa e o peso do cadinho vazio é a massa do micro-organismo.

¹ O procedimento de contagem de células adotado para este trabalho é o mesmo usado como padrão no laboratório de toxicologia de cianobactérias do departamento de biofísica CCS/UFRJ.

3.4 Ensaios de Toxicidade e Bioacumulação

3.4.1 Metal

Uma solução estoque de cobre (II) em torno de 1000 mg/L (1088,4 mg/L) foi preparada, usando-se $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e água ultrapurificada. Esta solução foi diluída para o preparo das soluções adicionadas ao meio de cultura (Tabela 5). O meio ASM_1 contaminado com metal foi ajustado para $\text{pH}=6,0$ usando solução 1mol/L de NaOH, uma vez que em $\text{pH}=8,0$ o metal precipita na forma de hidróxido de cobre (II) comprometendo estudos de toxicidade e bioacumulação.

Observação: No caso do das soluções de metais para os ensaios, houve diferença na concentração dos estoques para cada micro-organismo devido à preparação ter ocorrido ao longo dos experimentos.

No caso do presente estudo, usou-se como bioacumulação, o processo de acúmulo ou captação do metal em condições de crescimento celular (metal no meio de cultura).

Tabela 5: Concentrações de Cu^{++} no meio ASM-1 para cada micro-organismo

	Concentrações de Cu (II) no meio de cultura			
<i>Monorraphidium sp.</i>	0,7 mg/L	1,2 mg/L	4,4 mg/L	8,9 mg/L
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,7 mg/L	1,2 mg/L	4,4 mg/L	8,9 mg/L
<i>Oscillatoria sp.</i>	0,6 mg/L	0,9 mg/L	4,6 mg/L	12,0 mg/L
<i>Anabaena sp.</i>	1,4 mg/L	1,8 mg/L	4,1 mg/L	8,8 mg/L

3.4.2 Clorofíceas

Para cada concentração de cobre foram inoculados em meio estéril 15 mL de micro-organismos em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio contaminado com o metal. Também foram inoculados 15 mL de microalgas em 200 mL de meio ASM-1 isento de cobre (pH= 8,0) em 200 mL de meio ASM-1 isento de cobre a pH= 6,0, objetivando ter-se um controle do teste e um controle da especiação do metal, respectivamente.

O crescimento da população de micro-organismos foi monitorado pela contagem de células ao longo de vinte e oito dias. Esse período abrange todas as fases do crescimento microbiano para as espécies selecionadas. A partir do dia da inoculação, foram feitas contagens sistemáticas ao longo do tempo das culturas preparadas para o experimento. As culturas do meio ASM-1 em pH= 8,0 e do meio ASM-1 a pH= 6,0 serviram como parâmetro de referência para a avaliação da toxicidade do cobre sobre as microalgas.

As determinações das concentrações de Cu (II) inicial e em cada fase do estudo foram realizadas em equipamento de espectrometria de absorção atômica (Perkin Elmer, AAnalyst 300). Para os testes de bioacumulação e toxicidade, foram coletadas amostras de 5 mL das culturas do experimento contaminadas com o metal, filtradas em membrana milipore de 0,45 μ m de porosidade e enviado o sobrenadante para as análises. Foram monitoradas as concentrações ao longo dos vinte e oito dias alternando-se as coletas a partir da adição instantânea do inóculo até a interrupção do experimento.

3.4.3 Cianofíceas

Para cada uma das quatro contaminações de cobre no meio ASM-1, foram inoculados 5 mL de cultivo em 10 frascos erlenmeyer de 200 mL contendo 50 mL de meio estéril contaminado com o metal. Também foram inoculados 5 mL das cianobactérias em 10 frascos erlenmeyer de 200 mL contendo 50 mL de meio ASM-1 isento de cobre a pH= 8,0 e meio ASM-1 isento de cobre a pH= 6,0. No total foram utilizados 60 frascos erlenmeyer com as culturas para o experimento e o crescimento foi monitorado ao longo durante

aproximadamente 28 dias utilizando o método do peso seco. A partir do dia da inoculação, foram separados um frasco erlenmeyer de cada cultura para determinar o peso sendo que as culturas do meio ASM-1 e do meio ASM-1 a pH= 6,0 serviram como parâmetro para a avaliação da toxicidade do cobre sobre as cianobactérias.

As medidas de concentração de cobre em solução foram feitas de forma análoga às realizadas nos testes com as microalgas. Para os testes ao longo do tempo, foi utilizado o sobrenadante das amostras que foram centrifugadas para a utilização no peso seco, onde foram filtradas em membrana milipore 0,45 μ m de porosidade e enviadas para as análises. Foram monitoradas as concentrações durante os vinte e oito dias alternando-se as coletas a partir da adição instantânea do inóculo até a interrupção do experimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cianobactérias

4.1.1 *Anabaena* sp.

A avaliação da toxicidade e da bioacumulação do Cu (II) pela *Anabaena* sp. encontra-se representada pelos estudos do crescimento e da concentração de cobre residual em solução após o processo. O crescimento da cianobactéria *Anabaena* sp. é apresentado na Figura 13

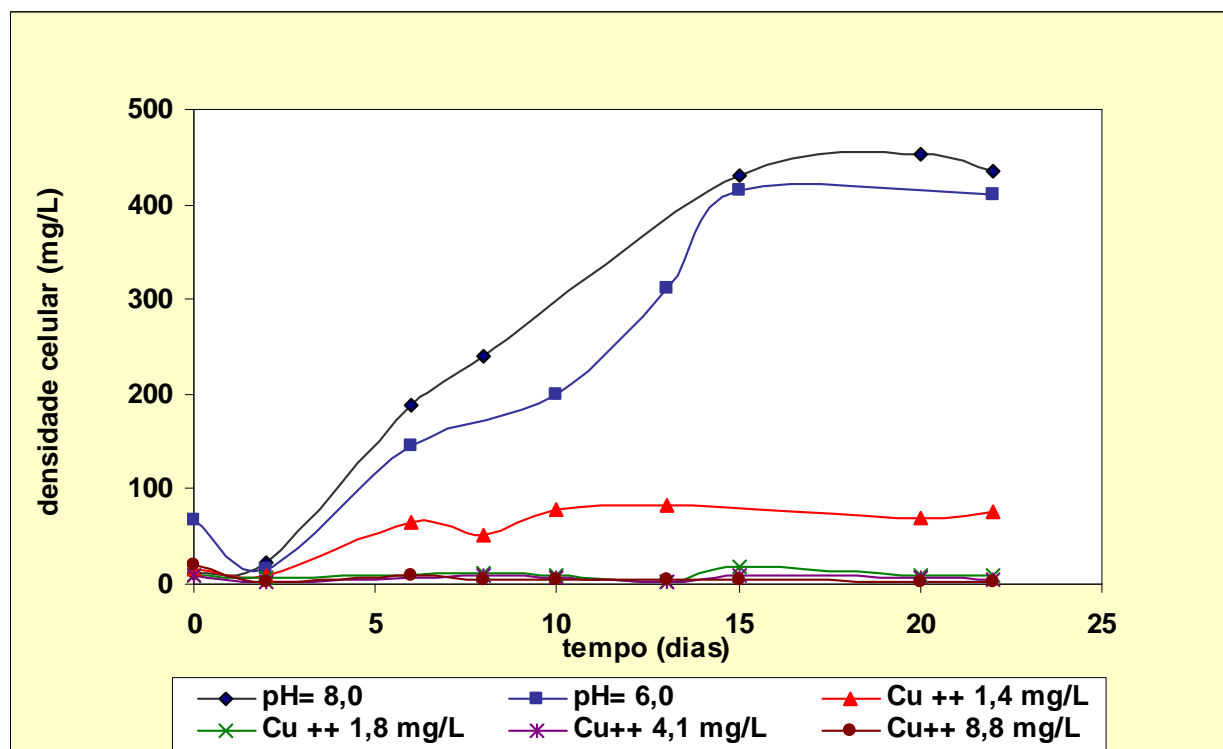


Figura 13: Crescimento da *Anabaena* sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH =6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 1,4 mg/L, 1,8 mg/L, 4,1 mg/L e 8,8 mg/L (o dia 0 do experimento corresponde ao dia da inoculação da cultura microbiana no meio).

De acordo com a Figura 13, o crescimento da cianobactéria *Anabaena* sp. em meio isento de metal no pH= 8,0 atingiu o máximo de biomassa produzida quando comparado com o crescimento em meio em pH= 6,0 e meio contaminado com o metal. A densidade celular correspondente foi de 452 mg/mL no vigésimo dia.

No meio em pH= 6,0 sem a contaminação do metal, que foi considerado neste trabalho como o pH padrão, a maior densidade celular alcançada no fim do experimento foi de 414 mg/mL. Isto significou uma pequena redução de 8,4% do total de células comparada com o meio em pH =8,0. Este pH de referência foi testado para que houvesse compatibilidade entre o crescimento celular e a manutenção do cobre na forma iônica. Cabe ressaltar que não apenas na concentração máxima, mas em todas as medidas de concentração celular ao longo do experimento, o pH= 8,0 favoreceu o crescimento microbiano. No pH= 6,0 todas as concentrações celulares estiveram abaixo daquelas cultivadas em pH ideal (pH =8,0) embora o crescimento não tenha sido comprometido.

Na presença de 1,4 mg/L de cobre, a densidade celular da *Anabaena* sp. atingiu um máximo de 76 mg/mL, resultando numa diminuição de 81,4 % do crescimento comparado com o padrão (meio ASM-1 a pH= 6,0). Nas concentrações de 1,8 mg/L, 4,1 mg/L e 8,8 mg/L do cobre iônico podemos afirmar que o micro-organismo não se desenvolveu. O gráfico mostra que desde a inoculação até o fim do experimento, a concentração de micro-organismo permaneceu constante (9 mg/L de biomassa para a concentração de cobre igual a 1,8 mg/L, 6,5 mg/L para a concentração de 4,1 mg/L e 5,5 mg/L para a concentração de cobre de 8,8 mg/L).

O crescimento da *Anabaena* sp. começa a ser mais efetivo a partir do segundo ponto para os cultivos sem metal, onde deu-se o início da fase exponencial do crescimento microbiano. Neste dia, a densidade celular atingiu 188 mg/mL (meio ASM-1 sem contaminação do metal em pH= 8,0) e 146 mg/mL (meio ASM-1 sem cobre e pH= 6,0), acarretando uma redução de massa de 22,3% na fase exponencial do crescimento comparado com o meio em pH ideal (pH=8,0).

Em meios contaminados com cobre, não se observou a presença de fase exponencial do crescimento, sendo este pouco pronunciado no início do cultivo. Somente a partir do sexto dia de cultivo se observa uma concentração celular quantificável, particularmente no meio contaminado com cobre na concentração de 1,4 mg/L. Para as demais concentrações de cobre

no meio, o crescimento do micro-organismo foi desprezível. Isso indica que o cobre afetou o crescimento microbiano desde as fases iniciais do desenvolvimento celular.

As concentrações de cobre (II) no meio ASM-1 ao longo do experimento de bioacumulação de cobre pela *Anabaena* sp. são apresentadas na Figura 14.

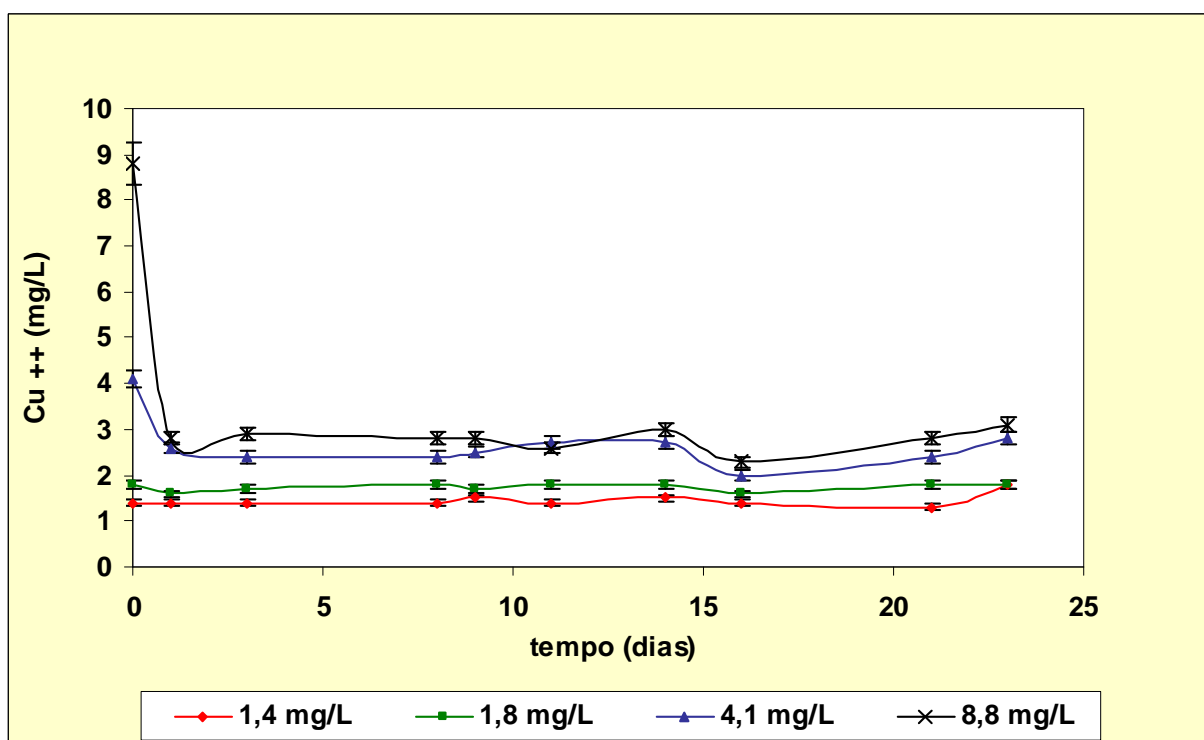


Figura 14: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento com a *Anabaena* sp. nas concentrações iniciais do metal de 1,4 mg/L, 1,8 mg/L, 4,1 mg/L e 8,8 mg/L (o ponto 0 corresponde à concentração de cobre antes da adição do micro-organismo)².

A observação da Figura 14 mostra que para as concentrações iniciais de cobre no meio de 1,4 mg/L e 1,8 mg/L a *Anabaena* sp. não captou metal, uma vez que a quantidade de cobre no meio de cultura permaneceu constante ao longo de todo o experimento. Nos valores de 4,1 mg/L e 8,8 mg/L de cobre no meio, ocorreram mudanças na concentração do metal já no início do ensaio. Quando a concentração inicial de cobre foi de 4,1 mg/L, houve uma redução de 36,6% no primeiro dia, atingindo 2,6 mg/L de Cu (II) e na concentração inicial de 8,8

² A diferença entre a quantidade inicial e a quantidade final de cobre no meio revela a bioacumulação de metal pelos micro-organismos.

mg/L, a redução da concentração foi de 68,2 % no primeiro dia, chegando a 2,8 mg/L de cobre.

Ao final do experimento, as concentrações de cobre no meio atingiram seus valores de concentração de equilíbrio. Para a concentração inicial de 4,1 mg/L, a concentração final do meio foi de 2,8 mg/L, apresentando uma redução de 31,7% e acúmulo de 0,065 mg (50 mL de cultivo). Para a concentração inicial de 8,8 mg/L de metal, a concentração de equilíbrio foi atingida em 3,1 mg/L com redução de 64,7% da concentração inicial e acúmulo de 0,285 mg de cobre.

Quando se compara o crescimento celular (Figura 13) e a bioacumulação (Figura 14), percebe-se que quanto mais cobre foi adicionado ao meio, mais o crescimento da *Anabaena* sp. foi afetado. Quanto maior foram as concentrações do cobre no meio, mais elevada foi a bioacumulação do metal pelo micro-organismo. Para a concentração inicial de 1,4 mg/L de metal, houve a redução de 81,4% do crescimento comparado com o ideal e o micro-organismo não captou cobre do meio de cultura ao longo de todo o experimento.

Os resultados de concentração celular do micro-organismo (Figura 13) mostram que para o valor de concentração inicial de Cu (II) no meio de 1,8 mg/L, o crescimento da *Anabaena* sp. foi totalmente inibido e os resultados de bioacumulação (Figura 14) revelam que para essa concentração do metal, o micro-organismo não acumulou quantidade de cobre significativa.

Já para as concentrações iniciais de Cu (II) de 4,1 mg/L e 8,8 mg/L, o crescimento celular (Figura 13) foi totalmente inibido, embora o experimento de bioacumulação (Figura 14) mostre valores mais elevados de acúmulo de cobre para a maior concentração inicial do metal no meio (8,8 mg/L). Quando a concentração de Cu (II) foi de 8,8 mg/L, a *Anabaena* acumulou 0,285 mg do metal, enquanto que para a concentração inicial de 4,1 mg/L, o micro-organismo captou 0,065 mg de cobre (50 mL de cultivo).

No estudo de Kiran *et al.* (2008), a bioacumulação de cromo por cinco tipos de cianobactérias foi maior com o aumento da concentração de metal, sendo o potencial de bioacumulação para todas as cianobactérias mais alto para as concentrações de metal mais elevadas. Apesar das diferenças de condições de cultivo, meio, metal, micro-organismos e parâmetros avaliados, o mesmo pode ser comparado com o presente estudo, onde um aumento

na concentração de Cu (II) no meio de cultura aumentou a bioacumulação do metal pela biomassa.

A seguir são apresentadas culturas da cianobactéria *Anabaena* sp., (Figura 15) cultivadas em meio ASM-1 isento de cobre e na presença de concentração tóxica do metal.



Figura 15: Cultivos de *Anabaena* sp. isento de Cu (II) e na presença de concentração do metal.

Para a *Anabaena* sp. a concentração de cobre de 1,8 mg/L já inibiu totalmente o crescimento do micro-organismo (Figura 13). A figura 15 indica que mesmo não se tendo medido a atividade fotossintética, pode-se observar a despigmentação da biomassa. Isto indica que de alguma forma o íon metálico interagiu com a cianobactéria, comprometendo seu metabolismo fotossintético.

4.1.2 *Oscillatoria* sp.

A toxicidade e a bioacumulação do Cu (II) pela *Oscillatoria* sp. encontram-se representadas pelos estudos do crescimento e da quantidade de cobre residual em solução, conforme o efetuado para o gênero *Anabaena* sp.. Na Figura 16 são apresentadas as curvas de crescimento da cianobactéria *Oscillatoria* sp..

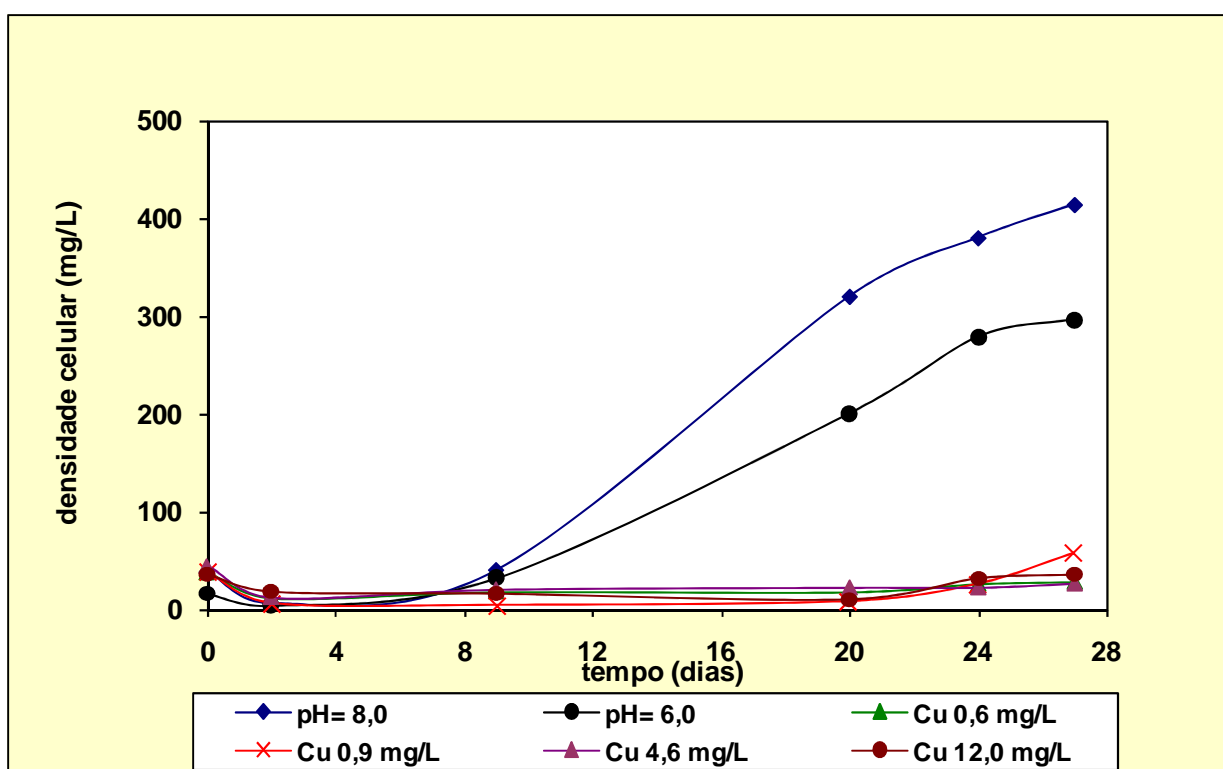


Figura 16: Crescimento da *Oscillatoria* sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH= 6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,6 mg/L, 0,9 mg/L, 4,6 mg/L e 12,0 mg/L (o dia 0 do experimento foi o dia da inoculação da cultura microbiana no meio).

Pelo que pode ser visto na Figura 16, o crescimento da cianobactéria *Oscillatoria* sp. em meio isento de metal no pH= 8,0, atingiu os maiores valores de densidade celular comparada com o crescimento em meio no pH= 6,0 e nos cultivos contaminados com metal. Ao final do experimento a densidade celular máxima para o meio em pH= 8,0 foi de 414 mg/L enquanto que para o meio em pH= 6,0 sem a contaminação de cobre foi de 296 mg/L. A diminuição do pH de 8,0 para o pH padrão (pH= 6,0), resultou numa diminuição de 28,5% no

crescimento. Na Figura 16 pode-se notar que a fase lag de crescimento microbiano se estendeu por mais tempo se comparada com a *Anabaena* sp. (Figura 13).

A diminuição do pH= 8,0 para o pH= 6,0, também ocasionou uma maior redução da biomassa celular comparada com a redução do crescimento da *Anabaena* sp. (para a *Anabaena* sp., a redução da densidade celular máxima foi de 8,4 %, enquanto que para a *Oscillatoria* sp. a redução foi de 28,5 %).

A fase exponencial de crescimento se iniciou aproximadamente no nono dia e a partir desse ponto, o micro-organismo se desenvolveu mais rapidamente, sendo o aumento da densidade celular mais pronunciado, quando na ausência de cobre no meio de cultura.

A contaminação do meio ASM-1 com as concentrações de cobre de 0,6 mg/L, 0,9 mg/L, 4,6 mg/L e 12,0 mg/L inibiram o crescimento celular, verificado pela concentração constante da biomassa ao longo do tempo.

As concentrações de cobre (II) no meio ASM-1, ao longo do tempo de experimento com *Oscillatoria* sp. são apresentadas na Figura 17.

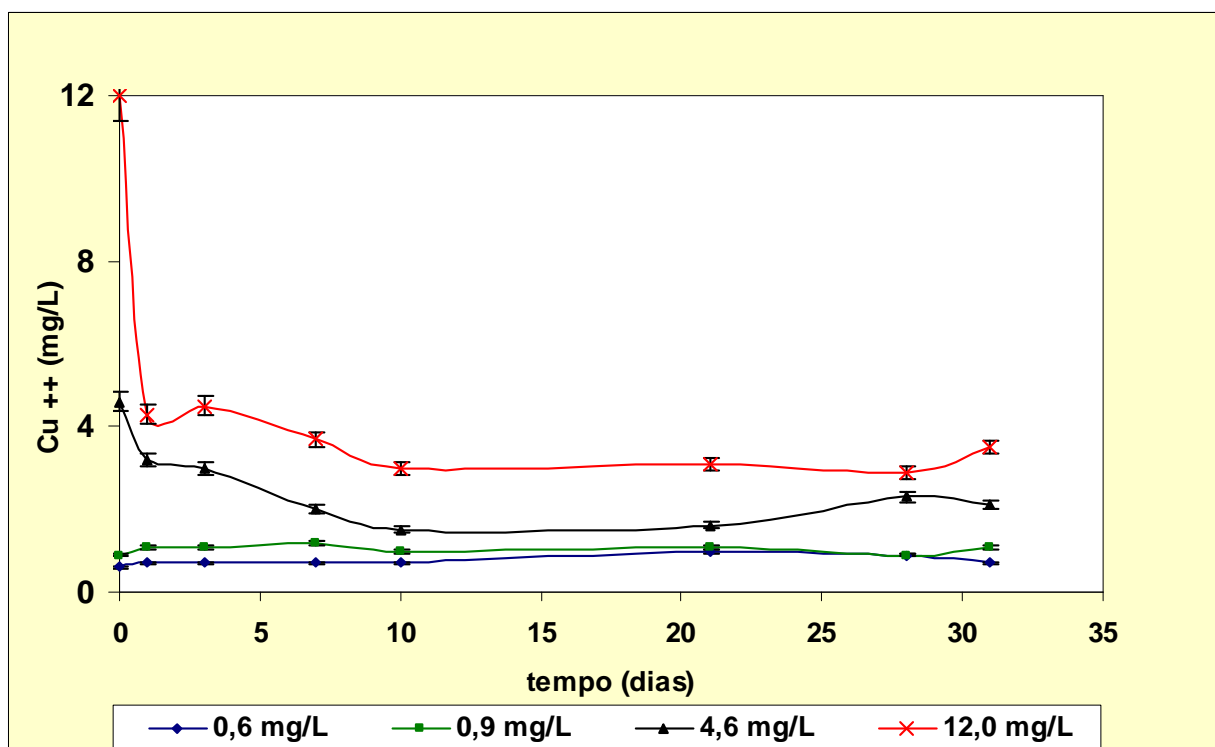


Figura 17: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de *Oscillatoria* sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,6 mg/L; 0,9 mg/L; 4,6 mg/L e 12,0 mg/L (o ponto 0 corresponde à concentração de cobre antes da adição do micro-organismo).

Pela análise da figura, observa-se que para as concentrações iniciais de cobre de 0,6 mg/L e 0,9 mg/L (Figura 17), a *Oscillatoria* sp. não captou o metal, uma vez que os valores de concentração de cobre no meio foram praticamente constantes, permanecendo em torno do valor inicial. Também analisando as concentrações de 4,6 mg/L e 12,0 mg/L de Cu (II) (Figura 17), pode-se visualizar que ocorreu a bioacumulação do metal pelo micro-organismo, particularmente no início do cultivo.

No primeiro dia de experimento, quando o meio foi contaminado com 4,6 mg/L de cobre, houve uma redução de 30,4 % do metal, atingindo uma concentração de 3,2 mg/L e equivalente a 0,07 mg de cobre bioacumulado pela *Oscillatoria* sp. (50 mL de cultivo). Para a concentração inicial de 12,0 mg/L de cobre no meio, no primeiro dia de experimento ocorreu

uma redução de 64,2% do metal até o valor de 4,3 mg/L e a quantidade de cobre acumulado pela cianobactéria foi de 0,385 mg.

No décimo dia de experimento, as concentrações iniciais de 4,6 mg/L e 12,0 mg/L de cobre cessaram de reduzir e atingiram valores de equilíbrio de 2,1 mg/L e 3,5 mg/L, respectivamente. Quando a concentração inicial era de 4,6 mg/L, houve uma redução de 54,3% da quantidade de cobre no meio, significando um acúmulo de 0,125 mg de metal. Já para o valor inicial de 12,0 mg/L de metal no meio, a concentração do equilíbrio teve uma redução de 70,8% do total inicial de cobre e o acúmulo de total de cobre para essa concentração foi de 0,425 mg.

Ao examinar em conjunto a densidade celular (Figura 16) e a bioacumulação de Cu (II) (Figura 17) verifica-se que para a adição de cobre no meio, a bioacumulação só ocorreu para as concentrações iniciais de 4,6 mg/L e 12,0 mg/L apesar do crescimento ter sido completamente inibido. Para as menores concentrações iniciais de cobre (0,6 mg/L e 0,9 mg/L), não houve crescimento ou alteração significativa na presença do metal no meio, ou seja, a *Oscillatoria* sp. não acumulou cobre.

Nos valores iniciais de metal no meio de 4,6 mg/L e 12,0 mg/L, o micro-organismo não cresceu e a concentração de cobre variou até chegar no equilíbrio. Para a concentração de 4,6 mg/L, a *Oscillatoria* sp. acumulou no equilíbrio 0,125 mg, enquanto que para a concentração de 12,0 mg/L, a cianobactéria acumulou no 0,425 mg.

Pode-se também afirmar que quanto maior a concentração de metal no meio, maior é o potencial de bioacumulação da cianobactéria como o verificado por Kiran *et al.* (2008).

Da Costa e de França (1998), investigaram o crescimento da cianobactéria *Spirulina máxima* em presença de cádmio. A quantidade do metal bioacumulado e as frações da parede celular onde metal foi captado foram estudadas pelos autores. Pode-se concluir que a maior parte do cádmio ficou retida na fração lipídica da parede e o metal alterou o crescimento da cianobactéria, diminuindo a fase exponencial. Por essas conclusões, pode-se fazer uma analogia com o presente trabalho, onde o cobre foi tóxico para a *Anabaena* sp. e a *Oscillatoria* sp., e, provavelmente, foi acumulado na fração lipídica dessas cianobactérias também.

Cultivos da *Oscillatoria* sp. na presença de concentração tóxica de cobre iônico e em meio isento do metal são apresentados na Figura 18.



Figura 18: Cultivos de *Oscillatoria* sp. isento de metal e na presença de concentração de Cu(II).

Para *Oscillatoria* sp., a concentração de 0,9 mg/L de cobre no meio de cultura já foi inibitória do crescimento (Figura 16) e a essa concentração do metal no cultivo também visualiza-se uma alteração significativa na coloração do cultivo, devido à clorofila-a que é o pigmento fotossintético da cianobactéria. Neste caso também, houve uma completa despigmentação da cultura. A presença de Cu (II) no meio a partir em 0,9 mg/L mostra que de alguma forma houve interação do metal com a *Oscillatoria* sp, o que afetou o processo da fotossíntese como ocorrido na *Anabaena* sp., em maior concentração de cobre iônico no meio.

4.2 Microalgas verdes

4.2.1 *Monorraphidium sp.*

O crescimento da microalga verde *Monorraphidium sp.* e a concentração de metal residual em solução ao longo do experimento, são os parâmetros usados para avaliar a toxicidade e a bioacumulação do Cu^{++} . Na Figura 19 é apresentado o crescimento da microalga verde *Monorraphidium sp.*

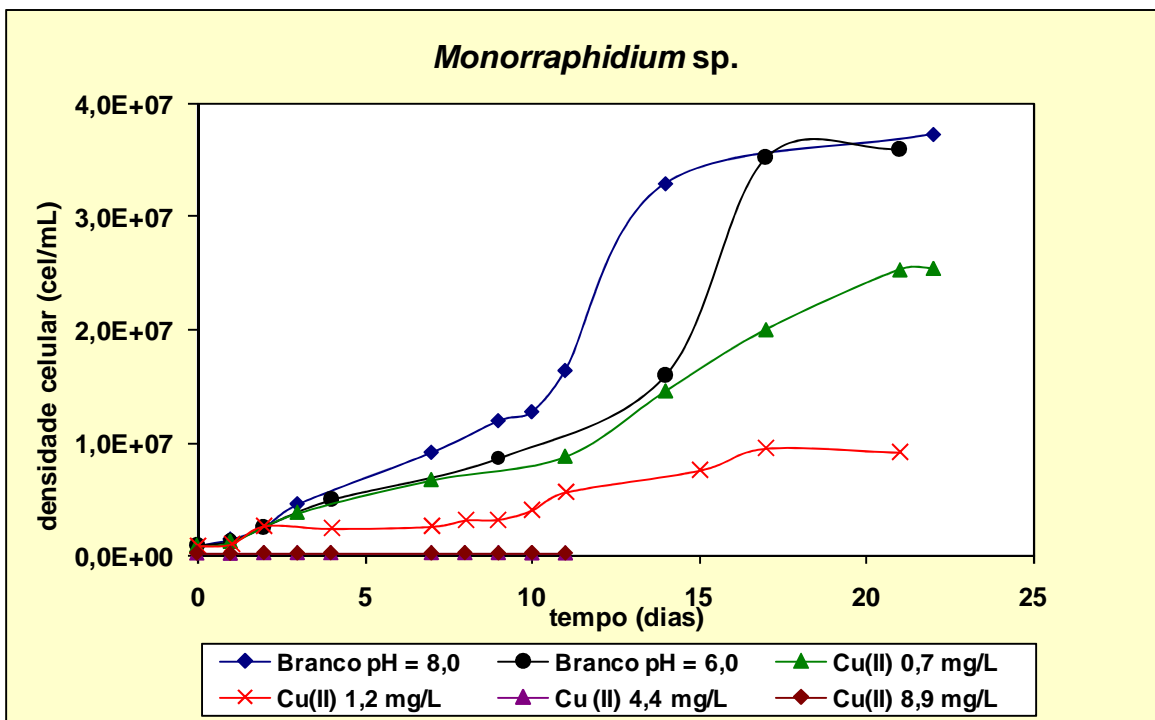


Figura 19: Crescimento de *Monorraphidium sp.* no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH=6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L (o dia 0 do experimento foi o dia da inoculação da cultura microbiana no meio e dia inicial das medições sucessivas).

A análise das curvas de crescimento (Figura 19), mostra uma similaridade entre as curvas da *Monorraphidium sp.* em meio isento de metal a pH= 8,0 e no meio isento de metal a pH=6,0 em termos de densidade celular final, apesar das diferenças observadas ao longo dos cultivos.

Para esse micro-organismo, o pH não alterou significativamente o valor máximo da densidade celular atingida ao final do crescimento.

Quando a concentração inicial de cobre no meio foi de 0,7 mg/L, houve uma redução no crescimento, onde a densidade celular máxima atingida foi de $2,54 \cdot 10^7$ células/mL. Essa redução significou um decaimento no número de células de 29,2% se comparada com o padrão (meio isento de metal e pH= 6,0), considerando-se a densidade final.

Ao analisar-se a figura antes do micro-organismo atingir a densidade celular máxima, verifica-se que para a concentração de 0,7 mg/L de cobre iônico, o crescimento não foi distinto do padrão até o 14º dia. A partir desse ponto, a densidade celular aumentou de forma suave até alcançar o valor máximo, atingindo, no entanto, uma menor produtividade em células, indicando certo grau de inibição do crescimento pela presença do cobre.

Aumentando-se a concentração inicial de cobre no meio para 1,2 mg/L, o crescimento da *Monorraphidium* sp. foi bastante comprometido. A densidade celular máxima foi de $9,1 \cdot 10^6$ células/mL, significando uma redução de 74,6% no crescimento final comparado com o padrão, sendo que a diminuição do crescimento já foi sentida desde o início do experimento.

A adição de cobre nas concentrações de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L, cessaram completamente o crescimento da microalga. sendo esses valores altamente tóxicos à *Monorraphidium* sp.

Esses resultados de toxicidade do cobre revelam estar de acordo com o estudo de Yan e Pan (2002) que demonstraram para as microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Closterium lunula*, quanto maior foi a concentração inicial de cobre no meio, menor a concentração de microalgas que se obteve ao fim do cultivo.

A Figura 20 a seguir mostra a concentração de cobre iônico no meio de cultura ao longo do tempo do experimento da *Monorraphidium* sp.

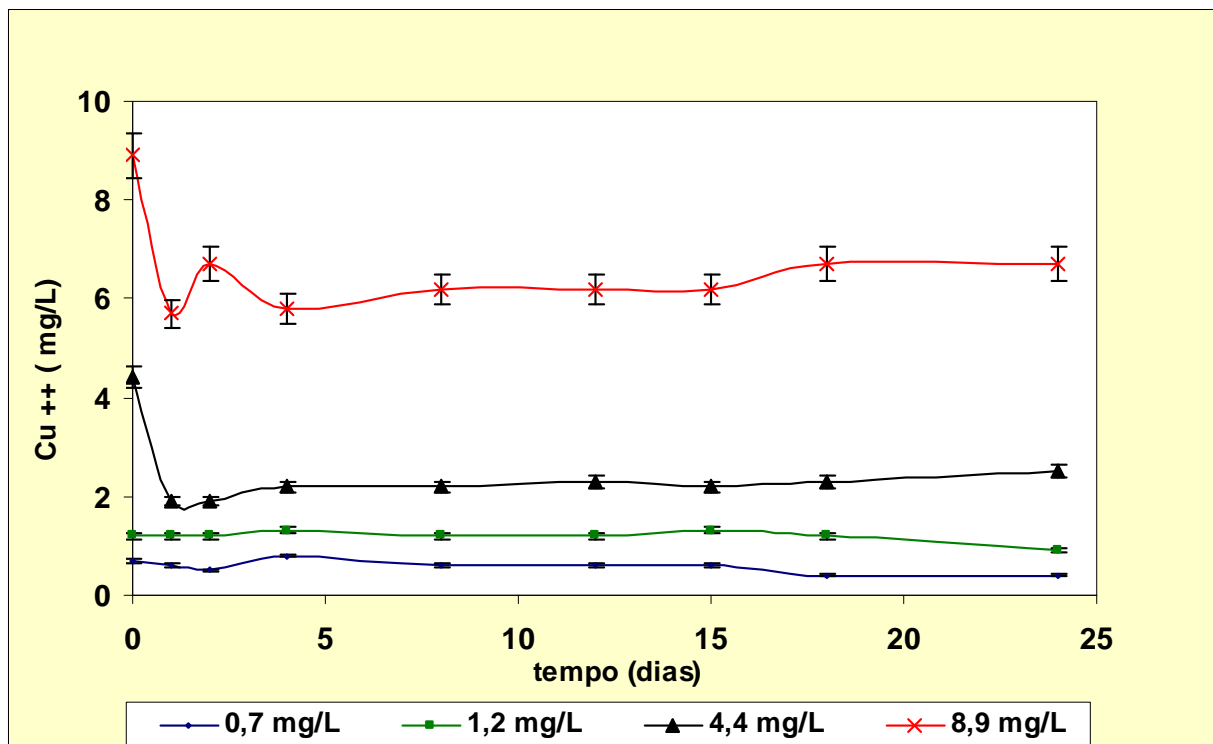


Figura 20: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de *Monorraphidium* sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L (o ponto 0 corresponde à concentração de cobre antes da adição do micro-organismo).

Ao avaliar a variação da concentração de cobre em solução (Figura 20) para os valores iniciais de 0,7 mg/L e 1,2 mg/L, percebe-se que o metal em solução permaneceu constante ao longo de todo o experimento, revelando que a microalga *Monorraphidium* sp. não bioacumulou o metal nessas concentrações.

Já ao analisar a variação das concentrações iniciais de cobre de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L, vê-se que houve uma redução significativa da concentração do metal no primeiro dia do cultivo, mas em seguida, a variação foi pequena até o equilíbrio ser atingido. Quando a concentração inicial do meio foi de 4,4 mg/L, no primeiro dia a *Monorraphidium* sp. reduziu 56,8% da quantidade de cobre presente inicialmente, chegando à concentração de 1,9 mg/L. Para essa concentração, a microalga atingiu o equilíbrio em 2,5 mg/L de cobre no meio e um acúmulo de 0,38 mg (200 mL de cultivo). Para a concentração inicial de 8,9 mg/L de cobre, a microalga captou 35,9% do total de metal presente no meio, atingindo uma concentração de 5,7 mg/L no primeiro dia. A concentração de Cu (II) no equilíbrio para essa concentração inicial foi de 6,7 mg/L e 0,64 mg de acúmulo (200 mL de cultivo).

Comparando o crescimento (Figura 19) e as concentrações de metal residual no meio (Figura 20), percebe-se que o cobre só foi bioacumulado pelo micro-organismo quando as concentrações do metal foram extremamente tóxicas à microalga (concentrações iniciais de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L).

Na concentração inicial de 0,7 mg/L de metal no meio de cultura, pode-se perceber que houve uma redução no crescimento da microalga (29,2 %) comparada com o padrão, embora a avaliação da concentração de cobre em solução (Figura 20) mostre que a *Monorraphidium* sp. não bioacumulou metal a essa concentração inicial.

Para a concentração inicial de 1,2 mg/L de cobre no meio, houve uma redução maior do crescimento do que aquela apresentada para a concentração inicial de 0,7 mg/L. Essa redução representa uma diferença de 74,6% comparada com o crescimento padrão. Mesmo com uma redução significativa do crescimento da microalga, ao analisar a concentração de cobre em solução (Figura 20), percebe-se ausência de bioacumulação do cobre para essa concentração inicial do metal também.

Nas concentrações iniciais de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L de cobre, que impediram o crescimento da microalga (Figura 19), os valores de Cu (II) residual em solução (Figura 20) revelam que houve mudanças nas quantidades do metal no meio de cultura com a adição da *Monorraphidium* sp. Observou-se que houve uma redução significativa da concentração do metal no primeiro dia do cultivo, e em seguida, a variação foi pequena até o equilíbrio ser atingido. Na concentração inicial de 4,4 mg/L de cobre, a microalga atingiu o equilíbrio em 2,5 mg/L (acúmulo de 0,38 mg em 200 mL de cultivo) e para o valor de 8,9 mg/L de cobre, o equilíbrio para essa concentração inicial foi de 6,7 mg/L (0,64 mg de acúmulo em 200 mL de cultivo).

Para a microalga verde *Monorraphidium* sp., cultivos isento de metal e em concentração inibitória do Cu (II) (4,4 mg/L) são mostrados na Figura 21 abaixo.



Figura 21: Cultivos da microalga verde *Monorraphidium* sp. isento de Cu (II) e na presença de concentração do metal.

Para a microalga verde *Monorraphidium* sp., a concentração de 4,4 mg/L de cobre inibiu consideravelmente o crescimento e a partir desta quantidade, a pigmentação do cultivo foi alterada. Nesta concentração, houve uma despigmentação total da cultura e provavelmente o cobre interagiu na cadeia no mecanismo fotossintético desta microalga também.

4.2.2 *Scenedesmus* sp.

A avaliação da toxicidade e da bioacumulação do Cu (II) pela microalga *Scenedesmus* sp. encontra-se representada pelo crescimento e determinação da concentração de cobre em solução. O crescimento da microalga verde *Scenedesmus* sp. é apresentado na Figura 22.

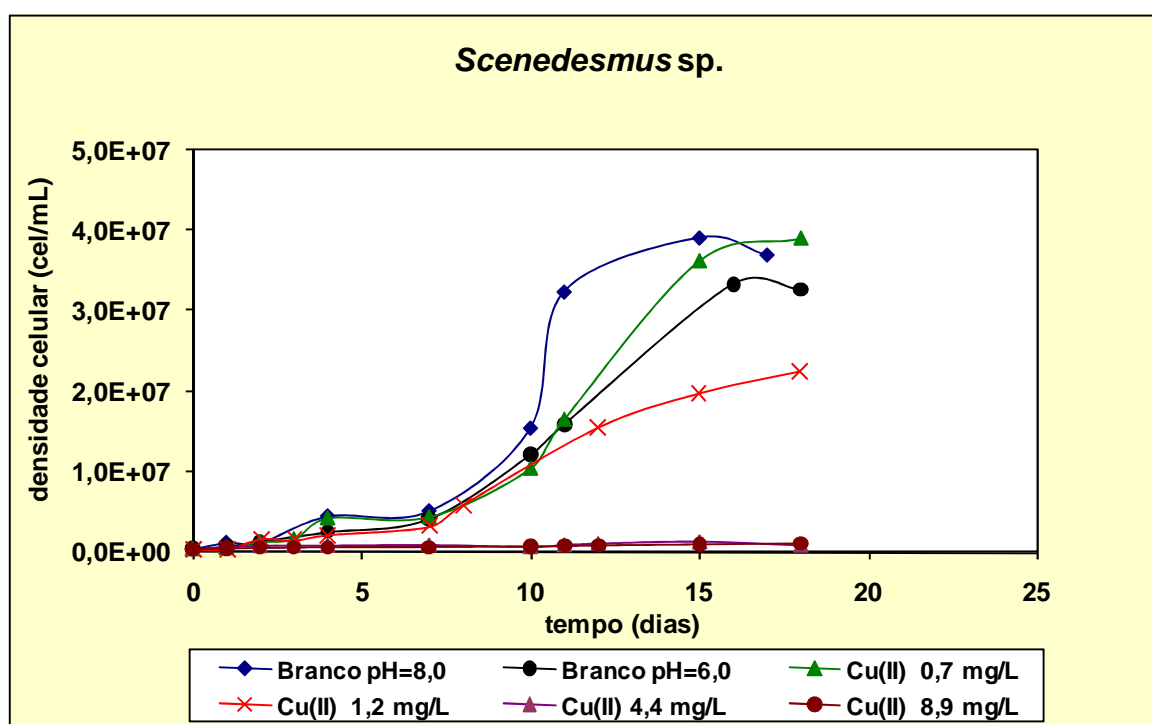


Figura 22: Crescimento de *Scenedesmus* sp. no meio ASM-1 em pH= 8,0, no meio ASM-1 em pH= 6,0 e no meio ASM-1 com concentrações de cobre de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L (o dia 0 do experimento corresponde ao dia da inoculação da cultura microbiana no meio).

De acordo com a Figura 22, o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio isento de metal a pH= 8,0 foi semelhante ao do meio isento de metal a pH= 6,0 e também ao do meio cuja concentração inicial de cobre era 0,7 mg/L.

A densidade celular máxima alcançada com o meio em pH= 8,0 foi de $3,9 \cdot 10^7$ células/mL, enquanto que para o meio em pH= 6,0 foi ligeiramente inferior ($3,3 \cdot 10^7$ células/mL). Em relação aos meios contaminados com metal, observou-se para aquele

contendo 0,7 mg/L de cobre uma densidade celular máxima de $3,9 \cdot 10^7$ células/mL, concentração esta idêntica à do meio isento de metal a pH= 8,0 e melhor que em pH= 6,0.

A partir da concentração de 1,2 mg/L de cobre pode-se verificar que o crescimento foi afetado, ocorrendo uma diminuição de 42,4% da densidade celular comparada com o padrão (meio isento de cobre e pH= 6,0). O máximo de concentração de biomassa alcançada foi de $2,2 \cdot 10^7$ células/mL. Pode-se perceber também que o crescimento só foi afetado a partir do 10º dia, mas para os meios contendo cobre em concentrações mais elevadas (4,4 mg/L e 8,9 mg/L) isso não foi observado. Portanto, essas concentrações foram altamente tóxicas à microalga *Scenedesmus* sp. como observado para a *Monorraphidium* sp.

A seguir, na Figura 23 é apresentada a concentração de cobre (II) no meio ASM-1 durante o crescimento da *Scenedesmus* sp.

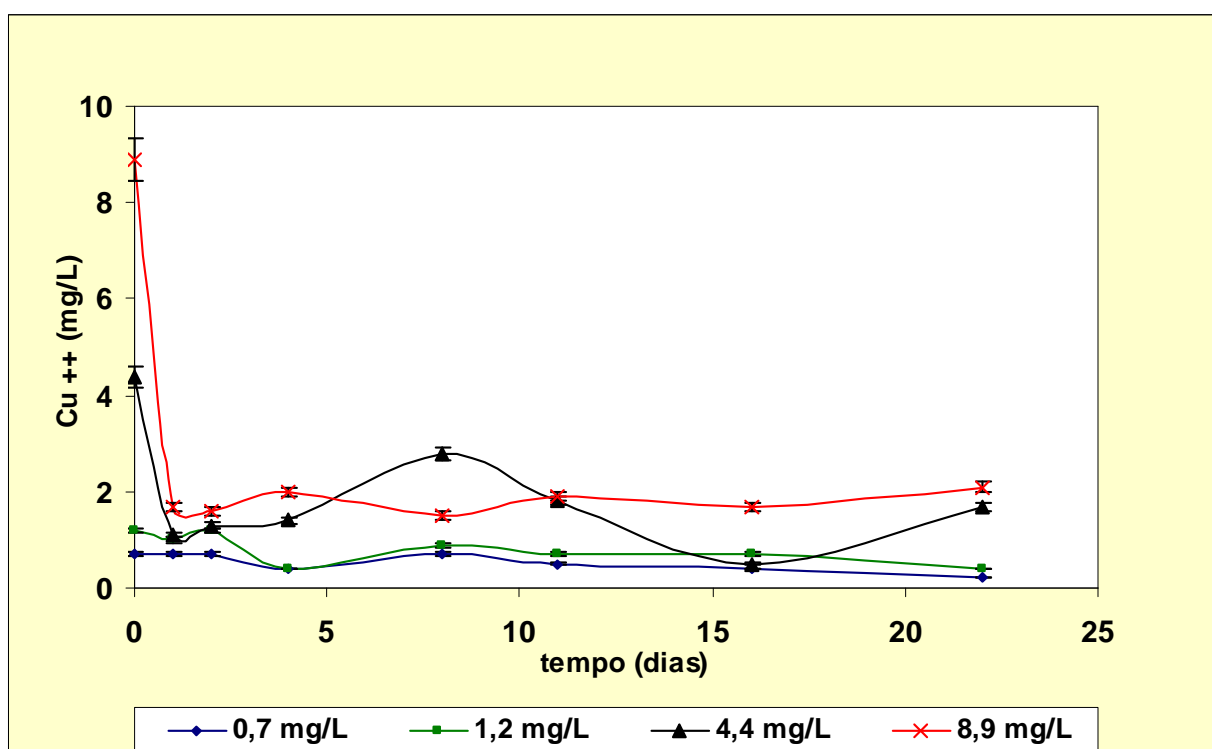


Figura 23: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de *Scenedesmus* sp. nas concentrações iniciais do metal de 0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L (o ponto 0 corresponde à concentração de cobre antes da adição do micro-organismo).

Ao estudar a bioacumulação para as concentrações de 0,7 mg/L e 1,2 mg/L de metal no meio observa-se que a quantidade de cobre permaneceu praticamente constante ao longo de todo o experimento, revelando que a microalga *Scenedesmus* sp. não captou o metal em solução, comportamento semelhante ao da *Monorraphidium* sp. Quando as concentrações iniciais de cobre foram de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L ocorreu uma redução significativa da concentração do metal no primeiro dia do estudo. Para a concentração inicial de cobre de 4,4 mg/L a redução foi de 75%, chegando ao valor de 1,1 mg/L do metal no meio enquanto que, para o valor inicial de 8,9 mg/L, a redução foi ainda maior (81%) atingindo uma concentração de 1,7 mg/L.

Seguindo o experimento, as concentrações de cobre no meio variaram pouco até atingir o equilíbrio. No equilíbrio, a concentração do meio de cultura foi de 1,7 mg/L de cobre residual para 4,4 mg/L de metal inicial, o que significa uma redução total de 61% e um acúmulo de 0,54 mg. Em relação ao meio contendo 8,9 mg/L de cobre, a concentração de equilíbrio foi de 2,1 mg/L, expressando uma redução de 76% e um acúmulo de 1,36 mg (200 mL de cultivo).

No caso da microalga marinha *Phaeodactylum tricornutum*, uma redução de 50% do crescimento ocorreu na concentração de 0,1 mg/L (CID *et al.*, 1995), inferior às empregadas neste estudo. Já a concentração de 1,0 mg/L inibiu totalmente o crescimento. Pode-se perceber que a sensibilidade ao cobre varia entre as diversas espécies de microalgas.

No estudo de Sabatiniti *et al.* (2009) observou-se diferentes suscetibilidades ao cobre para as microalgas *Chlorella kessleri* e *Scenedesmus vacuolatus*. Verificou-se que para *S. vacuolatus* o aumento na concentração de cobre no meio alterou significativamente parâmetros metabólicos a partir de concentrações mais baixas. Já para *C. kessleri* não houve mudança significativa nos parâmetros para as mesmas concentrações.

Quando se compara toxicidade (Figura 22) e bioacumulação (Figura 23), percebe-se que o cobre só foi bioacumulado pela *Scenedesmus* sp quando as concentrações do metal foram extremamente tóxicas (4,4 mg/L e 8,9 mg/L) e impediram o seu crescimento, conforme verificado para a *Monorraphidium* sp..

Nas menores concentrações iniciais de metal (0,7 mg/L e 1,2 mg/L) nota-se que não houve diminuição do crescimento da microalga na concentração de 0,7 mg/L (Figura 22), mas

para 1,2 mg/L ocorreu uma redução de 42%, quando comparadas com o padrão (pH= 6,0). Entretanto, os resultados de bioacumulação (Figura 23) mostraram que a microalga não captou o metal.

Foram investigadas a bioadsorção de zinco, o efeito sobre o crescimento e sobre os parâmetros metabólicos (peso seco, carotenóides, clorofila-a e b, e aminoácidos) das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus quadricauda* em concentrações que variaram de 0 a 8,0 mg/L de zinco (OMAR, 2002). Os resultados mostraram que quanto maior a concentração de Zn^{++} mais elevada foi a adsorção do metal, sendo que as altas concentrações de zinco inibiram o crescimento e as atividades metabólicas. No entanto, as baixas concentrações do metal induziram um aumento das atividades metabólicas para ambas as microalgas. Esses resultados corroboram o que pode ser visualizado na Figura 24, onde o aumento da concentração de metal no meio afetou a pigmentação da *Scenedesmus* sp., sendo que o mesmo ocorreu com a *Monorraphidium* sp. (Figura 21).



Figura 24: Cultivos de *Scenedesmus* sp. em meio isento de metal e na presença de concentração de cobre (4,4 mg/L).

O efeito tóxico do cobalto no crescimento e na quantidade de pigmentos produzidos pela microalga verde *Monorraphidium minutum* e pela diatomácea *Nitzschia perminuta* foi avaliado por Sheekh *et al.* (2003). Os autores observaram que em altas concentrações, o crescimento e a pigmentação foram inibidos, enquanto que em baixas concentrações foram pouco aumentados. Esses resultados estão de acordo com o que se pôde visualizar nos cultivos para *Monorraphidium* sp. (Figura 21) e *Scenedesmus* sp. (Figura 24), onde concentrações de metal inibitórias do crescimento levaram a uma total despigmentação.

No trabalho de Perales-Vela *et al* (2006) estudou-se o efeito de concentrações sub letais de cobre no crescimento, na quantidade de pigmentos fotossintéticos e na respiração de *Scenedesmus incrassatulus* e concluíram que o crescimento foi o mais sensível à adição do metal quando comparados com a fotossíntese e a respiração.

4.3 Comparação dos resultados dos micro-organismos

Para uma maior compreensão do comportamento dos micro-organismos estudados, elaborou-se a Tabela 6 na qual são apresentados valores de acúmulo de metal para as concentrações iniciais de cobre e se ocorreu o crescimento. Assim pode-se verificar a ordem de toxicidade e da bioacumulação das microalgas verdes e cianobactérias empregadas neste estudo.

Tabela 6: Acúmulo de cobre para as concentrações iniciais e crescimento celular.

	Concentrações iniciais de Cu (II) no meio de cultura/Acúmulo / Crescimento			
<i>Monorraphidium sp.</i>	0,7 mg/L inicial/ não acumulou/cresceu	1,2 mg/L/não acumulou/ diminuiu o crescimento	4,4 mg/L/ 0,38 mg de acúmulo/ não cresceu	8,9 mg/L/ 0,64 mg de acúmulo / não cresceu
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,7 mg/L inicial/ não acumulou/estimulou o crescimento	1,2 mg/L/ não acumulou/ diminuiu o crescimento	4,4 mg/L/ 0,54 mg de acúmulo/ não cresceu	8,9 mg/L/1,36 mg de acúmulo/ não cresceu
<i>Oscillatoria sp.</i>	0,6 mg/L/ não acumulou/não cresceu	0,9 mg/L/ não acumulou/ não cresceu	4,6 mg/L/ 0,5 mg de acúmulo /não cresceu	12,0 mg/L/ 1,7 mg de acúmulo / não cresceu
<i>Anabaena sp.</i>	1,4 mg/L/ não acumulou/redução no crescimento	1,8 mg/L/ não acumulou/ não cresceu	4,1 mg/L/0,26 de acúmulo/ não cresceu	8,8 mg/L/ 1,14 mg de acúmulo/ não cresceu

Uma vez que o volume empregado nos ensaios com as cianobactérias foi de 50 mL e para as microalgas verdes foi de 200 mL, portanto foi necessária a normalização dos resultados para o volume de 200 mL. Após essa normalização da bioacumulação, pode-se comparar quantitativamente o acúmulo/captação de cobre. Na tabela comparativa dos resultados (Tabela 6) observa-se a quantidade de cobre acumulada (mg) e se ocorreu o crescimento do micro-organismo nessas concentrações do metal

Na análise dos resultados, pode-se perceber que a cianobactéria *Oscillatoria* sp. foi a mais sensível à presença de cobre, onde o metal foi letal desde a menor concentração adicionada no meio (0,6 mg/L) e que a microalga verde *Scenedesmus* sp. foi a mais resistente, onde a concentração de 0,7 mg/L estimulou seu crescimento. Portanto, a sensibilidade ao cobre teve a seguinte ordem entre os micro-organismos estudados: *Oscillatoria* sp. > *Anabaena* sp. ≥ *Monorraphidium* sp. > *Scenedesmus* sp..

Nas observações da Tabela 6 juntamente com os resultados específicos de crescimento, pode-se perceber que o micro-organismo mais sensível ao cobre foi aquele que comparativamente captou/acumulou maior quantidade de metal, a *Oscillatoria* sp.. A microalga verde *Scenedesmus* sp, foi o micro-organismo mais resistente à presença de cobre no meio e não houve relação entre a quantidade de cobre acumulado e sua toxicidade. Pode-se então ordenar os micro-organismos de acordo com os valores de acúmulo de cobre. A bioacumulação foi maior entre: *Oscillatoria* sp. > *Scenedesmus* sp. > *Anabaena* sp. > *Monorraphidium* sp..

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, verificou-se que as microalgas verdes e as cianobactérias possuem diferentes sensibilidades ao metal cobre (II).

As microalgas verdes foram mais resistentes à presença de cobre no meio de cultura do que as cianobactérias.

As concentrações mais elevadas de metal cessaram completamente o crescimento celular das cianobactérias das microalgas verdes (concentrações entre 4,1 mg/L e 12,0 mg/L de cobre).

Cobre (II) inibe o crescimento da microalga *Monorraphidium* sp. já na concentração de 0,7 mg/L e a concentração de 4,4 mg/L foi suficientemente tóxica para cessar o crescimento.

Scenedesmus sp. foi o micro-organismo mais tolerante, a contaminação do meio. A concentração de 1,2 mg/L de Cu (II) já inibe o crescimento. E a concentração de metal de 4,4 mg/L do também foi letal à microalga.

Para a cianobactéria *Anabaena* sp., o cobre na concentração de 1,4 mg/L praticamente cessou o crescimento microbiano, e a partir da concentração de 1,8 mg/L de Cu (II) no meio de cultura, o crescimento celular foi totalmente inibido.

A cianobactéria *Oscillatoria* sp. foi o micro-organismo mais sensível à presença de cobre no meio de cultura. A adição de 0,9 mg/L de Cu (II) já foi suficiente para comprometer todo o crescimento.

Cianobactérias e microalgas verdes foram capazes de captar cobre do meio quando contaminadas com as concentrações de Cu (II) entre 4,1 mg/L e 12,0 mg/L.

As microalgas verdes acumularam cobre nas concentrações de Cu (II) entre 4,1 mg/L e 12,0 mg/L que foram inibitórias do crescimento. Uma maior concentração inicial de cobre no meio levou a uma maior captação.

A bioacumulação de metal também ocorreu nas cianobactérias para as concentrações de cobre entre 4,1 mg/L e 12,0 mg/L. Uma maior concentração inicial de cobre no meio também levou a uma maior captação do metal pelas cianobactérias, semelhante às microalgas verdes. Quanto maior foi a concentração inicial, maior foi o acúmulo.

Pode-se concluir que cobre afetou negativamente o fitoplâncton, com isso os resultados possibilitam o uso potencial das cianobactérias e microalgas verdes como indicadores ambientais, sejam em estudos de qualidade da água, de comprometimento da cadeia trófica, ou ainda em biomonitoramento de efluentes contaminados com metal.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Ensaio com a cianobactéria *Oscillatoria* sp. com concentrações inferiores à 0,6 mg/L de Cu (II).
- Ensaio semelhante ao deste trabalho, utilizando outros metais essenciais aos micro-organismos, com o ferro.
- Ensaio com os micro-organismos utilizados em diferentes pHs.
- Ensaio com os micro-organismos sob condições mais conservativas de nutrição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.A. **Algal Culturing Techniques**. Burlington, USA: Elsevier Academic Press, 2005.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BENDO, A. **Especiação química de cobre nas águas da região costeira da Ilha de Santa Catarina utilizando voltametria de redissolução catódica e métodos espectrométricos de emissão e absorção atômica**. Dissertação (Mestrado em Química) Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Universidade Federal da Santa Catarina., UFSC. Florianópolis, 2002.

BOLTON, H.; GORBY, Y.A. An overview of the bioremediation of metal-contaminated industrial effluents using waste sludges. In: **Water Science Technology**, n. 34, pp. 9–15, 1995.

BRITO, F. D. **Toxicologia Humana e Geral**. 2º ed. Rio de Janeiro, Atheneu: 1988.

CAMPÊLO, M. J. A. **Microfitoplâncton da praia de Carne de Vaca, Goiana, Pernambuco: Biomassa e ecologia**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, 1999.

CHAN, S.; GERSON, B.; SUBRAMANIAM, S. The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. In: **Chin. Lab. Med**, v.18, n.4, p. 673-685, 1998.

CID, A.; HERRERO, C.; TORRES, E.; ABALDE, J. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. In: **Aquatic Toxicology** v.31, n.2, pp. 165-174, 1995.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasil, 2005.

COSTA, A.A.; FRANÇA, F.P. Cd uptake by *Spirulina máxima*: Toxicity and mechanism. In: **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, pp. 1-6. 1998.

CRANE, K.; GALASSO, J.; BROWN, C.; CHERKASHOV, G. Northern Ocean inventories of organochlorine and heavy metal. In: **Marine Pollution Bulletin**, v.43, pp. 28-60, 2001.

DEBELIUS, B.; FORJA, J.M.; DELVALLS, Á.; LUBIÁN, L.M. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. In: **Ecotoxicology and Environmental safety** n. 72, v.5, pp. 1503-1513, 2009.

FERREIRA, A.M.C.; SANTOS, M.L.P.; Ferreira, M. E.; DAMASCENO, M.O.; ALVES, W.A. Mimics of copper proteins: structural and functional aspects. In: **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.72, n.1, pp.51-57, 2000.

GADD, G. M. Accumulation of metals by microorganism and algae. In: Eehm, H. J. (ed.): **Biotechnology – A comprehensive treatise**. Weinheim: VHC Verlagsgesellschaft 6B. p 401-433, 1988.

GADD, G.M. Biosorption. In: **Journal. Chemical technology biotechnology.**, v.55, n.3, pp. 302-304, 1992.

GADD, G. M. Microbial control of heavy metal pollution. In: ZRY, J.C. *et al.* (ed): **Microbial control of pollution**. 58th Symposium of the Society for General Microbiology, 1992b.

GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B.Z.; KELLER, P.; LEHR, H. e SIEGEL, S.M.; Recovery of metal ions from aqueous solutions by Penicillium biomass: kinetic and uptake parameters. In: **Water Air Soil Pollut**, n. 33, pp. 359–371, 1987.

HAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KIRAN, B.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, C.P. Metal–salt co-tolerance and metal removal by indigenous cyanobacterial strains. In: **Process Biochemistry** v.43, n.6, pp.598–604, 2008.

KNAUER, K.; BEHRA, R.; SING, L. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus Subspicatus* (clorophyta). In: **Journal of Phycology**, n. 33, p. 596-601, 1997.

KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Accumulation of cobalt by marine alga. In: **Biotechnology and Bioengineering.**, New York, v. 33, p. 809-814, 1989.

LEE, J.D. **Química Inorgânica Não Tão Concisa**. 5ed. São Paulo, Edgard Blucher, 527p., 2000.

LEE, R.E. **Phycology**. 4^a ed. Colorado State University, USA: Cambridge University Press, 2008.

LEVY, J.L.; ANGEL, B.M.; STAUBER, J.L.; POON, W.L.; SIMPSON, S.L.; CHENG, S.H.; JOLLEY, D.F. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper sensitive and copper tolerant species. In: **Aquatic Toxicology**, vol. 89, n.2, p. 82-93, 2008.

LEVY, J.L.; STAUBER, J.L.; JOLLEY, D.F. Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect biotic factors on copper adsorption and toxicity. In: **Science of the Total Environment**, n. 387, p. 141–154, 2007.

L-SHEEKH, M.M.; EL-NAGGAR, A.H.; OSMAN, M.E.H.; EL-MAZALY, E. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. In: **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15 n. 3, pp.159-166, 2003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MULLEN, M.D.; WOLF, D.C.; FERRIS, F.G.; BEVERIDGE, T.J.; FLEMMING, C.A.; BAILEY, G.W. Bacterial sorption of heavy metals. In: **Applied and Environmental Microbiology**, n.54, pp. 3143–3149, 1989.

MUR, L.R.; SKULBERG, O.M; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (eds). **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E& FN Spon/ WHO; 1999, pp. 25-54.

OMAR, H.H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. In: **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, n.2, pp.95-100, 2002.

PELZCAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: McGraw Hill do Brasil, 1981.

PELCZAR, M. J; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, v.2, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PERALES-VELA, H.V.; PEÑA-CASTRO, J.M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Heavy metal detoxication in eukaryotic microalgae. In: **Chemosphere**, v. 64, n.1, pp.1-10, 2006.

PHOENIX, V.R.; MARTINEZ, R.E.; KONHAUSER, K.O.; FERRIS, K.G. Characterization and Implications of the cell surface Reactivity of *Calothrix* sp. Strain KC97. In: **Applied and environmental Microbiology**, v.68, n.10, pp. 4827-4834, 2002.

SABATINIA, S. E.; JUÁREZ, A. B.; EPPIS, M. R.; BIANCHI, L; LUQUET, C. M; MOLINA, M.C.R. Oxidative stress and antioxidant defenses in two Green microalgae exposed to copper. In: **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.72, v.4, pp.1200-1206, 2009.

SATOH, A.; VUDIKARIA, L. Q.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. In: **Environment International**, n. 31, pp. 713– 722, 2005.

SMITH, G. M. **Botânica Ciptogâmica** .4º ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian,. 1987.

STAUBER, J.L.; DAVIES, C.M. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. In: **Environmental Review**, v. 8, p. 255–301, 2000..

VECCHIO, A.; FINOLI, C.; DISIMINE, D.; ANDREONI, V. Heavy metal biosorption by bacterial cells. In: **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. p. 338-342, 1998.

VEGLIÓ, F.; BEOLCHINI, F.; GASBARRO, A. Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Athrobacter* sp. In: **Process Biochemistry**, v.32, n.2, p.99-105, 1997.

VERMA, S. K.; SINGH, S. P. Factors Regulating copper uptake in cyanobacterium. In: **Current Microbiology** v. 21, pp. 33-37, 1990.

VOLESKY, B. **Biotechnology and Bioengineering Symp.**, v.16, pp. 121-126, 1986.

WETZEL, R. G. **Limnologia**. 2º ed. Lisboa: Fundação Catalouste Gulbekian, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Copper**. Geneva : Who, 1998.

YAN, H.; PAN, G. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. In: **Chemosphere**, n. 49, p. 471-476, 2002.

YILMAZ, A.B.; ISIK, O; SAYIN, S. Bioaccumulation and Toxicity of different copper concentrations in *Tetraselmis chuii*. In: **E.U. Journal of Fisheries & aquatic Sciences**. v.22, n.3-4, p. 297-301, 2005.

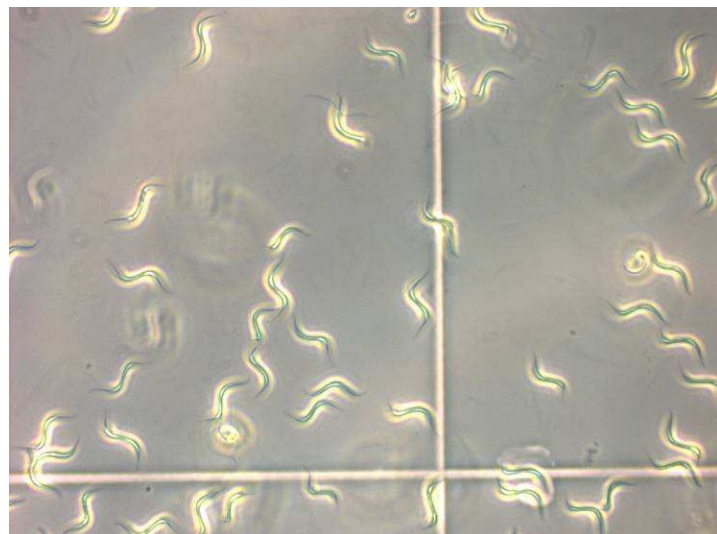
ANEXOS

Anexo 1- Acervo Fotográfico



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 1000 vezes) de *Monorhaphidium* sp. em meio isento de cobre e pH= 8,0.

Fonte: Acervo de Carolina B. Marini



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 1000 x) em de *Monorhaphidium* sp. em meio contaminado com cobre e pH= 6,0.

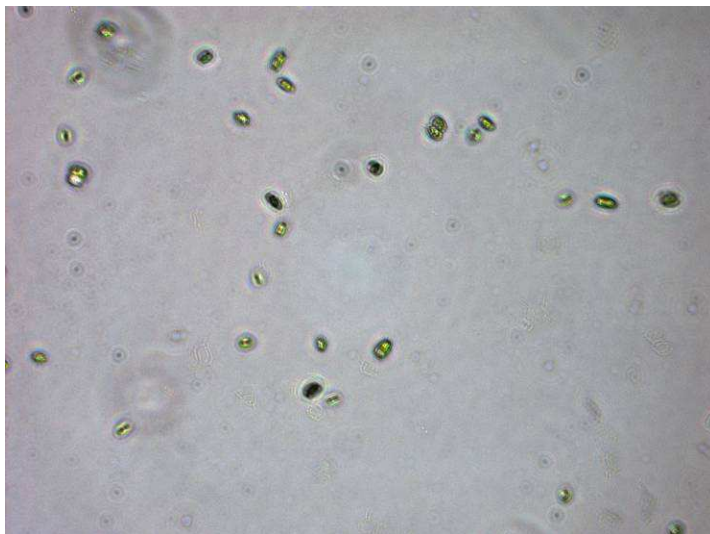
Fonte: Acervo de Carolina B. Marini

Ao observar as culturas de *Monorhaphidium* sp., não percebe-se mudanças na morfologia quando há contaminação com o cobre (II).



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 1000 x) de *Scenedesmus* sp. em meio isento de cobre e pH= 8,0, mostrando um cenóbio de 4 células.

Fonte: Acervo de Carolina B. Marini



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 400 x) de *Scenedesmus* sp. em meio contaminado com cobre e pH= 6,0.

Fonte: Acervo de Carolina B. Marini

Também não houve mudanças na morfologia da célula de *Scenedesmus* sp quando as culturas foram contaminadas com cobre (II), apesar do cenóbios serem menos presentes.



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 1000 x) de *Anabaena* sp. em meio isento de cobre e pH= 8,0.

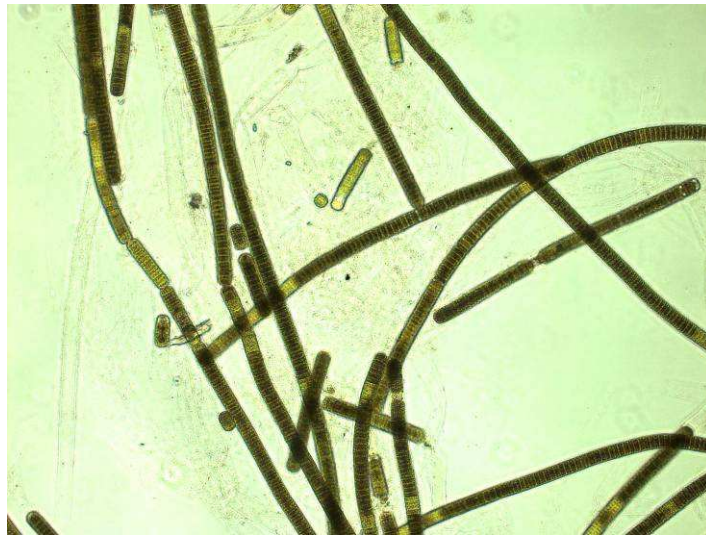
Fonte: Acervo de Carolina B. Marini



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 400 x) de *Anabaena* sp. em meio contaminado com cobre e pH= 6,0.

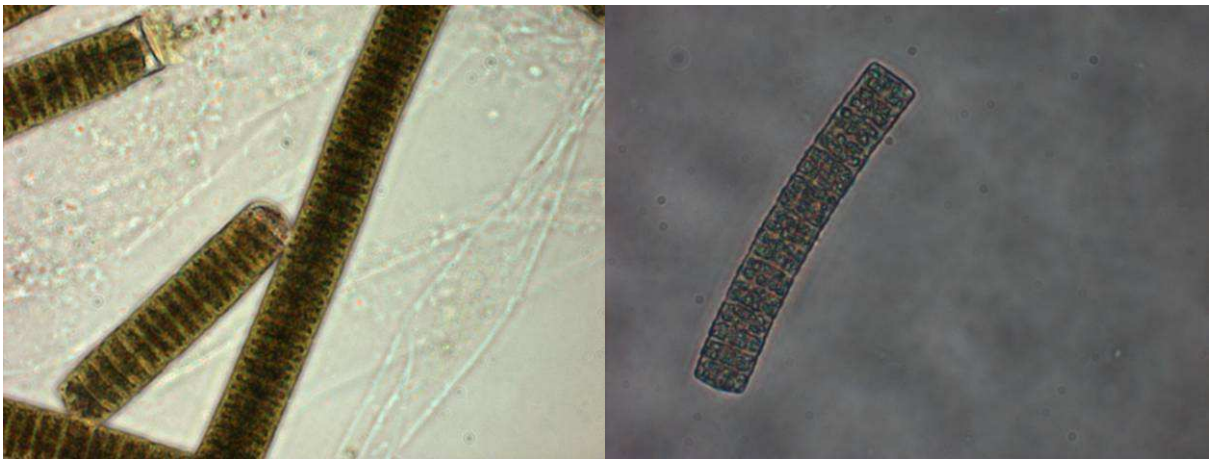
Fonte: Acervo de Carolina B. Marini

Quando se observa a morfologia de *Anabaena* sp. em meio contaminado com cobre(II), verifica-se também que não houve mudanças em sua forma como nas microalgas verdes.



Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 400 x) de *Oscillatoria* sp. em meio isento de metal e pH= 8,0.

Fonte: Acervo de Carolina B. Marini



a)

b)

Fotomicrografia (microscópio ótico, aumento de 1000 x) de *Oscillatoria* sp. a) em meio isento de metal e pH= 8,0 e b) em meio contaminado com cobre e pH= 6,0.

Fonte: Acervo de Carolina B. Marini

Ao observar também a morfologia da cianobactéria *Oscillatoria* sp., percebe-se inalterada sua forma em meio contaminado com o cobre como nas microalgas verdes e na *Anabaena* sp.

Anexo 2- Dados Experimentais

Anabaena sp.

Dados de crescimento: dia e concentração em mg/L.

dia	pH= 8,0	dia	pH= 6,0	dia	1,4 mg/L	dia	1,8 mg/L	dia	4,1 mg/L	dia	8,8 mg/L
0	12	0	68	0	16	0	10	0	10	0	20
2	22	2	16	2	8	2	6	2	2	2	2
6	188	6	146	6	66	8	12	8	10	6	8
8	240	10	200	8	52	10	8	10	6	8	4
15	430	13	312	10	78	13	2	13	2	10	4
20	452	15	414	13	82	15	18	15	10	13	4
22	434	22	410	20	70	20	8	20	6	15	4
				22	76	22	8	22	4	20	2
										22	2

Dados concentração de cobre ao longo do tempo:

dia	Concentrações residuais de cobre no meio de cultura (mg/L)			
0	1,4	1,8	4,1	8,8
1	1,4	1,6	2,6	2,8
3	1,4	1,7	2,4	2,9
8	1,4	1,8	2,4	2,8
9	1,5	1,7	2,5	2,8
11	1,4	1,8	2,7	2,6
14	1,5	1,8	2,7	3
16	1,4	1,6	2	2,3
21	1,3	1,8	2,4	2,8
23	1,8	1,8	2,8	3,1

***Oscillatoria* sp.**

Dados de crescimento: dia e densidade celular em mg/L.

dia	pH=8,0	pH=6,0	Cu 0,6 mg/L	Cu 0,9 mg/L	Cu 4,60 mg/L	Cu 12,0 (mg/L)
0	38	16	38	38	44	36
2	6	4	12	6	12	18
9	40	32	18	4	20	16
20	320	200	18	8	22	10
24	380	278	26	26	22	32
27	414	296	28	58	26	36

Dados concentração de cobre ao longo do tempo:

dia	Concentrações residuais de cobre no meio de cultura (mg/L)			
0	0,6	0,9	4,6	12
1	0,7	1,1	3,2	4,3
3	0,7	1,1	3	4,5
7	0,7	1,2	2	3,7
10	0,7	1	1,5	3
21	1	1,1	1,6	3,1
28	0,9	0,9	2,3	2,9
31	0,7	1,1	2,1	3,5

Monoraphidium sp.

Dados de crescimento: dia e concentração em células/mL (D= densidade celular).

Dia	pH=6.0	Dia	Cu 0,7 mg/L	Dia	Cu 1,2 mg/L	Dia	Cu 4,4 mg/L	Dia	Cu 8,9 mg/L
0	8,00E+05	0	8,00E+05	0	8,00E+05	0	8,00E+05	0	8,00E+05
1	1,18E+06	1	1,15E+06	1	9,70E+05	1	6,50E+05	1	6,25E+05
2	2,48E+06	3	3,73E+06	2	2,58E+06	2	1,10E+06	2	1,20E+06
4	4,85E+06	7	6,63E+06	4	2,34E+06	3	1,20E+06	3	8,70E+05
9	8,53E+06	11	8,70E+06	7	2,53E+06	4	1,09E+06	4	1,04E+06
14	1,59E+07	14	1,45E+07	8	3,09E+06	7	1,19E+06	7	9,35E+05
17	3,51E+07	17	1,99E+07	9	3,15E+06	8	1,10E+06	8	1,10E+06
21	3,59E+07	21	2,53E+07	10	3,98E+06	9	1,20E+06	9	8,07E+05
		22	2,54E+07	11	5,58E+06	10	9,50E+06	10	1,20E+06
				15	7,50E+06	11	8,80E+06	11	9,05E+05
				17	9,45E+06				
				21	9,10E+06				

Dia	D pH=8.0
0	8,00E+05
1	1,35E+06
2	2,44E+06
3	4,48E+06
7	9,05E+06
9	1,19E+07
10	1,27E+07
11	1,63E+07
14	3,29E+07
22	3,73E+07

Dados concentração de cobre ao longo do tempo:

dia	Concentrações residuais de cobre no meio de cultura (mg/L)			
0	0,7	1,2	4,4	8,9
1	0,6	1,2	1,9	5,7
2	0,5	1,2	1,9	6,7
4	0,8	1,3	2,2	5,8
8	0,6	1,2	2,2	6,2
12	0,6	1,2	2,3	6,2
15	0,6	1,3	2,2	6,2
18	0,4	1,2	2,3	6,7
24	0,4	0,9	2,5	6,7

Scenedesmus sp.

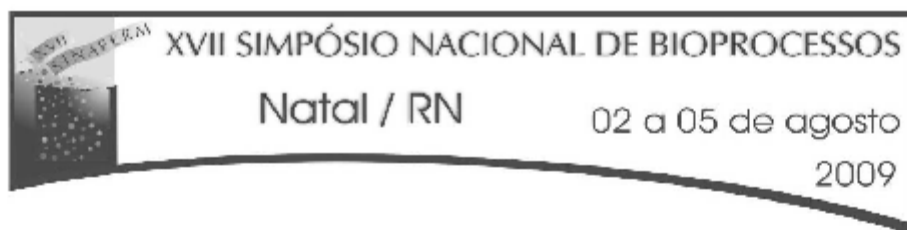
Dados de crescimento: dia e concentração em células/mL.

Dia	pH=8.0	Dia	pH=6.0	Dia	Cu 0,7 mg/L	Dia	Cu 1,2 mg/L	Dia	Cu 4,4 mg/L	Dia	Cu 8,9 mg/L
0	3,77E+05	0	3,77E+05	0	3,77E+05	0	3,77E+05	0	3,77E+05	0	3,77E+05
1	1,17E+06	1	7,05E+05	1	5,05E+05	1	4,50E+05	1	6,50E+05	1	4,80E+05
2	1,20E+06	2	1,33E+06	2	1,26E+06	2	1,71E+06	2	7,80E+05	2	5,67E+05
4	4,46E+06	4	2,50E+06	3	1,61E+06	3	1,55E+06	3	8,00E+05	3	6,10E+05
7	5,10E+06	7	4,12E+06	4	4,23E+06	4	2,22E+06	4	8,10E+05	4	6,60E+05
10	1,54E+07	10	1,21E+07	7	4,37E+06	7	3,24E+06	7	8,70E+05	7	6,80E+05
11	3,24E+07	11	1,59E+07	10	1,04E+07	8	5,95E+06	10	6,50E+05	10	7,72E+05
15	3,91E+07	16	3,33E+07	11	1,65E+07	12	1,55E+07	11	8,75E+05	11	7,96E+05
17	3,70E+07	18	3,26E+07	15	3,63E+07	15	1,98E+07	12	1,04E+06	12	8,87E+05
				18	3,91E+07	18	2,25E+07	15	1,27E+06	15	1,02E+06
								18	8,40E+05	18	1,15E+06

Dados concentração de cobre ao longo do tempo:

dia	Concentrações residuais de cobre no meio de cultura (mg/L)			
0	0,7	1,2	4,4	8,9
1	0,7	1	1,1	1,7
2	0,7	1,2	1,3	1,6
4	0,4	0,4	1,4	2
8	0,7	0,9	2,8	1,5
11	0,5	0,7	1,8	1,9
16	0,4	0,7	0,5	1,7
22	0,4	0,4	1,7	2,1

Trabalho apresentado no SINAFERM 2009.



Toxicidade e Bioacumulação de cobre (II) pelas microalgas verdes *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp.

Carolina Barbosa Marini, Dâmaris Porto Amado, Márcia Monteiro Machado Gonçalves¹, Antonio Carlos Augusto da Costa²

Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Instituto de Química/PPG-EQ
Rua São Francisco Xavier 524, Maracanã, 20550-013, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
E-mail: ¹marciamg@uerj.br; ²acosta@uerj.br

RESUMO

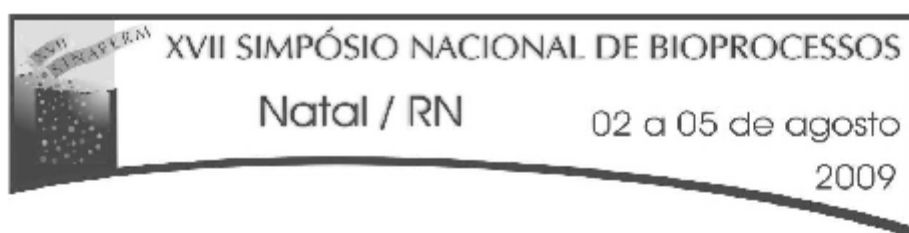
Foram avaliados o efeito tóxico e a bioacumulação de cobre (II) em duas espécies de microalgas, *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp.. O experimento de toxicidade consistiu em inocular as microalgas em meio ASM₁ com e sem a presença de cobre (pH= 8,0, pH= 6,0 isento de cobre e meio em pH=6,0 com concentrações de cobre de 0,7mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L) onde, o efeito tóxico de cobre foi monitorado por contagem celular ao longo do experimento. A bioacumulação do metal foi avaliada pela determinação da concentração de cobre em solução ao longo do experimento. O efeito tóxico do metal foi diretamente proporcional à concentração inicial de cobre (II), pois a medida que aumentou-se a concentração do metal, o crescimento diminuiu. A bioacumulação também teve uma relação direta com a tolerância do micro-organismo ao metal, onde, as concentrações iniciais mais elevadas de cobre em solução apresentaram um maior decaimento e impacto no crescimento. Os resultados obtidos permitem sugerir que cobre (II) tem efeito negativo no fitoplâncton, propondo o emprego das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Monoraphidium* sp. como espécies potenciais para estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: *Scenedesmus* sp.; *Monoraphidium* sp.; Cobre; Toxicidade; Bioacumulação

INTRODUÇÃO

Microalgas e cianobactérias têm sido amplamente recomendadas para biomonitoração de metais pesados e outros poluentes (Tripathi *et al.*, 2003), sendo as microalgas consideradas indicadores sensíveis às alterações ambientais e utilizadas como organismos testes na regulamentação dos níveis de metal no meio aquático (Levy *et al.*, 2007). As microalgas são produtores primários da base da cadeia alimentar aquática e são as primeiras a serem afetadas pela poluição por metais pesados (Satoh *et al.*, 2005). Resultados de testes de toxicidade de metais pesados empregando microalgas fornecem informações importantes para estimar concentrações ecotóxicas e para prever o impacto ambiental da poluição (Satoh *et al.*, 2005).

O cobre é um nutriente essencial para a vida aquática, embora a sensibilidade ao metal varie entre as microalgas (Yan & Pan, 2002), podendo até ser tóxico em concentrações baixas como 1 µg/L (Levy *et al.*, 2007). De acordo com Knauer *et al.* (1997) a toxicidade do cobre deve-se principalmente aos íons livres. As fontes de cobre no meio ambiente podem ser naturais ou



antropogênicas, tais como mineração, fertilizantes, pesticidas, algicidas e tintas anti-incrustantes (Stauber & Daves, 2000).

A bioacumulação de cobre por microalgas consiste numa rápida adsorção dos íons metálicos na superfície celular e numa lenta captação intracelular, dependente de um metabolismo ativo. A 1ª etapa é reversível e ocorre porque a superfície das algas contém um número de grupos funcionais com alta afinidade pelos íons metálicos e possuem uma carga negativa líquida, proveniente principalmente de grupos carboxílicos, fosfáticos e sulfídricos (Knauer *et al.*, 1997). A toxicidade do cobre nas microalgas é geralmente manifestada somente após a captação intracelular do metal (Stauber & Daves, 2000), sendo este processo normalmente irreversível e devido a vários mecanismos, principalmente difusão para o interior da célula e ligação com proteínas e outros sítios (Kuyucak & Volesky, 1989).

O objetivo do presente trabalho foi investigar a toxicidade e a bioacumulação do Cu (II) por duas microalgas verdes (*Scenedesmus* sp. e *Monorraphidium* sp.) em meio de cultura contaminado por quatro concentrações distintas do metal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microalgas

As microalgas da classe *Chlorophyceae*: *Scenedesmus* sp. e *Monorraphidium* sp. Utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Departamento de Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica da UFRJ.

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o meio mineral ASM₁ (Gorhan *et al.*, 1964) enriquecido com solução de vitaminas (B₁₂: 0,5 µg/L, Tiamina: 0,1 mg/L e Biotina: 0,5 µg/L). O pH inicial do meio foi ajustado para 8,0 usando solução 1M de NaOH. O meio e todos os utensílios experimentais foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, à 121°C e pressão de 1,1 atm.

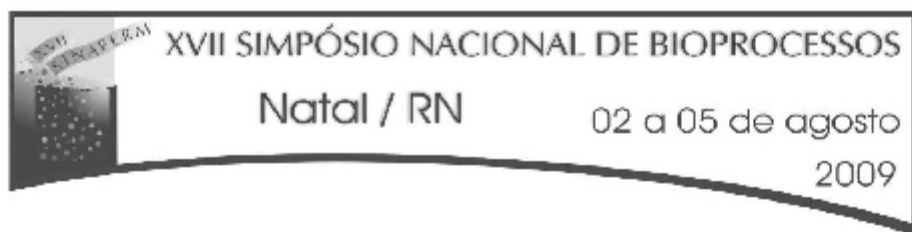
O meio ASM₁ contaminado com metal foi ajustado para pH=6,0, uma vez que em pH=8,0 o metal se precipita na forma de hidróxido de cobre (II).

Condições de cultivo

As microalgas foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 200 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, 0,1 mL de solução de vitaminas e 10 mL de inóculo, em câmara de germinação (347-CDG da marca Fanem) a 23°C, durante ciclo claro-escuro de 12h usando 4 lâmpadas fluorescentes de 20W L.D cada. Solução de cobre (II) de 1088,4 mg/L foi preparada com CuSO₄·5H₂O e água ultrapurificada. Esta solução foi diluída para o preparo do meio de cultura ASM₁ contaminado com o metal em quatro concentrações distintas (0,7 mg/L, 1,2 mg/L, 4,4 mg/L e 8,9 mg/L). Os experimentos foram conduzidos até a fase estacionária de crescimento dos micro-organismos ser atingida (aproximadamente 25 dias).

Medida da concentração de cobre em solução e crescimento das microalgas

A concentração de cobre no meio de cultura foi medida em amostras coletadas ao longo do tempo e filtradas em membrana de éster de celulose de 0,45 µm (*Millipore*). As concentrações de cobre em solução foram determinadas por espectrometria de absorção atômica com chama (Perkin-Elmer AAnalyst 300). O crescimento microalgal foi monitorado por contagem direta



em câmara de contagem Fuchs-Rosenthal por microscópio ótico (Axioskop 40 da marca Zeiss) com objetiva de 20.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Experimentos com *Monoraphidium* sp.

O crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. e a concentração do cobre em solução ao longo do tempo estão apresentados nas Figuras 1 e 2

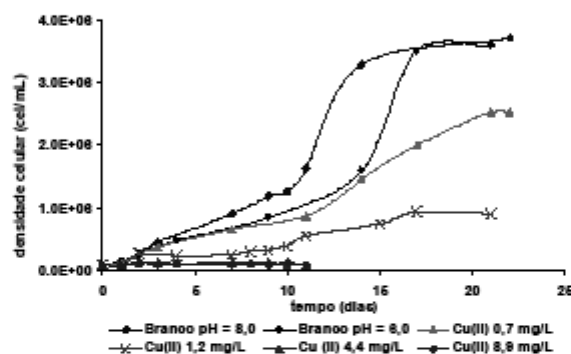


Figura 1: Crescimento de *Monoraphidium* sp. no meio ASM₁ em pH=8,0, no meio ASM₁ em pH=6,0 e no meio ASM₁ com concentrações de cobre de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L.

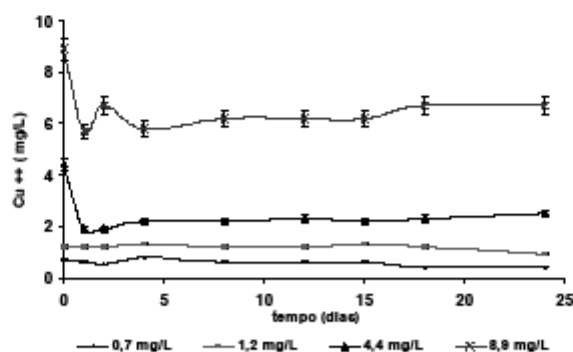
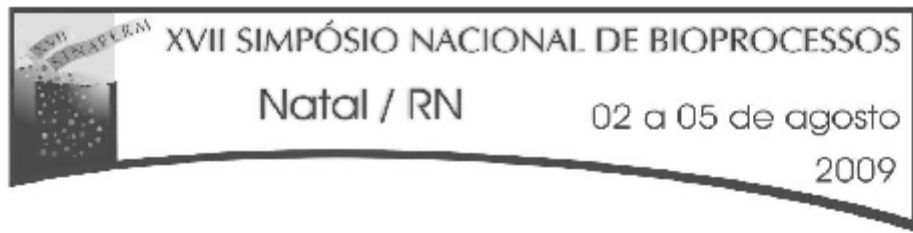


Figura 2: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de *Monoraphidium* sp. nas concentrações iniciais de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L.



De acordo com a Figura 1, o crescimento da microalga em meio isento de metal em pH=8,0 mostrou-se superior ao de pH=6,0. Observa-se que com meio contendo cobre na menor concentração (0,7 mg/L) houve diminuição do crescimento da microalga, mas não ocorreu redução da concentração inicial de cobre (Figura 2), ou seja, não houve bioacumulação. Na concentração de 1,2 mg/L de cobre (II) não foi observada ao longo do crescimento uma fase exponencial definida, sendo que, também não ocorreu diminuição da concentração de cobre (Figura 2). Nas demais concentrações (4,4 mg/L e 8,9 mg/L de cobre (II) inicial) a *Monoraphidium* sp. não cresceu, por outro lado, ocorreu uma redução de 57 % na concentração inicial de cobre (II) de 4,4 mg/L e de 36 % quando a concentração inicial era de 8,9 mg/L.

Experimento com *Scenedesmus* sp.

Os resultados dos experimentos com a *Scenedesmus* sp. estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

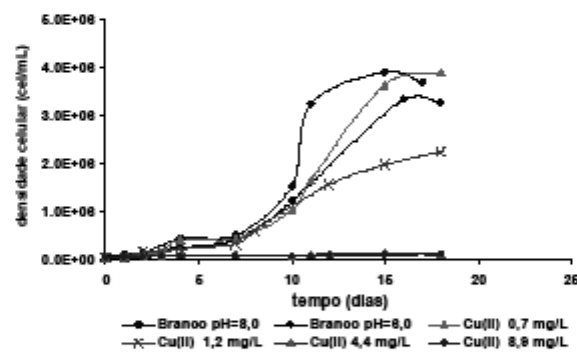


Figura 3: Crescimento de *Scenedesmus* sp. no meio ASM₁ em pH=8,0, no meio ASM₁ em pH=6,0 e no meio ASM₁ com concentrações de cobre de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L.

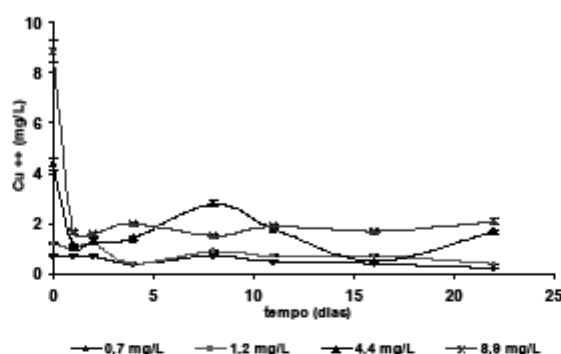
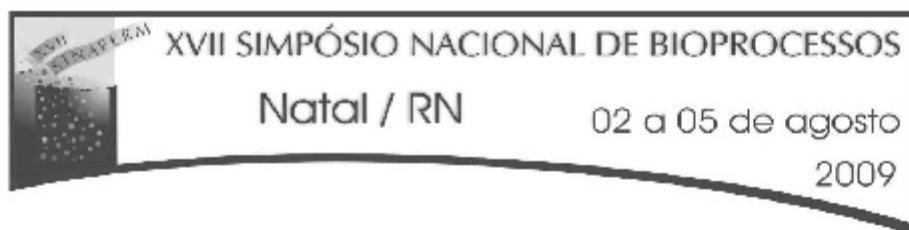
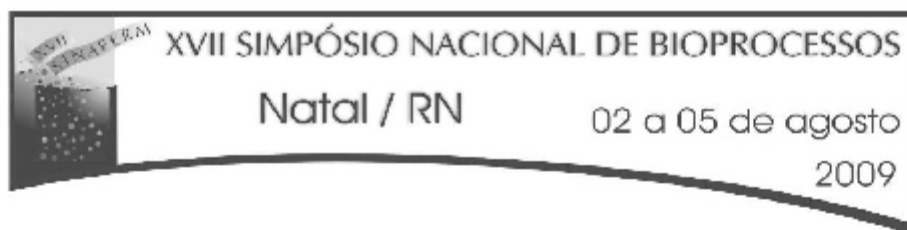


Figura 4: Concentração de Cu (II) em solução ao longo do experimento de *Scenedesmus* sp. nas concentrações iniciais de 0,7 mg/L; 1,2 mg/L; 4,4 mg/L e 8,9 mg/L.

Para a microalga *Scenedesmus* sp., o crescimento em pH=8,0 também mostrou-se superior ao de pH=6,0 (Figura 3). Na concentração de 0,7 mg/L de cobre inicial, o crescimento foi similar ao meio isento de metal, onde não ocorreu diminuição da concentração de cobre no início do experimento (Figura 4). Na concentração de 1,2 mg/L pode-se observar uma redução na fase exponencial de crescimento, (Figura 3), embora não tenha ocorrido diminuição da concentração de cobre inicial. Nas concentrações de 4,4 mg/L e 8,9 mg/L de cobre inicial, *Scenedesmus* sp. também não cresceu como *Monoraphidium* sp. (Figura 1). Por outro lado, verificou-se uma diminuição da concentração de cobre inicial de 4,4 mg/L em 75% e de 80,8 % para a concentração inicial de cobre de 8,9 mg/L.

No estudo de Yan e Pan (2002) foi avaliado o crescimento e a bioacumulação do cobre por *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* e *Closterium línula*. Os autores determinaram a concentração efetiva de cobre que inibe o crescimento da microalga em 50 % em 96h. Uma avaliação do estudo de comportamento das microalgas do estudo de Yan e Pan (2002), revela uma similaridade com este trabalho, onde uma menor acumulação inicial de cobre pelas microalgas pode ser a responsável pela maior tolerância ao metal.

Embora as condições de cultivo, concentrações do metal, e diferentes meio de cultura, pode-se perceber que um acúmulo de metal por diversas microalgas (diminuição da concentração de cobre em solução) inibe o crescimento. Exemplo disso é o trabalho de Mei *et al.* (2002), onde foram examinados o crescimento e a acumulação de cobre por *Scenedesmus subpicatus*, e verificou-se que a concentração intracelular de cobre aumentou de 38,1. µg/L a 114,3. µg/L por célula, quando a inibição do crescimento atingiu cerca de 50%. Outro exemplo é o trabalho de Fargasova *et al.* (1999), que mostrou que a captação de Cu⁺⁺ por *Scenedesmus quadricauda* ficou em 17,6 % quando o crescimento microalgal caiu em 50%.



CONCLUSÕES

Neste estudo, verificou-se que as microalgas *Monoraphidium* sp. e *Scenedesmus* sp. possuem diferentes sensibilidades ao metal cobre (II). No caso de *Monoraphidium* sp., a concentração que inibe o crescimento começa em 0,7 mg/L de cobre. Já para *Scenedesmus* sp., a concentração que começa a inibir o crescimento microbiano, fica em 1,2 mg/L de cobre. Para as concentrações mais elevadas do metal (4,4 mg/L e 8,9 mg/L) o crescimento cessa completamente para ambas as microalgas. Esses resultados possibilitam o uso potencial desses organismos como indicadores ambientais, sejam em estudos de qualidade de água ou no tratamento de efluentes contaminados com metal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fargasova, A.; Bumbálova, A. e Havránek, E. (1999), Ecotoxicological effects and uptake of metals in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* v.38, n.5, p. 1165-1173.
- Franklin, N. M.; Stauber, J. L. e Apte, S. C. e Lim, R. P. (2002), Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology Chemical*, n. 21, p. 742-751.
- Gowrinathan, K. P. e Rao, V. N. R. (1991), Uptake and accumulation of copper by two microalgae. *Phykos*, n. 30, p. 13-8.
- Knauer, K.; Berna, R. e Sigg, L. (1997), Effects of free Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology Chemical*, n. 16, p. 220-229.
- Knauer, K.; Behra, R. e Sing, L. (1997), Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus Subspicatus* (chlorophyta). *Journal of Phycology*, n. 33, p. 596-601.
- Levy, J. L.; Stauber, J. L. E Jolley, D. F. (2007), Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, n. 387, p. 141-154.
- Mei, M.; Zhu, W.; Wang, Z. e Witkamp, G. J. (2002), Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology*, n. 63, p. 221-228.
- Satoh, A.; Vudikaria, L. Q.; Kurano, N. e Miyachi, S. (2005), Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environment International*, n. 31, p. 713- 722.
- Stauber, J. L.; Davies, C. M. (2000), Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Review*, v. 8, p. 255-301.
- Yan, H. e Pan, G. (2002), Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, n. 49, p. 471-476.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)