



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA AMBIENTAL

LAISE DE AZEVEDO GOMES

ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PERFIL BIOACUMULATIVO  
DA CIANOBACTÉRIA *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01  
NA PRESENÇA DE ARSENATO DE SÓDIO

BRAGANÇA/PA

2012

LAISE DE AZEVEDO GOMES

ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PERFIL BIOACUMULATIVO  
DA CIANOBACTÉRIA *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01  
NA PRESENÇA DE ARSENATO DE SÓDIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em  
Biologia Ambiental do Instituto de Estudos Costeiros da  
Universidade Federal do Pará como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Biologia Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Paula Cruz Schneider

BRAGANÇA/PA

2012

LAISE DE AZEVEDO GOMES

ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PERFIL BIOACUMULATIVO  
DA CIANOBACTÉRIA *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01  
NA PRESENÇA DE ARSENATO DE SÓDIO

Este trabalho foi julgado para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Biologia Ambiental da Universidade Federal do Pará - Campus de Bragança.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Paula Cruz Schneider

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Paula Cruz Schneider (Orientadora)

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Dr<sup>a</sup>. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall’Agnol (Titular)

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Titular)

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

---

Dr. Marcelo de Oliveira Lima (Titular)

Instituto Evandro Chagas – IEC

---

BRAGANÇA/PA

2012

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	AS CIANOBACTÉRIAS.....	1
1.2	A ORDEM PSEUDANABAENALES E A ESPÉCIE <i>Geitlerinema unigranulatum</i> .....	4
<b>1.2.1</b>	<b>Representantes em diversos tipos de ambientes</b> .....	6
1.3	O METALÓIDE TÓXICO: ARSÊNIO.....	9
<b>1.3.1</b>	<b>Mecanismos bioquímicos de resistência ao arsênio em micro-organismos</b> .....	14
1.4	ESTUDOS DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM CIANOBACTÉRIAS.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>Geitlerinema unigranulatum</i> UFV-E01.....	24
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CIANOBACTÉRIA <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 AO ARSENATO DE SÓDIO.....	25
<b>3.2.1</b>	<b>Extração e quantificação de clorofila a</b> .....	25
3.3	CURVAS DE CRESCIMENTO DA CIANOBACTÉRIA <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 EXPOSTA E NÃO EXPOSTA AO ARSENATO DE SÓDIO.....	26
3.4	QUANTIFICAÇÃO DO ARSÊNIO TOTAL EXTRACELULAR.....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CIANOBACTÉRIA <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 AO ARSENATO DE SÓDIO.....	29
4.2	CURVAS DE CRESCIMENTO DA CIANOBACTÉRIA <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 EXPOSTA E NÃO EXPOSTA AO ARSENATO DE SÓDIO.....	30
4.3	QUANTIFICAÇÃO DO ARSÊNIO TOTAL EXTRACELULAR.....	35

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

**Aos meus pais e irmãos, porque de nada valeria tudo isso sem vocês.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Paula Schneider, por ter me conduzido ao êxito deste trabalho.

Ao professores, Evonnildo Gonçalves e Agenor Santos, pela prontidão em me ajudar a solucionar os problemas ocorridos durante certos experimentos. À professora Rosane Aguiar por ter cedido a cianobactéria para o desenvolvimento deste estudo.

Ao grupo Lpdna, em especial, ao Rafael Baraúna e à Alessandra Ciprandi pela grande ajuda na realização dos experimentos da proteômica.

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade em subir mais um degrau na minha carreira acadêmica. Ao Instituto Evandro Chagas por disponibilizar o equipamento ICP OES e nos auxiliar nas análises.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, à CAPES, à FAPESPA pelo incentivo financeiro para realização do projeto Bionorte.

Em palavras eu não posso ou, melhor, não consigo descrever o quanto sou grata à senhora Maria de Fátima Azevedo, minha mãe. Apoio, compreensão e amor incondicional eu sempre encontro nos seus braços. A um homem que apesar do jeito rígido de ser, eu depois de “grande”, descobri que é tão doce e que ele, ao sair de casa para trabalho, muitas vezes, põe em prova a sua saúde pensando em dar o melhor para a família. Logo se vê, meu pai, que as suas raízes de muito se orgulham pelo senhor. Aos meus irmãos de sangue e coração, Diego e Tiago, obrigada pelo ombro amigo. Ao meu namorado, Flávio Miranda, pela solicitude, amor e carinho.

Aos meus grandes amigos, Aline Melo, Fábio Daniel e, em especial, à Rafaella Ferreira pela companhia e auxílio no decorrer desses seis anos de amizade.

Enfim, a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

**“Quem acredita sempre alcança”  
(Renato Russo)**

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Classificação taxonômica proposta por Rippka <i>et al.</i> (1979).....	1
<b>Tabela 02</b>	Sistema de classificação proposto por Hoffmann <i>et al.</i> (2005).....	2
<b>Figura 01</b>	<i>Geitlerinema</i> (1000x).....	5
<b>Figura 02</b>	Célula apical (A) e tricoma (B) de <i>G. unigranulatum</i> .....	5
<b>Tabela 03</b>	Cianobactérias pertencentes à ordem Pseudanabaenales que vivem sob condições ambientais extremas.....	8
<b>Figura 03</b>	Ciclo biogeoquímico do arsênio.....	12
<b>Figura 04</b>	Uso do arsenito e arsenato na cadeia respiratória bacteriana.....	13
<b>Figura 05</b>	Mecanismo bioquímico de resistência ao arsênio em <i>E. coli</i> .....	15
<b>Tabela 04</b>	Cianobactérias resistentes ao arsenato.....	17
<b>Tabela 05</b>	Composição do meio de cultura BG11 (ALLEN, 1968).....	24
<b>Tabela 06</b>	Parâmetros do ICP OES.....	28
<b>Figura 06</b>	Perfil da resistência de <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 cultivada sob as concentrações de 0 a 250 mM de arsenato de sódio durante 20 dias.....	30
<b>Figura 07</b>	Curva de crescimento controle da cianobactéria <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 durante 35 dias.....	31
<b>Figura 08</b>	Curva de crescimento da cianobactéria <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 tratada com 50 mM de arsenato de sódio durante 35 dias.....	32
<b>Figura 09</b>	Curva de crescimento da cianobactéria <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 tratada com 150 mM de arsenato de sódio durante 35 dias.....	33
<b>Figura 10</b>	Curvas de crescimento da cianobactéria <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 cultivada sob diferentes concentrações de arsenato de sódio: 0, 50 e 150 mM.....	34
<b>Figura 11</b>	Arsênio total extracelular em cinco tempos de crescimento da cianobactéria <i>G. unigranulatum</i> UFV-E01 preincubada com 50 mM de arsenato de sódio.....	36

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Arr: Arsenato redutase respiratória

ArrA: Arr subunidade A

ArrB: Arr subunidade B

*ars*: Região gênica que confere resistência ao arsênio

*arsA*: Gene que codifica ArsA

ArsA: ATPase que conduz o efluxo de arsenito

*arsB*: Gene que codifica ArsB

ArsB: Permease membrana para o efluxo do arsenito

*arsC*: Gene que codifica ArsC

ArsC: Arsenato redutase

*arsD*: Gene que codifica uma proteína que transfere o arsenito para ArsA

*arsH*: Gene que codifica uma proteína com função desconhecida

*arsI*: Gene que codifica ArsI

ArsI: Proteína da família de arsenato redutase de *E. coli*

ArsR: Proteína reguladora do operon *ars*

Arr3: Transportador de membrana de arsenito

As: Arsênio

As(-III): Arsina

As(0): Arsênio elementar

As(III),  $\text{AsO}_3^{3-}$  ou +3: Arsenito

As(V),  $\text{AsO}_4^{3-}$  ou +5: Arsenato

Aso ou Aox: Arsenito oxidase respiratória

ATP: Adenosina trifosfato

BG11: Meio de cultura para algas cianofíceas

*cpcBA*: Região gênica ficocianina subunidade alfa e beta

DMA: Ácido dimetilarsênico

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DO: Densidade Ótica

FBN: Fixação biológica do nitrogênio

GlpF: Facilitador glicerol

Grx: Glutaredoxina

GSH: Glutathiona reduzida

Hg(0): Mercúrio elementar ou metálico  
Hg(II): Mercúrico  
ICP OES: Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Induzido  
L/min: Litro por minuto  
m: Metro  
mg/kg: Miligrama por quilograma  
mL: Mililitro  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
MMA: Ácido monometilarsênico  
nm: Nanômetro  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
pH: Potencial Hidrogeniônico  
PhoS: Proteína periplasmática que se ao fosfato para o transporte  
Pit: Transportador de fosfato inorgânico  
ppm: Parte por milhão  
ppb: Parte por bilhão  
Pst: Transportador específico de fosfato  
PstB: Proteína que se liga ao ATP para o transporte de fosfato  
PstC: Proteína permease do transporte de fosfato  
qm: Quantidade máxima  
rRNA 16S: Ácido Ribonucléico ribossomal subunidade 16S  
rpm: Rotação por minuto  
s: Segundo  
Sb(III): Antimonito  
*smtA*: Gene que codifica metalotioneína  
UV: Ultravioleta  
W: watt  
 $\beta$ -HgS: Sulfeto de mercúrio  
 $\mu\text{g/L}$ : Micrograma por litro  
 $\mu\text{g/mL}$ : Micrograma por mililitro  
 $\mu\text{L}$ : Microlitro  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar  
 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : Micromol por metro por segundo ao quadrado

## RESUMO

O arsênio é um metalóide tóxico que se tornou um problema de saúde pública em todo o mundo. Como forma de reduzir a contaminação ambiental por este metalóide, a qual é proveniente de atividades antropogênicas e naturais, a utilização de microrganismos em processos de biorremediação se tem mostrado uma estratégia promissora. A cianobactéria filamentosa homocitada, *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01, pertencente à ordem Pseudanabaenales, foi isolada de um ambiente contaminado por arsênio, sugerindo uma habilidade em lidar com o efeito tóxico deste metalóide. Com vista nisso, o presente trabalho objetivou caracterizar a resistência ao arsenato de sódio e quantificar o arsênio total extracelular da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01. As análises de resistência ao arsenato de sódio revelaram que a cianobactéria foi capaz de crescer em até 50 mM por 20 dias. Além disso, a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 acumulou arsenato de sódio por 10 dias, reduzindo em até 67% o arsênio extracelular. Pelos dados obtidos neste estudo, a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 foi capaz de resistir a altas concentrações de arsenato de sódio, no entanto outras análises, como a caracterização das vias metabólicas envolvidas no processo de resistência, devem ser realizadas para considerar sua aplicação em ambientes impactados por arsênio.

Palavras-chaves: arsenato, cianobactéria, biorremediação.

## ABSTRACT

Arsenic is a toxic metalloid that has become a public health problem worldwide. In order to reduce the environmental contamination by this metalloid, which is derived from natural and anthropogenic activities, the use of micro-organisms in bioremediation process has shown to be a promising strategy. A filamentous homocitada cyanobacterium belonging to the order Pseudanabaenales, *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01, was isolated from an environment contaminated by arsenic, suggesting an ability to deal with the toxic effect of this metalloid. In view of this, this study aimed to characterize the resistance to sodium arsenate and quantify the total arsenic extracellular cyanobacterium *G. unigranulatum* UFV-E01. Analyses of sodium arsenate resistance showed that the cyanobacterium was able to grow in 50 mM for 20 days. Furthermore, the cyanobacterium *G. unigranulatum* UFV-E01 accumulated sodium arsenate for 10 days, reducing up to 67% arsenic extracellular. From the data obtained in this study, the cyanobacterium *G. unigranulatum* UFV-E01 was able to withstand high concentrations of sodium arsenate, although other analysis, the characterization of the metabolic pathways involved in the resistance must be taken to consider their use in environments impacted by arsenic.

Keywords: arsenate, cyanobacteria, bioremediation.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são procariotos fotoautotróficos e, provavelmente, compreendem as primeiras formas de vida encontradas na Terra (SCHOPF, 2000). Devido à sua longa história evolutiva, estes organismos desenvolveram os mais variados mecanismos de sobrevivência, tornando-se um grupo monofilético diverso dentro da radiação bacteriana (ABED *et al.*, 2009). O termo cianobactéria é atribuído a estes micro-organismos por apresentarem características de algas eucarióticas e de bactérias. As cianobactérias apresentam clorofila *a* e outros pigmentos fotossintetizantes, organizados nos tilacóides, e produzem oxigênio como as algas eucarióticas. Por outro lado, assim como as bactérias, as cianobactérias não apresentam membrana nuclear e plastos, e sua parede celular é similar a das bactérias Gram-negativas (DE SOUZA, 2006; WHITTON & POTTS, 2000).

Na antiga classificação taxonômica o filo estava organizado em cinco grupos principais propostos por Rippka *et al.* (1979), são eles: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales (Tabela 01).

**Tabela 01.** Classificação taxonômica proposta por Rippka *et al.* (1979).

<b>Classificação</b>	<b>Características</b>
<b>Chroococcales</b>	Unicelulares, reprodução por fissão binária ou brotamento
<b>Pleurocapsales</b>	Unicelulares a pseudofilamentosas, reprodução por fissão múltipla
<b>Oscillatoriales</b>	Filamentosas homocitadas e reprodução por fragmentação do tricoma e fissão binária
<b>Nostocales</b>	Filamentosas heterocitadas, reprodução por fragmentação do tricoma, por formação de hormogônia e por germinação de acinetos, e divisão por fissão binária
<b>Stigonematales</b>	Filamentosas heterocitadas, reprodução por fragmentação do tricoma, por formação de hormogônia e por germinação de acinetos, e divisão por fissão binária em planos múltiplos

Recentemente, foi proposto um sistema de classificação polifásico, onde esforços foram direcionados para compilar informações morfológicas, ecológicas, bioquímicas, ultraestruturais, genéticas e filogenéticas. Diante do exposto, Hoffmann *et al.* (2005) propuseram uma nova classificação taxonômica de cianobactérias, considerando as abordagens botânica e bacteriológica, onde estes microorganismos foram reagrupados em quatro subclasses e em seis ordens (Tabela 02). Neste sistema de classificação, as cianobactérias são agrupadas de acordo com a semelhança genética, morfológica e arranjo dos tilacóides, nas ordens: Gloeobacterales, Synechococcales, Pseudanabaenales, Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales.

**Tabela 02.** Sistema de classificação proposto por Hoffmann *et al.* (2005).

<b>Classificação polifásica de Hoffmann <i>et al.</i> (2005)</b>	
<b>Classificação</b>	<b>Características</b>
<b>Subclasse Gloeobacterophycidae</b>	Cocóides sem tilacóides
<b>Ordem Gloeobacterales</b>	
<b>Subclasse Synechococcophycidae</b>	Tilacóides paralelos à superfície da célula
<b>Ordem Synechococcales</b>	Unicelulares ou coloniais
<b>Ordem Pseudanabaenales</b>	Filamentos finos
<b>Subclasse Oscillatoriohycidae</b>	Tilacóides radiais
<b>Ordem Chroococcales</b>	Unicelulares ou coloniais
<b>Ordem Oscillatoriales</b>	Filamentos largos
<b>Subclasse Nostochophycidae</b>	Filamentosas heterocitadas e arranjo irregular dos tilacóides
<b>Ordem Nostocales</b>	

A diversidade morfológica das cianobactérias é bastante variável compreendendo de unicelular a multicelular, de cocóides a filamentosas ramificadas.

Em relação à coloração estão entre quase pálido à intensamente pigmentadas e quanto à forma de obtenção de energia podem ser autotróficas ou heterotróficas. Além disso, podem se estender de psicrófilos a termofílicos, acidófilos a basófilos, planctônicos a barofílicos (THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005). A maioria das cianobactérias são mesofílicas, possuindo um crescimento ótimo em ambientes onde a temperatura varia de 20 a 35°C e a temperatura máxima permissível ao crescimento é menor que 45°C (WATERBURY, 2006). Em ambientes onde o potencial hidrogeniônico é neutro ou alcalino, as cianobactérias são mais proeminentes (WATERBURY, 2006).

A perpetuação das cianoabactérias pode ser atribuída às adaptações desenvolvidas para suportarem ambientes adversos, entre estas adaptações estão: a fixação biológica do nitrogênio – FBN, catalisada pela enzima nitrogenase presente nos heterocistos, a regulação da flutuabilidade pelos aerótopos (vesículas gasosas), a captação de luz pelos pigmentos (clorofila *a*, principalmente, e pigmentos acessórios), o armazenamento de nutrientes (acinetos), a bainha de mucilagem (proteção contra dessecação e agente antibacteriano) e os tipos celulares diferenciados por reprodução (KAEBERNICK & NEILAN, 2001; WALSBY, 1994; WATERBURY, 2006).

Devido à sua grande plasticidade ecológica, dentre todos os organismos fotossintéticos, as cianobactérias provavelmente apresentam a maior variedade de habitats. Elas são encontradas desde ambientes terrestres aos aquáticos (marinho e dulcícola), ambientes simbióticos, com distribuição ubíqua no planeta (BADGER *et al.*, 2006). Além disso, são capazes de crescer em ambientes extremos como fontes termais, desertos quentes e gelados, toleram altas radiações UV, temperaturas de até 73°C, pH de 4,0 (WARD & CASTENHOLZ, 2000) e salinidade de 200 ppm ou mais (OREN, 2000). Kirkwood *et al.* (2008) relataram que as cianobactérias, encontradas em ambientes hipersalinos, como as Planícies Great Salt em Oklahoma, são expostas à alta salinidade e às condições dessecantes e, simultaneamente, devem lidar com mudanças na salinidade e temperatura devido à variação na disponibilidade de água com a ocorrência de chuva e/ou inundação.

As cianobactérias também possuem mecanismos para tolerar concentrações elevadas de metais pesados, baixas concentrações de oxigênio (WHITTON & POTTS, 2000) e a habilidade ímpar de absorver íons metálicos de soluções aquosas

pela biomassa microbiana mesmo que as células estejam mortas (RANGSAYATORN *et al.*, 2002).

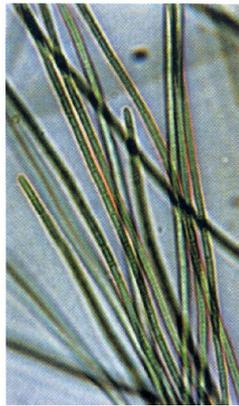
Estes micro-organismos também constituem uma rica fonte de compostos biologicamente ativos com atividades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas. Adicionalmente, algumas linhagens possuem a capacidade de acumular polihidroxialcanoatos, o qual pode ser usado como um substituto para o plástico biologicamente não-degradável. Além desses, o potencial biotecnológico das cianobactérias inclui o uso em maricultura, indústria de alimentos, combustível, fertilizantes, corantes e produção de vários metabólitos secundários incluindo toxinas, vitaminas e enzimas (ABED *et al.*, 2009).

Mesmo com tantos trabalhos sobre cianoabactérias, os registros das últimas décadas focaram a sua ecologia, morfologia, fisiologia e filogenia baseada no gene rRNA 16S, no entanto, poucas pesquisas são direcionadas para o seu potencial uso em biotecnologia (ABED *et al.*, 2009).

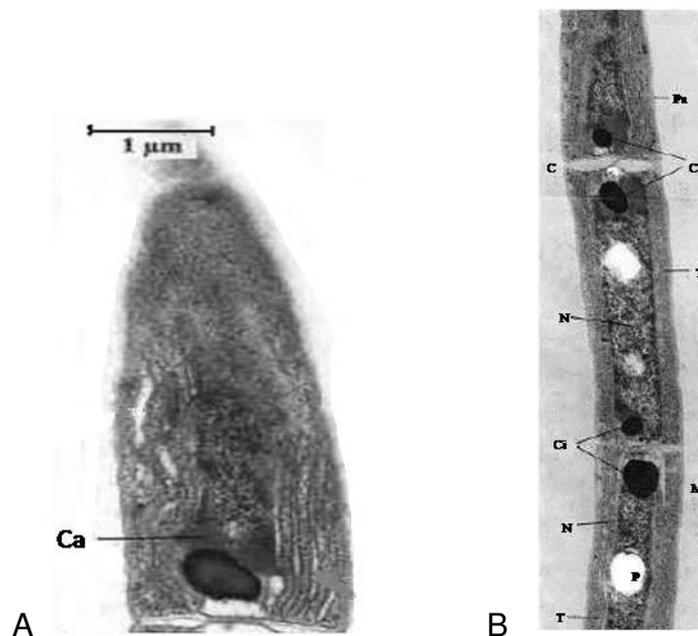
## 1.2 A ORDEM PSEUDANABAENALES E A ESPÉCIE *Geitlerinema unigranulatum*

A espécie *Geitlerinema unigranulatum* (R.N. Singh, 1939) pertence à classe Cyanobacteria, à subclasse Synechococcophycideae, à ordem Pseudanabaenales, à família Pseudanabaenaceae e ao gênero *Geitlerinema* (HOFFMANN *et al.*, 2005).

As cianobactérias pertencentes à ordem Pseudanabaenales são filamentosas sem diferenciação celular ou homocitadas (HOFFMANN *et al.*, 2005). As espécies do gênero *Geitlerinema* (Figura 01) são cosmopolitas e ocorrem em habitats variados, tais como água doce (RIPPKA *et al.*, 1979) e ambientes marinhos (MARGHERI *et al.*, 2003). Komárek & Azevedo (2000), em suas pesquisas de cunho morfológico, ecológico e ultra-estrutural, mostraram que a espécie *G. unigranulatum* se reproduz pela fragmentação do tricoma formando as hormogônias, que em certas situações são móveis, porém a fragmentação se dá sem células necrídicas. As células apicais são cilíndricas e arredondadas, os tricomas são mais longos do que largos, mais retos que ondulados e a mucilagem é fina (Figura 02).



**Figura 01** - *Geitlerinema* (1000x). Fonte: Sant'anna & Azevedo (2006).



**Figura 02** – Célula apical (A) e tricoma (B) de *G. unigranulatum*. Ca: carboxissomos, Pa: parede celular, C: constrição na parede celular, Ci: grânulos de cianoficina, T: tilacóides, N: nucleoplasma, M: mucilagem, P: grânulos de polifosfato. Figura adaptada de Komárek & Azevedo (2000).

No mais Komárek & Azevedo (2000) descreveram que os tricomas das cianobactérias do gênero *Geitlerinema* raramente são solitários, podendo formar biofilme e não possuem aerótopos. De acordo com López-Cortés *et al.* (2001), a partir da observação microscópica das células, as linhagens desse gênero são nitidamente móveis.

A partir da análise morfológica, da ultra-estrutura celular e do sequenciamento da região gênica *cpcBA* em *Geitlerinema*, Bittencourt-Oliveira *et al.* (2009) não

encontraram diferenças entre *Geitlerinema amphibium* e *Geitlerinema unigranulatum*, sugerindo que podem se tratar de uma única espécie. Em seus resultados, a forma das células apicais mostrou-se arredondada-cônica e apresentaram grânulos de cianoficina (local de armazenamento de nitrogênio). As linhagens mostraram um ou dois, raramente três ou quatro, grânulos de cianoficina, o número de tilacóides arranjados perifericamente variou de dois a cinco, apresentaram parede celular delgada, tilacóides com arranjo triangular ou poliedral, inclusões de carotenóides próximas à parede celular e raros corpos de polifosfato. Segundo Bittencourt-Oliveira *et al.* (2009), a pequena quantidade de corpos de polifosfato pode estar relacionada com a fase de crescimento exponencial e com concentração de nutrientes usada no estudo.

Das linhagens analisadas, Bittencourt-Oliveira *et al.* (2009) observaram que *G. unigranulatum* BCCUSP96 apresentou características peculiares distintas, tais como, alguns tricomas com quatro grânulos por célula, alta razão entre o comprimento e a largura da célula, um leve espessamento na parede celular apical, parede celular ondulada e presença de inclusões citoplasmáticas não-identificadas similares aos grânulos de polissacarídeos distribuídos por toda a célula.

Um total de oito linhagens de *G. amphibium* e *G. unigranulatum* e três sequências obtidas do GenBank (AF212923, AM048623, AM048624) formaram um grupo monofilético, portanto, conforme os dados morfológicos, ultra-estruturais e de sequenciamento de DNA, *G. unigranulatum* é um sinônimo de *G. amphibium* (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Sobre a produção de metabólitos secundários, estudos recentes indicam que este gênero possui a capacidade de produzir microcistina (RICHARDSON *et al.*, 2007) e toxinas do grupo microcistina/nodularina (GANTAR *et al.*, 2009). Caicedo *et al.* (2010) demonstraram que *Geitlerinema* Flo1 foi capaz de produzir altas quantidades de moléculas bioativas com potencial antimicrobiano e que esta habilidade coincidiu com o maior consumo de nitrato.

### **1.2.1 Representantes em diversos tipos de ambientes**

Estudos têm demonstrado que espécies da ordem Pseudanabaenales são capazes de viver sob condições ambientais extremas (Tabela 03), tais como variação na concentração de sal (BANERJEE *et al.*, 2009; DORADOR *et al.*, 2008;

KIRKWOOD *et al.*, 2008; TATON *et al.*, 2006), temperatura muito baixa (DORADOR *et al.*, 2008) ou em fontes termais (BANERJEE *et al.*, 2009; LÓPEZ-CORTÉS *et al.*, 2001) e altas radiações UV (DORADOR *et al.*, 2008).

Em um esforço coletivo para estimar a diversidade de cianobactérias originárias das Planícies Great Salt, em Oklahoma, um ambiente terrestre hipersalino, Kirkwood *et al.* (2008) demonstraram que algumas linhagens pertencentes ao gênero *Geitlerinema* foram as únicas que apresentaram uma taxa de crescimento similar em salinidades que variaram de 1 a 17,5%. Destas linhagens, uma teve um crescimento significativo em 15% de NaCl o que evidencia um caráter halofílico.

Em seus dados filogenéticos, usando o gene rRNA 16S, Kirkwood *et al.* (2008) revelaram que as Planícies Great Salt possuem um amplo espectro de diversidade filogenética baseada na análise parcial do gene 16S rRNA, na qual a pluralidade dos isolados e dos clones ambientais agrupou com as sequências de *Geitlerinema* ou com as sequências de *Phormidium* do GenBank. É válido ressaltar, que as linhagens de *Pseudanabaena* (ordem Pseudanabaenales) mostraram-se halotolerantes ou ainda halofílicas.

A persistência de espécies do gênero *Geitlerinema* não tem sido somente observada em condições de estresse por alto teor de sal. Dorador *et al.* (2008) foram mais além e demonstraram que *Geitlerinema carotinosum* AICB 37 possui alta plasticidade ecológica por suportar variações na concentração de sal, baixas temperaturas e alta radiação UV em Salar de Huasco (3800 m de altitude) localizado no Chile.

Por sua vez, López-Cortés *et al.* (2001) usando uma abordagem polifásica para revelar a diversidade de cianobactérias em Baixa Califórnia (México), encontraram linhagens do gênero *Geitlerinema* ocorrendo em um hábitat adverso, onde a temperatura das fontes hidrotermais varia de 41°C a 58°C e na presença de enxofre elementar, arsênio e manganês.

Além disso, cianobactérias da ordem Pseudanabaenales também têm sido encontradas na Antártica. A diversidade de cianobactérias de diferentes regiões na Antártica Oriental foi documentada por Taton *et al.* (2006). As amostras deste trabalho foram obtidas dos Lagos Reid, Heart, Rauer e do Lago Ace, que variam, principalmente, na salinidade. Taton *et al.* (2006) encontraram treze gêneros de cianobactérias, dos quais quatro pertencem à ordem já mencionada: *Arthronema* sp.

(Lago Reid), *Geitlerinema deflexum* (Lago Ace), *Leptolyngbya antarctica* e *Leptolyngbya frigida*, ambas encontradas em todos os lagos, e *Schizothrix* sp. no Lago Heart.

**Tabela 03.** Cianobactérias pertencentes à ordem Pseudanabaenales que vivem sob condições ambientais extremas.

<b>Cianobactérias</b>	<b>Ambientes extremos</b>	<b>Referências</b>
<b><i>Arthronema</i> sp.</b>	Oligosalino	Taton <i>et al.</i> (2006)
<b><i>Geitlerinema</i> sp.</b>	Hipersalino	Kirkwood <i>et al.</i> (2008)
	Fontes hidrotermais	López-Cortés <i>et al.</i> (2001)
<b><i>Geitlerinema carotinosum</i> AICB 37</b>	Salinidade variável, baixas temperaturas e alta radiação UV	Dorador <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Geitlerinema deflexum</i></b>	Salino ou hipersalino	Taton <i>et al.</i> (2006)
<b><i>Halomicronema</i> sp. SCyano39</b>	Salinidade variável, baixas temperaturas e alta radiação UV	Dorador <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Leptolyngbya</i> sp.</b>	Hipersalino e fonte termal	Banerjee <i>et al.</i> (2009)
<b><i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12</b>	Salinidade variável, baixas temperaturas e alta radiação UV	Dorador <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Leptolyngbya Antarctica</i></b>	Salinidade variável, baixas temperaturas e alta radiação UV	Dorador <i>et al.</i> (2008)
	Hiposalino, oligosalino e hipersalino	Taton <i>et al.</i> (2006)
<b><i>Leptolyngbya frigida</i></b>	Hiposalino, oligosalino e hipersalino	Taton <i>et al.</i> (2006)
<b><i>Pseudanabaena</i> sp.</b>	Hipersalino	Kirkwood <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Schizothrix</i> sp.</b>	Oligosalino	Taton <i>et al.</i> (2006)

### 1.3 O METALÓIDE TÓXICO: ARSÊNIO

O arsênio (As) é um dos metalóides mais tóxicos encontrados na natureza, e é proveniente de fontes antropogênicas e geoquímicas (AZEVEDO *et al.*, 2008). Este metalóide onipresente no ambiente, ocorre sob 200 formas diferentes de minerais (MANDAL & SUZUKI, 2002) e é normalmente encontrado em pequenas quantidades (1,5 a 2 mg/kg) nas rochas (CONCHA *et al.*, 2006). Com base nas normas brasileiras que determinam a qualidade da água, o valor limite máximo de arsênio inorgânico na água para consumo humano é 10 µg/L ou 0,00013 mM (BRASIL, 2008). A Austrália possui a norma nacional mais rigorosa no que diz respeito à concentração de arsênio na água potável aceitável para o consumo humano, estabelecendo um limite de 7 µg/L. Esse valor é consideravelmente discrepante, quando comparado aos 50 µg/L que foram definidos como limite em Nepal e em Bangladesh (ASADULLAH & CHAUDHURY, 2011; THAKUR *et al.*, 2011).

De acordo com Carepo *et al.* (2004), o arsênio é liberado e/ou utilizado pelas seguintes atividades antropogênicas: mineração, produção de vidro, indústrias de semicondutores e chip de computador, inseticidas, rodenticidas, herbicidas e alguns outros tipos de agroquímicos. Além disso, compostos que contêm arsênio são amplamente usados na medicina e como aditivos alimentares para animais (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002). Há relatos de que o arsênio também foi utilizado na produção e no armazenamento de armas químicas de bases militares antigas no leste da Europa (OREMLAND & STOLZ, 2003).

Existem vários registros de contaminação ambiental por arsênio. Mandal & Suzuki (2002) agruparam alguns países de acordo com a fonte de contaminação por arsênio: natural (Taiwan, Chile, Índia, México, Argentina, Estados Unidos, Canadá, Hungria, Nova Zelândia, Polônia, Alaska, Espanha, Sri Lanka, China, Bangladesh, Japão e Vietnã), industrial (Tailândia, Filipinas, Japão, Índia, Austrália, Checoslováquia, Canadá, Grécia, Gana, Estados Unidos, Rodésia, México, Suécia, Escócia e Bulgária) e alimentos e bebidas (Japão, Inglaterra, Alemanha e China).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dentre esses países, em Bangladesh a contaminação da água potável por arsênio representa a pior catástrofe ambiental na história humana (JOHNSTON *et al.*, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2006). A contaminação maciça por arsênio neste país está relacionada às

instalações de tubos hidráulicos e à conseqüente distribuição de água contendo altas concentrações de arsênio (ASADULLAH & CHAUDHURY, 2011). Estima-se que em Bangladesh 57 milhões de pessoas foram cronicamente expostas às águas-subterrâneas com concentração de arsênio excedendo o padrão estabelecido pela OMS (CHEN *et al.*, 2011).

No Brasil, a contaminação ambiental conduzida pelo arsênio é proveniente de atividades como mineração do ouro (Quadrilátero Ferrífero), mineração do chumbo e do zinco (Vale do Ribeira SP-PR) e mineração do manganês (Amazonas e a área de Santana – AP) (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2003).

Em um levantamento de dados sobre concentração de arsênio em rios da Amazônia, Scarpelli (2005) relatou que proporções consideráveis de arsênio no Rio Amazonas são oriundas dos Andes e que, provavelmente, estão relacionadas com a mineralização do ouro e de certos metais em elevadas altitudes nas montanhas andinas. Em termos quantitativos, mais de cinco toneladas de arsênio são transportadas anualmente para o Oceano Atlântico (SCARPELLI, 2005).

O arsênio existe na natureza em quatro estados de oxidação, As(-III), As(0), As(III) e As(V), o que torna este um metalóide presente em várias condições ambientais e, simultaneamente, dificulta as técnicas de remediação ambiental (TSAI *et al.*, 2009). As duas principais formas de liberação natural do arsênio são a erupção vulcânica (MATSCHULLAT, 2000) e o intemperismo das rochas (PFEIFER *et al.*, 2002). A partir do momento em que o arsênio é liberado, em condições oxidantes, a forma química arsenato [+5, As(V),  $\text{AsO}_4^{3-}$ ] pode ser obtida do arsenito [+3, As(III),  $\text{AsO}_3^{3-}$ ], em condições anaeróbicas forma-se arsenito (CAREPO *et al.*, 2004; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002) e o arsênio elementar [As(0)] em um ambiente extremamente redutor, este dentre os três é o mais nocivo (TURPEINEN *et al.*, 2002).

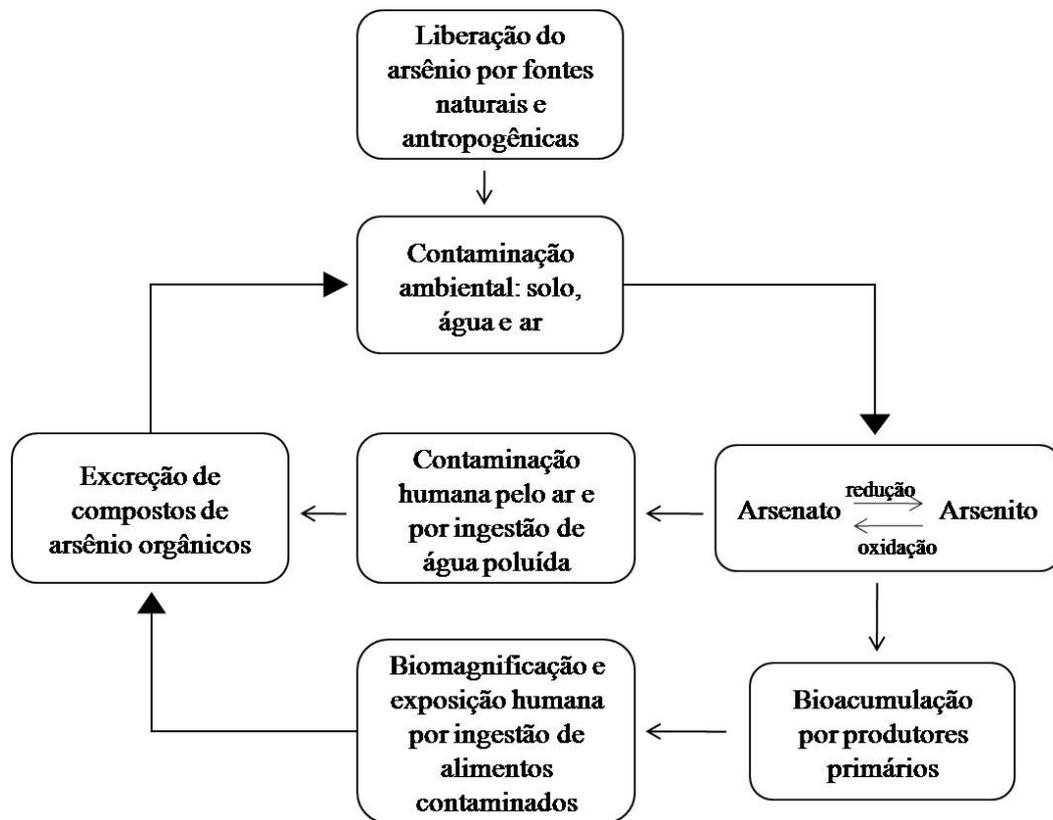
A forma inorgânica do arsênio predominante na água, o arsenato, é fortemente adsorvida à superfície de diversos minerais, uma propriedade que restringe a mobilidade hidrológica do arsenato, ao passo que, o arsenito é pouco adsorvido e, desta forma, no ambiente aquático é mais móvel que o arsenato (OREMLAND & STOLZ, 2003). Dependendo da condição físico-química do meio, alguns compostos de arsênio podem ser facilmente solubilizados na água

(OREMLAND *et al.*, 2005) e captados por micro-organismos, resultando em altos níveis de biodisponibilidade (BRYAN *et al.*, 2009).

Organismos marinhos como algas, crustáceos e peixes biotransformam o arsenato em compostos orgânicos (formas metiladas - biometilação), podendo ainda armazená-lo na forma de arsenoaçúcares e arsenolipídios que são convertidos em arsenobetaína e esta, posteriormente, é excretada ou não (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002) (Figura 03). Na dinâmica da transformação do arsênio pelas algas, o arsenato é reduzido ao arsenito, o qual é, então, metilado ao ácido monometilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsênico (DMA) (HELLWEGGER *et al.*, 2003). A arsenobetaína é a espécie mais comum de organoarsênio em animais marinhos e os arsenoaçúcares são as principais espécies de arsênio encontradas em plantas (WANG & ZHAO, 2009). No ambiente também são encontradas as arsinas metiladas que, por serem voláteis, são rapidamente liberadas para atmosfera (TSAI *et al.*, 2009).

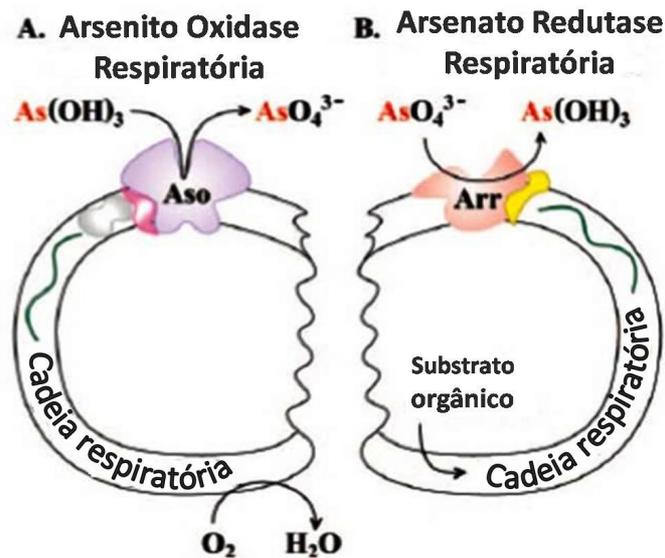
A exposição humana ao arsênio ocorre através das vias respiratória (poeira e fumaça), oral (água e alimentos) e, ocasionalmente, dérmica. O arsênio pode ser acumulado principalmente, na pele, cabelo e unhas, e excretado pela urina, fezes e, em menor quantidade, pelo suor (BARRA *et al.*, 2000; MANDAL & SUZUKI, 2002; MATSCHULLAT *et al.*, 2000). A exposição prolongada ao metalóide acarreta em conjuntivite, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, e pode evoluir a um câncer de pele, pulmão, bexiga e rins (CERVANTES *et al.*, 1994; BARRA *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000).

O arsenito, especificamente, liga-se aos receptores hormonais, interferindo na sinalização normal da célula (KALTREIDER *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que diferentes formas químicas do arsenito são capazes de danificar proteínas, lipídeos e DNA, o que provavelmente é a causa direta da carcinogenicidade do arsenito (LIU *et al.*, 2001). De acordo com um estudo conduzido por Wasserman *et al.* (2004) em Bangladesh, a ingestão de água potável contaminada por arsênio foi associada com a redução da função intelectual de crianças de 10 anos.



**Figura 03** - Ciclo biogeoquímico do arsênio.

Na presença de oxigênio, alguns micro-organismos obtêm energia pela oxidação do arsenito, que funciona como um doador de elétron no início da cadeia respiratória. Neste processo, a enzima arsenito oxidase respiratória (Aso ou Aox) é responsável por catalisar a oxidação do arsenito ao arsenato. Por outro lado, o arsenato pode agir como um receptor de elétron terminal na cadeia respiratória anaeróbica, onde a arsenato redutase respiratória (Arr) reduz arsenato ao arsenito pela atividade da subunidade ArrA, e ArrB promove a transferência dos elétrons (MESSENS & SILVER, 2006; SILVER & PHUNG, 2005) (Figura 04).



**Figura 04** – Uso do arsenito e arsenato na cadeia respiratória bacteriana. Figura adaptada de Silver & Phung (2005).

Um aspecto da química do arsênio, relevante para a atividade biológica é a reatividade do arsenito, que é capaz de formar fortes ligações com grupos funcionais tais como os grupos sulfidrilas dos resíduos de cisteína e o nitrogênio imidazólico dos resíduos de histidina. Esta propriedade confere ao arsenito maior toxicidade que o arsenato (ROSEN, 2002).

Pela similaridade química entre o arsenato e o fosfato, é possível a passagem do arsenato para o meio intracelular, utilizando o sistema de transporte de fosfato (CAREPO *et al.*, 2004). O arsenato pode, então, ser um substrato alternativo do fosfato inorgânico em muitas reações enzimáticas, levando à alteração de vários processos celulares (GONG *et al.*, 2009), incluindo a fosforilação oxidativa (OREMLAND *et al.*, 2009). Como forma de proteção à toxicidade do arsênio, alguns micro-organismos desenvolveram um mecanismo de resistência ao arsênio, que é conferida pelas proteínas codificadas pelo operon *ars*. A proteína *ArsR* controla os níveis basais de expressão do operon *ars*, o gene *arsB* codifica uma permease membrana, que é responsável pelo efluxo do arsenito a partir da energia do potencial de membrana, e o produto do gene *arsC* é uma arsenato redutase, que catalisa a redução do arsenato para arsenito, sendo este eliminado pela permease *ArsB* (CAREPO *et al.*, 2004; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002).

Segundo Rosen (2002), o arsenito pode ser tanto transportado para fora da célula como para o interior de um vacúolo através de transportadores específicos. A

redução de um íon menos tóxico (arsenato) em um mais tóxico (arsenito), provavelmente está relacionada ao sistema de detoxificação do arsenito que surgiu primeiro, quando a atmosfera primordial ainda não era oxidante e, portanto, a respiração era anaeróbica. A forma oxidada arsenato só surgiu quando a atmosfera tornou-se rica em oxigênio molecular (SILVER & PHUNG, 2005).

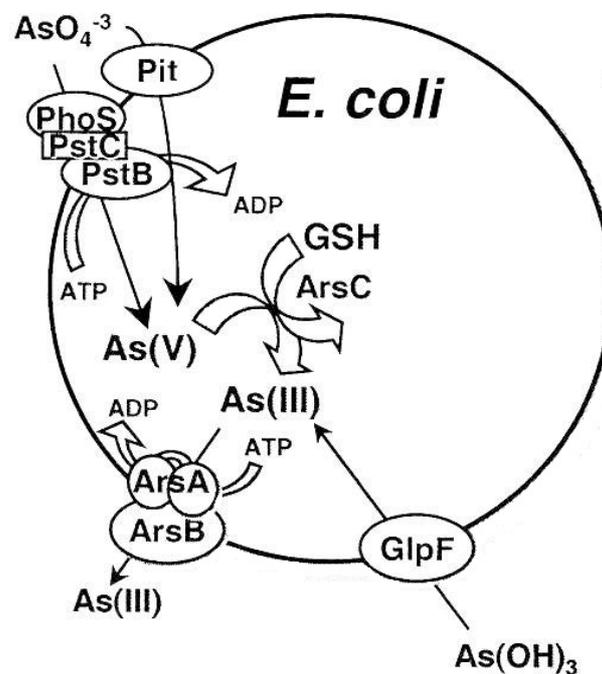
### **1.3.1 Mecanismos bioquímicos de resistência ao arsênio em micro-organismos**

Como estratégia de sobrevivência, a bactéria *Escherichia coli* apresenta dois transportadores de fosfato, compreendendo os sistemas Pit, transportador de fosfato inorgânico, e Pst, transportador específico para fosfato (constituído por PstB, PstC e PhoS), sendo que o sistema Pit é o mais comum para a via do arsenato. O arsenito, por sua vez, possui como transportador o facilitador glicerol (GlpF), uma aquagliceroporina (proteína transportadora de glicerol e membro da superfamília aquaporina), que viabiliza a permutação de solutos orgânicos neutros, como o glicerol e a ureia (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002; ROSEN, 2002).

Como mencionado anteriormente, no interior da célula o arsenato é reduzido ao arsenito através da ação enzimática da arsenato redutase (Figura 05). Nas bactérias existem duas famílias de arsenato redutase, independentemente desenvolvidas, que utilizam diferentes doadores de elétrons (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002). A primeira família é representada pela proteína ArsC do plasmídeo da *E. coli* R773 que utiliza glutathiona reduzida (GSH) e glutaredoxina (Grx) como agente redutor. A segunda família de arsenato redutase, dependente de tioredoxina, é representada pelo produto do gene *arsC* do plasmídeo de *Staphylococcus aureus* pl258 e *Bacillus subtilis*, a qual está relacionada à família das proteínas tirosina fosfatases de massa molecular baixa (ROSEN, 2002; SILVER & PHUNG, 2005).

Em micro-organismos, há duas famílias de transportadores de arsenito, responsáveis por expulsar o arsenito da célula e, portanto, envolvidas no mecanismo de detoxificação. Uma delas é representada pelo produto do gene *arsB*, presente no plasmídeo de *E. coli* R773 e em *S. aureus* pl258, uma proteína membrana integral com 12 segmentos que, usando o potencial de membrana, expulsa o arsenito. A proteína ArsB, em associação com uma bomba de efluxo específica dependente de

ATP (produto do gene *arsA*), pode expulsar o arsenito citoplasmático. Além da sensibilidade ao arsenito, esta família também transporta antimônio [Sb(III)]. Por outro lado, a segunda família de transportadores de arsenito inclui a proteína ArsB de *B. subtilis* e a proteína ARR3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esses transportadores (família ArsB/ARR3) são proteínas integrais de membrana com 10 segmentos. Células com a proteína ARR3 exportam o arsenito, mas não o antimônio (AZEVEDO *et al.*, 2008; LÓPEZ-MAURY *et al.*, 2003; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002; ROSEN, 2002).



**Figura 05** - Mecanismo bioquímico de resistência ao arsênio em *E. coli*. Figura adaptada de Mukhopadhyay *et al.* (2002).

Nos plasmídeos e cromossomos de bactérias Gram-positivas, os operons de resistência ao arsênio (*ars*) apresentam cinco genes, *arsABCDR*, correspondendo aos quatro genes citados e um gene adicional, *arsD*, que atua como uma metalochaperona, transferindo o arsenito para a ArsA e intensificando sua atividade ATPásica (LIN *et al.*, 2006; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002).

Em cianobactérias já foram descritos quatro mecanismos de interação metal-células: adsorção-biossorção, complexação, bioacumulação e biotransformação. As espécies capazes de acumular ou concentrar substâncias em uma superfície ou interface, realizam o mecanismo de adsorção e em seguida, biossorção e quando

realizam a complexação formam agregados do metal na parede das células e em outras superfícies externas. Os dois mecanismos, adsorção-biossorção e complexação, podem acontecer em células vivas ou mortas e envolvem processos físico-químicos (processo passivo). O armazenamento em algumas inclusões celulares, como grânulos de polifosfato, com gasto de energia corresponde ao processo de bioacumulação. A biotransformação ocorre quando a cianobactéria realiza a transformação de íons metálicos através de metabólitos, como metalotioneínas (COSTA, 2003; GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 1998).

No caso de biotransformação, as cianobactérias respondem a uma variedade de íons-metais e aos oxianions de arsênio pela produção de proteínas (metalotioneína), que se ligam aos metais sequestrando-os e evitando a acumulação de metais tóxicos livres no interior da célula. Especificamente, o íon-metal interage com os grupos tióis dos resíduos de cisteína da proteína repressora, a qual regula a transcrição da metalotioneína (YBARRA & WEBB, 1998).

#### 1.4 ESTUDOS DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM CIANOACTÉRIAS

Muitos estudos têm demonstrado que as cianobactérias apresentam resistência aos metais pesados em quantidades substanciais. Em uma pesquisa sobre a toxicidade e biossorção de cádmio em culturas de *Spirulina (Arthrospira) platensis*, pertencente à ordem Oscillatoriales, Rangsayatorn *et al.* (2002) evidenciaram a alta capacidade de absorção de cádmio ( $q_{max}=98,04$ ) por esta cianobactéria. Tal habilidade também foi observada em *Phormidium limnetica*, que biotransformou, eficientemente, Hg(II) em Hg(0) e  $\beta$ -HgS (LEFEBVRE *et al.*, 2007).

Além desses metais, o arsênio também tem sido relatado como um metalóide ao qual cianobactérias são capazes de resistir (Tabela 03). Espécies de cianobactérias são capazes de crescer na presença de altas concentrações de arsenato, acima de 100 mM, e em concentrações mais baixas de arsenito (SRIVASTAVA *et al.*, 2009). Em concordância, esta resistência ao arsênio foi caracterizada na cianobactéria *Synechocystis* sp. linhagem PCC 6803, a partir de homologias com genes *ars* de outras espécies, evidenciando a presença de três genes: *arsB*, *arsH* e *arsC* (LÓPEZ-MAURY *et al.*, 2003). Para verificar se o operon *arsBHC* estava ativo na resistência ao arsênio, López-Maury *et al.* (2003) geraram

**Tabela 04.** Cianobactérias resistentes ao arsenato.

Cianobactéria	Concentração de arsenato (mM)	Modificação na concentração de fosfato do meio de cultura (mM)	Período do experimento	Referência
<i>Anabaena</i> sp.	15 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> em meio líquido	-	20-25 dias	Shaheen <i>et al.</i> (2007)
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	40 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	-	15 dias	Pandey <i>et al.</i> (2011)
<i>Anabaena doliolum</i>	58 mM*	-	3 dias	Srivastava <i>et al.</i> (2009)
<i>Anabaena variabilis</i>	75 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	Sem fosfato 0,33 mM	1 dia	Thiel (1988)
<i>Calothrix</i> sp.	3 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> em meio sólido e líquido	-	20-25 dias	Shaheen <i>et al.</i> (2007)
<i>Geitlerinema</i> UFV-E01	0,024 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	6,5.10 <sup>-6</sup> mM 17,5.10 <sup>-6</sup> mM	2 dias	Gomes <i>et al.</i> (2007)
<i>Microcystis</i> PCC 7806	0,1 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	Sem fosfato 0,001 mM	14 dias	Gong <i>et al.</i> (2009)
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB 905	0,01 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	Sem fosfato 0,001 mM 0,01 mM 0,175 mM	17 dias 49 dias 49 dias 43 dias	Guo <i>et al.</i> (2011)
<i>Nostoc</i> sp.	30 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> em meio líquido	-	20-25 dias	Shaheen <i>et al.</i> (2007)
<i>Phormidium</i> sp.	30 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> em meio líquido	-	20-25 dias	Shaheen <i>et al.</i> (2007)
<i>Phormidium laminosum</i>	0,03 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	-	1 dia	Bhattacharya & Pal (2011)
<i>Synechococcus</i> sp.	1,3 mM KH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	Sem fosfato 0,001 a 0,2 mM	12 dias	Takahashi <i>et al.</i> (2001)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	100 mM Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	Sem fosfato Concentração padrão para um litro de BG11 (0,23 mM)	10 dias	López-Maury <i>et al.</i> (2009)

\*Corresponde à concentração capaz de inibir 50% da cultura de cianobactéria.

mutações em cada um dos genes do operon. Na análise com arsênio (arsenato e arsenito) e antimônio, os mutantes *arsC* foram sensíveis somente ao arsenato, enquanto que as linhagens mutantes *arsB* foram hipersensíveis ao arsenito, arsenato e antimonito [Sb(III)]. A partir disso, concluíram que a proteína ArsB de *Synechocystis* é o primeiro membro da família ArsB/ARR3 que exporta tanto o As(III) como o Sb(III). Para López-Maury *et al.* (2003) isso pode ser explicado pela evolução convergente das famílias de transportadores de arsenito. Os mutantes *arsH*, por sua vez, não mostraram alterações óbvias sob as condições testadas.

Além dos genes do operon *arsBHC*, López-Maury *et al.* (2009) identificaram dois genes idênticos e próximos, *arsI1* e *arsI2*, designados assim, por codificarem proteínas idênticas pertencentes à família de arsenato redutase de *E. coli*. Mesmo com as mutações em um dos genes *arsI* (mutação simples) ou nos dois genes *arsI* (mutação dupla), as células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 mostraram um nível de resistência ao arsenato similar ao nível observado na linhagem desprovida de mutação (selvagem). Segundo os autores, esse resultado pode ser explicado pela presença da proteína ArsC, o que os levou a sugerir que as proteínas ArsI1 e ArsI2 desempenham um papel secundário na resistência ao arsenato em *Synechocystis*.

As linhagens mutantes simples e dupla no gene *arsI*, as linhagens mutantes tanto em um dos genes *arsI* como no gene *arsC* e a linhagem selvagem foram afetadas quando expostas ao arsenato (100 mM) e à baixa concentração de fosfato. Não obstante, estas linhagens mostraram resistência quando submetidas ao meio contendo arsenato (100 mM) e maior quantidade de fosfato. Sob esta última condição, a linhagem mutante em todos os genes que codificam as arsenato redutases (*arsC*, *arsI1* e *arsI2*) mostrou-se 50% menos tolerante em comparação às demais linhagens. Para López-Maury *et al.* (2009), isso demonstra que o transporte de arsenato é influenciado pela presença de fosfato e, portanto, este composto tem um efeito protetor contra a toxicidade do arsênio. Em contrapartida, Thiel (1988) considera que a proteção das células de *Anabaena variabilis* em um meio com arsenato e fosfato é atribuída à competição entre ambos pelas vias metabólicas, em vez da competição por transporte. Paralelamente, o mesmo autor sugere que em organismos altamente resistentes, exista um sistema de transporte seletivo, o qual inviabiliza a penetração do arsenato, e que na vias metabólicas o arsenato é um fraco concorrente para o fosfato, o que, por fim, permitiria a tolerância às altas concentrações de arsenato.

Em procariotos, a resistência aos metais e metalóides é atribuída ao mecanismo de defesa enzimático contra o estresse oxidativo e à proteção mediada por compostos relacionados ao estresse (CIPRANDI, 2011; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002; BHATTACHARYA & PAL, 2011). Em pertinência, Bhattacharya & Pal (2011) demonstraram que a cianobactéria *Phormidium laminosum* suportou determinadas concentrações de arsenato pela atividade de enzimas antioxidantes, assim como a cianobactéria *Anabaena doliolum* (SRIVASTAVA *et al.*, 2009). De acordo com Srivastava *et al.* (2009), o dano oxidativo e a indução do sistema de defesa antioxidante são mais proeminentes na presença de arsenato do que de arsenito. Apesar de o arsenito ser um indutor do estresse oxidativo, o arsenato além de ser um análogo estrutural do fosfato, permitindo que entre na célula e altere os processos biológicos que requerem o fosfato, sofre especiação formando arsenito o qual é mais um agravante e cuja transformação gera radicais superóxido. Desta forma, o arsenato torna-se o principal indutor do dano oxidativo em cianobactérias. Provavelmente, o motivo que torna o arsenato o causador da severidade do estresse oxidativo seja a produção de oxigênio pela cianobactéria, tornando o meio oxidante o que pode favorecer a permanência e a estabilidade do arsenato (SRIVASTAVA *et al.*, 2009).

Para se proteger da toxicidade do arsenato, outra cianobactéria, *Synechococcus* sp. PCC 7942, expressou o gene *smtA*, que codifica a metalotioneína, quando foi exposta a um meio contendo fosfato limitado e 100  $\mu\text{M}$  de arsenato, em contrapartida, quando exposta a fosfato suficiente e a mesma concentração de arsenato, não ocorreu a transcrição da metalotioneína. De acordo com Ybarra & Webb (1998), isso é justificado pela atividade altamente seletiva do sistema Pst em discriminar fosfato de arsenato, quando aquele está em uma quantidade suficiente para permitir o crescimento normal da cianobactéria, inviabilizando a interação entre arsenato e a proteína repressora da transcrição da metalotioneína.

Gong *et al.* (2009), por sua vez, analisaram os efeitos do arsenato sobre o conteúdo de microcistina, uma cianotoxina, de *Microcystis* linhagem PCC 7806 em diferentes regimes de fosfatos. As células de *Microcystis* continuaram crescendo, quando submetidas às concentrações de 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de arsenato, e quanto maior a concentração de arsenato e de fosfato, maior a quantidade de microcistina

produzida pelas células. Por este resultado, os autores especularam que o polifosfato celular fornece a carga de energia e auxilia as enzimas necessárias para a síntese de microcistina, dando suporte para a produção de metabólitos secundários em resposta ao arsenato. Este, por outro lado, estaria envolvido na regulação da síntese de microcistina, em virtude do crescimento satisfatório e da maior produção desta cianotoxina pelas células de *Microcystis* na presença de arsenato e fosfato.

As células que não foram condicionadas à falta de fosfato, quando submetidas ao meio contendo 100  $\mu\text{M}$  de arsenato, mostraram um pequeno aumento na concentração de microcistina extracelular, devido à lise de algumas células. Apesar disso, a porcentagem de microcistina extracelular foi baixa em relação ao total de microcistina produzida e não diferiu das amostras controle (não tratada com arsenato) (GONG *et al.*, 2009). Baseados em seus resultados, Gong *et al.* (2009) sugeriram ainda que *Microcystis* linhagem PCC 7806 foi tolerante ao arsenato e que esta habilidade não está relacionada ao conteúdo de fosfato intra e extracelular. Segundo os autores, a alteração na fisiologia das células ou a capacidade de reduzir a toxicidade do arsenato externo permitiram que essa cianobactéria resistisse à presença do metalóide. Divergindo disso, experimentos com a cianobactéria marinha *Synechococcus* sp. mostraram que o fosfato é responsável por inibir a incorporação do arsenato e, desta forma, ameniza a toxicidade do metalóide nas células cianobacterianas (TAKAHASHI *et al.*, 2001).

Em um estudo similar ao de Gong *et al.* (2009), Guo *et al.* (2011) evidenciaram a presença de arsenato, arsenito e DMA no meio extracelular em condições de ausência (0  $\mu\text{M}$ ) e de excesso (175  $\mu\text{M}$ ) de fosfato nas culturas de *Microcystis aeruginosa* FACHB 905 sob 1 e 10  $\mu\text{M}$  de arsenato. Enquanto que, nas condições de fosfato limitado (1  $\mu\text{M}$ ) e meio rico em fosfato (10  $\mu\text{M}$ ), arsenato e DMA foram detectados no meio extracelular em ambas as concentrações de arsenato utilizadas. Dessa forma, a variação na concentração de fosfato, considerando a concentração de arsenato utilizada, foi o que mais afetou a especiação do arsênio e o sistema de captação de fosfato, cujos sistemas Pit e Pst foram ativados sob 0, 1 e 10  $\mu\text{M}$  de fosfato e 175  $\mu\text{M}$  de fosfato, respectivamente. Além disso, esses autores relataram que os diferentes níveis de fosfato, nos meios com 1 e 10  $\mu\text{M}$  de arsenato, também influenciaram o crescimento de *Microcystis aeruginosa* FACHB 905, de

forma que esta cianobactéria mostrou-se mais resistente em altas concentrações de fosfato.

Shaheen *et al.* (2007) inferiram sobre uma outra forma de alteração da toxicidade do arsenato: a toxicidade das mesmas concentrações de arsenato difere com a variação ou mudança das condições de crescimento para as cianobactérias. Comparando o crescimento de quatro gêneros de cianobactérias cultivadas em meio líquido e em meio sólido sob altos níveis de arsenato, estes autores observaram que quando cultivadas em meio líquido, todas foram tolerantes até uma determinada concentração. Porém, quando cultivadas em meio sólido e expostas às mesmas concentrações de arsenato, as condições permitiram que *Calothrix* sp. crescesse em até 3 mM, enquanto que as outras cianobactérias não sobreviveram em qualquer uma das concentrações.

Além do limite de tolerância às concentrações de arsenato, Shaheen *et al.* (2007) relataram a capacidade de bioacumulação e descontaminação do meio contendo arsenato pelas cianobactérias. A habilidade de cianobactérias em reduzir grandes quantidades de arsênio do ambiente no qual se encontram, também foi estudada por Huq *et al.* (2007), os quais demonstraram que a presença de quatro algas e de três cianobactérias (*Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Gloeotrichia*), foi responsável por reduzir a concentração de arsênio nas raízes e nos galhos das plantas de arroz em até 74% e 40,11%, respectivamente. Gomes *et al.* (2007), citam que há evidências de que as cianobactérias e as algas possuem a capacidade de acumular arsênio intracelularmente e biotransformar as formas tóxicas em formas não tóxicas.

Recentemente, foi comprovado que a cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 é capaz de crescer em 40 mM de arsenato durante 15 dias. Neste experimento pioneiro desenvolvido por Pandey *et al.* (2011), a cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 em meio suplementado com 40 mM de arsenato teve seu crescimento inibido depois de 24 horas, porém nos dias seguintes até o décimo quinto dia o crescimento desta cianobactéria foi restabelecido comparado ao controle (cianobactéria não tratada com arsenato). A quantificação do arsênio intracelular, a análise da atividade da arsenato redutase e a análise dos transcritos de putativos genes de efluxo do arsenito evidenciaram que a cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120, em 24 horas de exposição a 40 mM de arsenato, sofreu inibição de crescimento pela entrada deste metalóide e alteração das vias metabólicas envolvidas em sistemas essenciais para a sobrevivência deste micro-organismo.

Contudo, este quadro reverteu nos dias seguintes pelo aumento das atividades da arsenato redutase e de efluxo do arsenito e, portanto, a diminuição da quantidade do arsênio intracelular.

Em sua pesquisa Gomes *et al.* (2007), mostraram que a absorção de arsenato, em *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01, foi maior em células cultivadas em um meio com baixa concentração de fosfato, sendo que a única alteração morfológica observada foi a presença de grânulos densos no citoplasma, sem redução na produção de biomassa. Desta forma, sugeriram que o conhecimento destes processos associados ao potencial biorremediador das algas e cianobactérias, viabiliza a utilização destes organismos na descontaminação de ambientes impactados com o arsênio.

Uma vez que *G. unigranulatum* UFV-E01 foi capaz de sobreviver na presença de arsênio (GOMES *et al.*, 2007), sugere-se que esta cianobactéria possui algum mecanismo de resistência a este metalóide. Assim, estudos que venham demonstrar o potencial bioquímico e genético de organismos tolerantes ao arsênio são fontes promissoras de informações para pesquisas futuras e para aplicá-las em um manejo ambiental nas áreas contaminadas. Além disso, como *G. unigranulatum* UFV-E01 foi isolada de um ambiente contaminado por arsênio, propõe-se que esta cianobactéria suporte concentrações mais elevadas deste metalóide.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar o crescimento e o perfil bioacumulativo da cianobactéria *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01 na presença de arsenato de sódio.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações tóxicas do arsenato de sódio para as células de *G. unigranulatum* UFV-E01;
- Analisar o padrão de crescimento de *G. unigranulatum* UFV-E01 exposta ao arsenato de sódio;
- Quantificar o arsênio total presente no meio de cultura em determinados dias de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA *Geitlerinema unigranulatum* UFV-E01

O isolado de *G. unigranulatum* UFV-E01 foi cedido pela prof<sup>a</sup>. Rosane Aguiar do Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (MG). A amostra foi isolada do solo de uma região de mineração (Paracatu-MG) com registros de contaminação por arsênio. Para a manutenção da cultura, a cianobactéria foi cultivada em 50 mL de meio BG11 líquido (ALLEN, 1968) (Tabela 05) a 25°C, sendo submetida a um fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro. Essas condições de crescimento foram utilizadas em todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho.

**Tabela 05.** Composição do meio de cultura BG11 (ALLEN, 1968).

<b>Componentes</b>	<b>estoque (g/l)</b>	<b>Usar por litro</b>	<b>Concentração final (g/l)</b>
<b>1. NaNO<sub>3</sub></b>	150	10 ml	1,5
<b>2. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	40	1 ml	0,04
<b>3. MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	75	1 ml	0,075
<b>4. CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	36	1 ml	0,036
<b>5. Ácido cítrico</b>	6	1 ml	0,006
<b>6. Citrato de amônio férrico</b>	6	1 ml	0,006
<b>7. Na<sub>2</sub>EDTA</b>	1	1 ml	0,001
<b>8. Micronutrientes</b>	-	1 ml	-
<b>9. Carbonato de sódio</b>	20	1 ml	0,02

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CIANOBACTÉRIA *G. unigranulatum* UFV-E01 AO ARSENATO DE SÓDIO

Para a padronização da quantidade do inóculo de *G. unigranulatum* UFV-E01, foram retirados pequenos círculos com o mesmo diâmetro (5 mm), lado a lado, de uma cultura de *G. unigranulatum* UFV-E01 com 20 dias de crescimento em placa de Petri (BG11 sólido), utilizando uma ponteira estéril de 1000 µL e por seguinte, foram colocados individualmente em tubos rosqueáveis 130x10 mm. Este método de inoculação foi utilizado em todas as etapas que requeriam o crescimento cianobacteriano. Nos tubos rosqueáveis 130x10 mm, esta cianobactéria foi cultivada em 4 mL de meio BG11 (ALLEN, 1968) acrescido de diferentes concentrações de arsenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ), correspondente a 0, 5, 10, 30, 50, 100, 130, 150, 200 e 250 mM, em triplicatas por 20 dias.

Uma vez que, a produção de biomassa é proporcional ao conteúdo de clorofila *a*, conhecendo-se a concentração desse pigmento para *G. unigranulatum* UFV-E01, foi possível determinar o crescimento desta cianobactéria ao longo do tratamento com arsenato de sódio, seguindo a metodologia descrita por Aguiar (1992) com algumas modificações (subtópico 3.2.1).

A toxicidade do arsenato de sódio para *G. unigranulatum* UFV-E01 foi caracterizada pela inibição do crescimento desta cianobactéria exposta em comparação com um grupo controle não exposto. Com isso, foi determinada a concentração máxima de arsenato de sódio na qual a cianobactéria ainda cresce. Esses dados foram analisados, estatisticamente, pela ANOVA (Biestat), sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### 3.2.1 Extração e quantificação de clorofila *a*

Inicialmente, o inóculo presente nos tubos rosqueáveis 130x10 mm foram homogêneos em um vórtex, transferidos para tubos eppendorf de 2 mL e precipitados por 10 minutos a 13000 rpm e a temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos pela centrifugação foram descartados no experimento para a caracterização da resistência da cianobactéria ao arsenato de sódio, porém, para a quantificação do arsênio total extracelular, os sobrenadantes foram reservados em

tubos eppendorf de 2 mL para análises posteriores. Em seguida, aos precipitados foi adicionado 1 mL de metanol 100% na proporção de 9:1, para a extração de clorofila, e os tubos eppendorf foram envolvidos em papel alumínio evitando a penetração de luz.

Então, os tubos eppendorf foram submetidos à vigorosa agitação em vórtex e deixados em repouso durante 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente, com a finalidade de obter a extração máxima de clorofila. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13000 rpm e à temperatura ambiente para a obtenção do sobrenadante. Para determinar a concentração de clorofila *a*, as amostras foram monitoradas por mudanças na densidade ótica (DO), sendo que a leitura da absorbância do extrato metanólico foi realizada em um comprimento de onda de 665 nm, usando metanol puro como o branco:

Cálculo da concentração de clorofila *a*:

$C (\mu\text{g/mL}) = DO_{665\text{nm}} \times 12,7$  (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971), onde

C: concentração de clorofila *a*;

DO: absorbância do extrato metanólico;

12,7: coeficiente de absorvidade para a clorofila extraída com metanol.

### 3.3 CURVAS DE CRESCIMENTO DA CIANOBACTÉRIA *G. unigranulatum* UFV-E01 EXPOSTA E NÃO EXPOSTA AO ARSENATO DE SÓDIO

Caracterizada a resistência de *G. unigranulatum* UFV-E01 para o arsenato de sódio, as curvas de crescimento, controle e tratadas, desta cianobactéria foram, então, descritas a partir da determinação da concentração de clorofila *a* (subtópico 3.2.1). As informações obtidas da caracterização da resistência ao arsenato de sódio foram fundamentais para discriminar as concentrações de arsenato de sódio tóxicas e não tóxicas para a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 e, desta forma realizar o experimento posterior, a curva de crescimento da cianobactéria tratada com arsenato de sódio e do grupo controle.

Neste experimento, a cianobactéria foi inoculada em meio BG11 (ALLEN, 1968) com e sem arsenato de sódio, correspondendo a 48 tubos rosqueáveis 130x10 mm para cada tratamento (0, 50 e 150 mM), considerando as triplicatas. As determinações das concentrações de clorofila *a* (subtópico 3.2.1) da cianobactéria

*G. unigranulatum* UFV-E01 eram realizadas periodicamente a cada 2 ou 3 dias em um período de 35 dias tanto para o experimento controle quanto para os tratados. Além disso, nos mesmos dias em que foram realizadas as quantificações de clorofila *a*, o meio de crescimento foi separado em tubos eppendorf de 2 mL para a dosagem de arsênio.

Depois de obtidas as curvas de crescimento da cianobactéria tratada e não tratada com arsenato de sódio, foram realizadas as dosagens de arsênio dos meios de cultura.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DO ARSÊNIO TOTAL EXTRACELULAR

Dentre os dezesseis dias nos quais foram realizadas as quantificações de clorofila *a* e, paralelamente, a coleta do meio de cultura, cinco tempos de crescimento foram selecionados para a dosagem de arsênio dos meios de cultura com concentração inicial de 50 mM de arsenato de sódio e comparação com o meio de cultura sem arsenato de sódio. Os tempos de crescimento escolhidos para a dosagem de arsênio foram: tempo zero de crescimento, quinto dia de crescimento, décimo dia de crescimento, décimo sétimo dia de crescimento e trigésimo quinto dia de crescimento.

Em seguida, os meios de cultura com concentração inicial de 50 mM de arsenato de sódio em triplicatas, pertencentes aos tempos de crescimento selecionados para a dosagem de arsênio, foram separados e deles retirados um volume de 0,075  $\mu$ L para atingir a concentração de 25 ppb em 50 mL de ácido clorídrico 2%. Enquanto que, dos meios sem arsenato de sódio em triplicatas, igualmente representativos destes mesmos tempos de crescimento, foram retirados um volume de 100  $\mu$ L e adicionados em 50 mL de ácido clorídrico 2%.

Posteriormente, essas amostras foram analisadas quanto à concentração do arsênio total no meio extracelular, considerando o comprimento de onda 1890 nm do arsênio. Para este procedimento, foi utilizado o equipamento ICP OES (iCAP 600 Thermo Scientific) do setor de meio ambiente do Instituto Evandro Chagas, de acordo com os parâmetros abaixo (Tabela 06).

**Tabela 06.** Parâmetros do ICP OES.

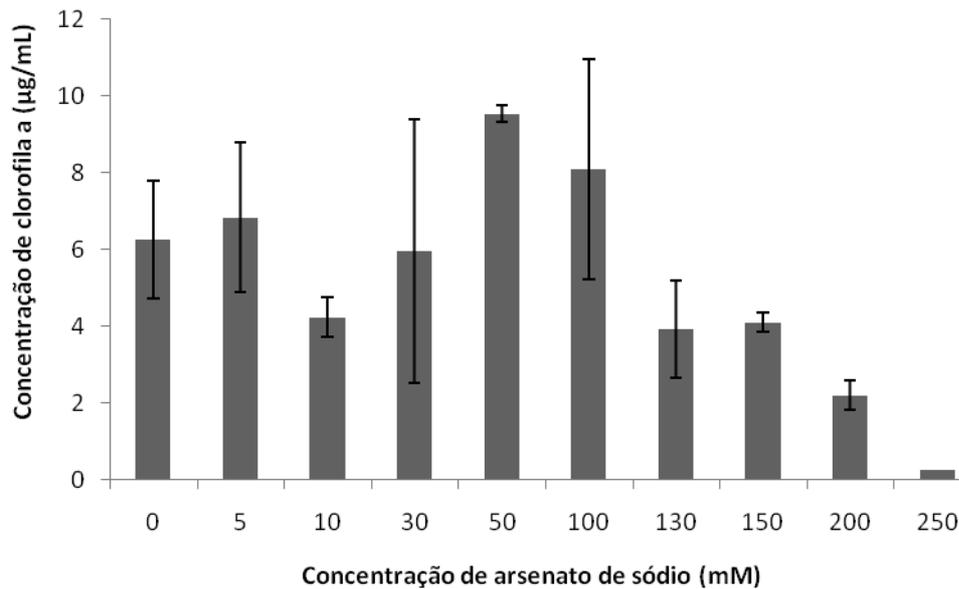
<b>Parâmetros</b>	
<b>Potência da rádio frequência</b>	1100 W
<b>Fluxo do gás auxiliar</b>	0,5 L/min
<b>Fluxo do gás nebulizador</b>	0,5 L/min
<b>Rotação da bomba peristáltica</b>	45 rpm
<b>Rotação da bomba na análise</b>	45 rpm
<b>Tempo de estabilização</b>	5s
<b>Limite de detecção</b>	0,563 ppb

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CIANOBACTÉRIA *G. unigranulatum* UFV-E01 AO ARSENATO DE SÓDIO

As análises da tolerância ao arsenato de sódio por 20 dias mostraram que o crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 variou quando cultivada em diferentes concentrações de arsenato de sódio (Figura 06). Quando exposta a 50 mM, esta cianobactéria apresentou um maior crescimento em relação ao controle (sem arsenato de sódio), com uma diferença significativa validada pelo teste estatístico da ANOVA ( $p < 0,05$ ). Porém, segundo o teste estatístico de ANOVA, considerando  $p < 0,05$ , o crescimento da cianobactéria não apresentou diferença significativa nas concentrações de 5, 10, 30, 100, 130, 150, 200 e 250 mM arsenato de sódio em comparação ao controle.

Após 20 dias de exposição às diferentes concentrações de arsenato de sódio, que variaram de 0 a 250 mM, a biomassa cianobacteriana aumentou 52% no meio de cultura contendo 50 mM em comparação com o controle, demonstrando sua alta tolerância ao estresse deste metalóide. Por outro lado, nas concentrações de 150 a 250 mM observou-se uma diminuição da biomassa proporcional ao aumento das concentrações, podendo ser observada pela redução de 35 e 96% na biomassa sob 150 e 250 mM, respectivamente, comparando-se com a cultura na ausência de arsenato de sódio.

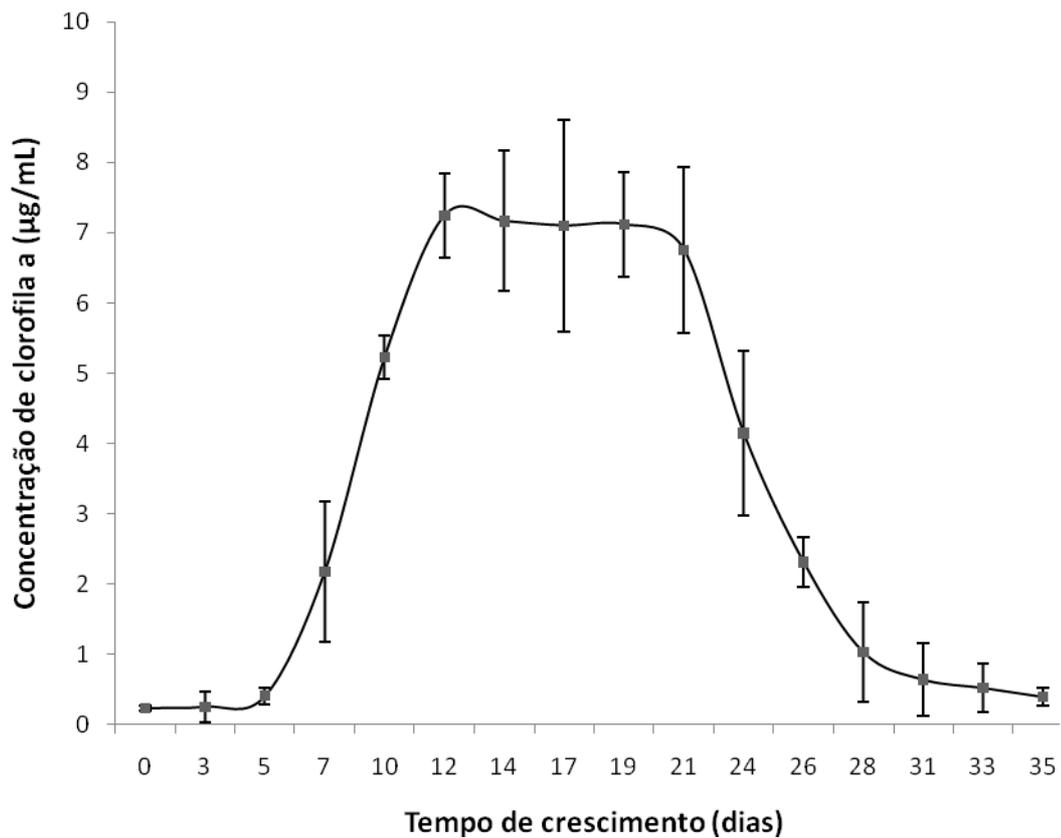


**Figura 06** – Perfil da resistência de *G. unigranulatum* UFV-E01 cultivada sob as concentrações de 0 a 250 mM de arsenato de sódio durante 20 dias. Os dados são médias das triplicatas e desvio padrão.

#### 4.2 CURVAS DE CRESCIMENTO DA CIANOBACTÉRIA *G. unigranulatum* UFV-E01 EXPOSTA E NÃO EXPOSTA AO ARSENATO DE SÓDIO

Uma vez determinada a concentração máxima de arsenato de sódio para a qual a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 mostrou-se tolerante, foi possível descrever o crescimento desta cianobactéria em um meio contendo arsenato de sódio e compará-lo ao crescimento controle. As três curvas obtidas foram representativas das amostras em duplicatas.

Na curva de crescimento controle obtida após 35 dias de crescimento, sem adição de arsenato de sódio, a cianobactéria teve sua fase de adaptação ao meio (fase Lag) durante os quatro primeiros dias (Figura 07). O crescimento exponencial ocorreu do quinto ao décimo segundo dia, enquanto que a fase estacionária foi estabelecida do décimo terceiro ao vigésimo dia, sendo que depois deste ponto a cultura entrou na fase de declínio.

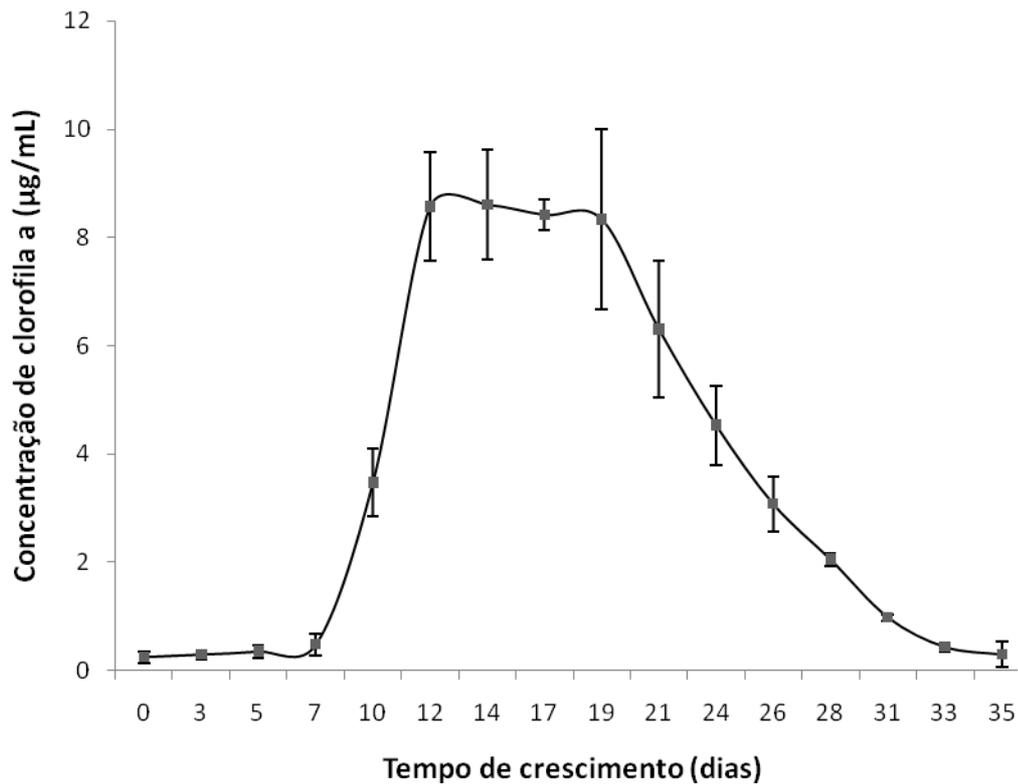


**Figura 07** – Curva de crescimento controle da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 durante 35 dias. Os dados são as médias e os desvios padrão das duplicatas.

Por outro lado, a curva de crescimento obtida após 35 dias de exposição a 50 mM de arsenato de sódio mostrou que as fases de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 foram definidas em tempos diferentes (Figura 08), quando comparada à curva controle (Figura 07).

A fase de adaptação ao meio foi mais prolongada (seis dias) que a evidenciada na curva de crescimento controle. Além disso, a curva de crescimento resultante do tratamento com 50 mM de arsenato de sódio evidencia que a produção exponencial de biomassa e a fase estacionária foram mais curtas, duraram cinco e seis dias, respectivamente, enquanto que no controle tanto a fase exponencial como a estacionária ocorreram por sete dias. Depois do décimo nono dia, ocorreu o decréscimo da biomassa cianobacteriana.

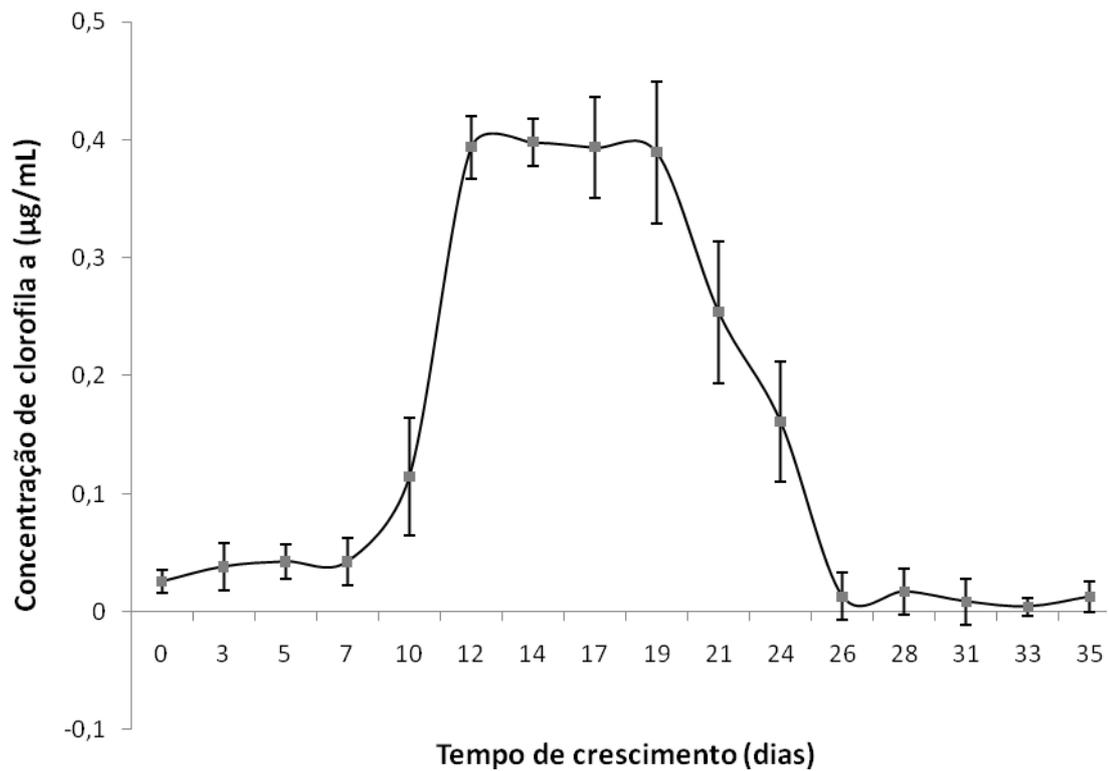
Essa curva também revelou a resistência da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 a 50 mM de arsenato de sódio pela maior concentração de clorofila *a*, em relação ao experimento controle.



**Figura 08** – Curva de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 tratada com 50 mM de arsenato de sódio durante 35 dias. Os dados são as médias e os desvios padrão das duplicatas.

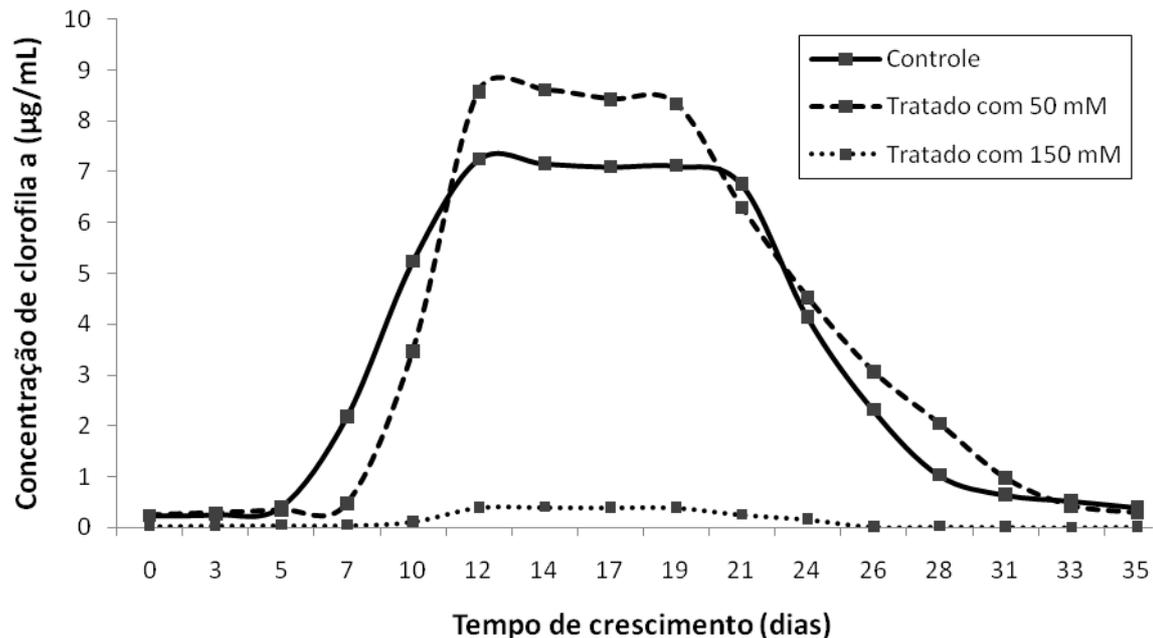
A cultura de *G. unigranulatum* UFV-E01 submetida a 150 mM de arsenato de sódio apresentou um decréscimo significativo na produção de biomassa ao longo dos 35 dias do experimento (Figura 09), em relação aos experimentos controle e tratado com 50 mM. Apesar do crescimento das células ser menor que nos experimentos anteriores (controle e tratado com 50 mM), observa-se que o perfil de crescimento é similar entre os três.

A curva de crescimento com 150 mM mostrou que a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 necessitou de um maior tempo de adaptação (sete dias) e que a fase exponencial foi mais curta, ocorreu por quatro dias, em comparação às curvas controle e com 50 mM. Por sua vez, a fase estacionária, estabelecida do décimo terceiro ao décimo nono dia, foi mais curta que a da curva controle, porém a mesma da curva com 50 mM. A fase de declínio, ou de morte, ocorreu a partir do vigésimo dia em altas concentrações de arsenato de sódio.



**Figura 09** - Curva de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 tratada com 150 mM de arsenato de sódio durante 35 dias. Os dados são as médias e os desvios padrão das duplicatas.

Dentre as três concentrações de arsenato de sódio, a concentração de clorofila *a* foi maior em 50 mM, enquanto que em 150 mM a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 teve a menor produção de biomassa (Figura 10).



**Figura 10** – Curvas de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 cultivada sob diferentes concentrações de arsenato de sódio: 0, 50 e 150 mM. Os dados são médias das duplicatas.

A variação no conteúdo de clorofila *a*, comparando as condições químicas diferenciais entre si, demonstra que o arsenato de sódio foi o estressor em potencial para a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01. Tomando em comparação o tratamento controle com o de 50 mM de arsenato de sódio, inicialmente, o conteúdo de clorofila *a* sob 50 mM se manteve estável, contudo a partir do sétimo até o décimo dia de crescimento, período que compreende a fase exponencial de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, a concentração desse pigmento foi inibida. Em contrapartida, no décimo segundo dia de crescimento o conteúdo de clorofila *a* atingiu seu ápice nas três concentrações de arsenato de sódio (0, 50 e 150 mM), mas foi sob 50 mM que este pigmento aumentou em 6 e 95%, em relação ao controle e ao tratamento com 150 mM, respectivamente.

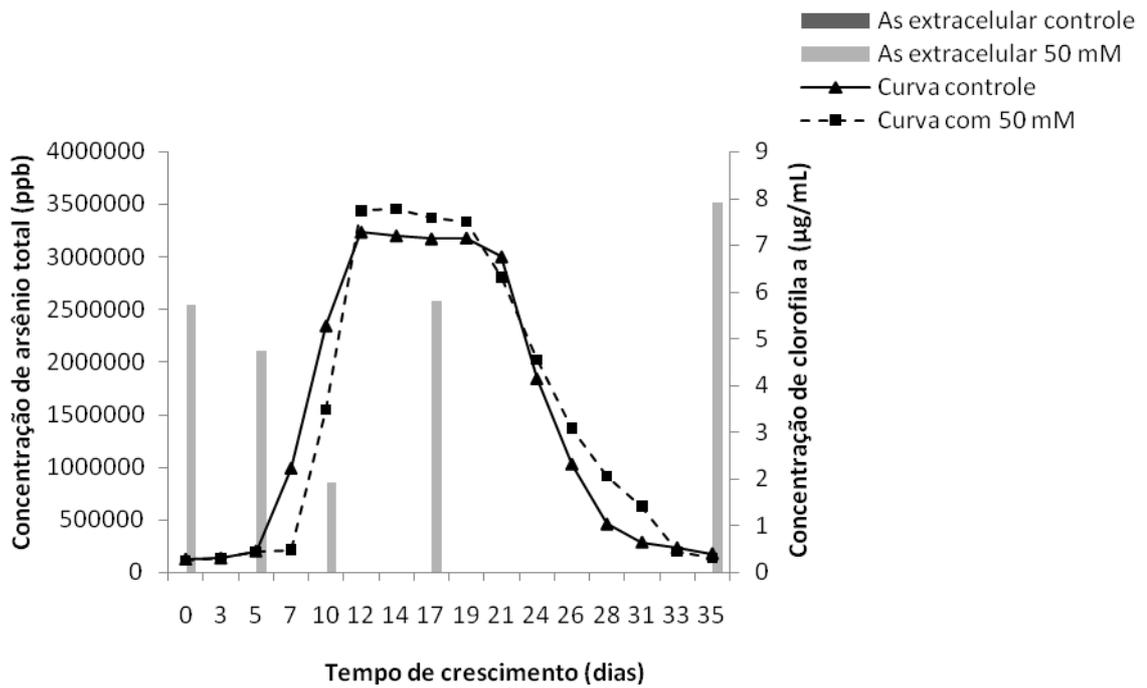
Além disso, observou-se um aumento considerável no conteúdo de clorofila *a* sob 50 mM de arsenato de sódio do décimo para o décimo segundo dia de crescimento, equivalente a 55%. Durante os sete dias seguintes, tempo correspondente à fase estacionária, o conteúdo de clorofila *a* pouco variou nas concentrações de 50 e 150 mM de arsenato de sódio. Nos dias adiante, o conteúdo de clorofila *a* decresceu de forma gradual, porém mais lentamente sob 50 mM de arsenato de sódio.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DO ARSÊNIO TOTAL EXTRACELULAR

A quantificação do arsênio forneceu evidências de que a concentração do arsênio total no meio extracelular variou em função dos dias de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 (Figura 11). A redução na concentração de arsenato de sódio ocorreu de forma gradual ao longo dos dez primeiros dias de crescimento da cianobactéria no meio contendo 50 mM. Como esperado, a concentração de arsênio total extracelular em todas as amostras controle foi equivalente a zero.

Na fase de adaptação ao meio, a concentração do arsênio total extracelular diminuiu, porém uma redução mais proeminente ocorreu na fase exponencial, correspondente a uma redução em 67% do arsênio total extracelular no décimo dia de crescimento, em relação ao tempo zero de crescimento.

Com exceção do sétimo ao décimo dia de crescimento, durante dezessete dias de crescimento o arsenato de sódio não foi um fator determinante para a redução da biomassa da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, o que demonstrou uma natureza resistente à exposição em 50 mM de arsenato de sódio. Esta informação pode ser observada pela maior quantidade de biomassa no décimo sétimo dia de crescimento, em relação ao controle. Ainda no décimo sétimo dia de crescimento, a concentração do arsênio total extracelular aumentou em relação aos tempos zero e décimo dia de crescimento, equivalente a 2 e a 68% respectivamente. O trigésimo quinto dia de crescimento foi representativo de um declínio celular e, conseqüentemente, de um aumento em torno de 28% na concentração do arsênio total no meio extracelular, por comparação ao tempo zero de crescimento.



**Figura 11** – Arsênio total extracelular em cinco tempos de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 preincubada com 50 mM de arsenato de sódio. Nos cinco tempos constam as médias das triplicatas.

## 5 DISCUSSÃO

Nos testes de tolerância ao arsenato de sódio a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 foi capaz de resistir até 50 mM comparável ao controle. A produção de biomassa sob 150 mM de arsenato de sódio não foi, estatisticamente, significativa em comparação ao tratamento controle. As informações disponíveis na literatura evidenciam que a resistência a esse metalóide varia entre as espécies cianobacterianas. Enquanto Bhattacharya & Pal (2011) registraram que *Phormidium laminosum* sobreviveu em até 0,03 mM, Pandey *et al.* (2011) demonstraram que *Anabaena* sp. PCC 7120 cresceu sob o efeito tóxico de 40 mM de arsenato de sódio. Em pertinência, a cianobactéria *Anabaena doliolum* requereu uma alta dosagem (58 mM) de arsenato para ter seu crescimento reduzido pela metade (SRIVASTAVA *et al.*, 2009). É válido relacionar a tolerância dessas cianobactérias ao arsenato de sódio com a concentração máxima de arsênio inorgânico permitida para o consumo humano (0,00003 mM) (BRASIL, 2008), quando os métodos de biorremediação são reanalisados.

Muitos trabalhos foram realizados com objetivo de testar o comportamento fisiológico de cianobactérias em resposta ao arsenato, no entanto, a maioria deles, desenvolve esta análise modificando a concentração de fosfato do meio de cultura. A exemplo, Gomes *et al.* (2007), com o propósito de relacionar a absorção do arsenato de sódio em meios de culturas diferenciais (quantidade de fosfato), submeteram *G. unigranulatum* UFV-E01 em concentrações inferiores (até 0,024 mM) comparadas às utilizadas no presente trabalho. Esses autores demonstraram que a concentração do arsênio total absorvida pelas células de *G. unigranulatum* UFV-E01, cultivadas em meio com 17,5 mM de fosfato, foi menor que a concentração absorvida pelas células em meio com 6,5 mM de fosfato.

A capacidade das cianobactérias em resistir à toxicidade do arsênio tem sido relacionada ao seu aparato bioquímico e genético, em diversos trabalhos (GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 2011; YBARRA & WEBB, 1998). Srivastava *et al.* (2009) comprovaram isso demonstrando que a cianobactéria *Anabaena doliolum*, sob condições de estresse causadas pelo arsenato, tende a ativar o sistema de defesa antioxidativo para lidar com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO). Além disso, as cianobactérias podem dispor de

um operon que assegura a resistência ao arsênio, como foi evidenciado em *Synechocystis* sp. PCC 6803 a presença do operon *arsBHC* (LÓPEZ-MAURY *et al.*, 2003). No entanto, não se pode inferir que a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 resistiu a 50 mM de arsenato de sódio em virtude do referido operon e de um sistema de defesa antioxidativo, uma vez que na literatura não constam estudos que comprovem a presença destes mecanismos nesta cianobactéria, permanecendo por ser esclarecido.

Comparado ao estudo realizado por Gomes *et al.* (2007), a cultura de *G. unigranulatum* UFV-E01, utilizada no presente trabalho, necessitou de um maior tempo para duplicação. Porém, a cultura utilizada por esses autores foi mantida em condições ambientais diferentes (irradiância média de 115  $\mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provenientes de lâmpadas fluorescentes), o que pode ter proporcionado um rápido crescimento.

A curva de crescimento mostrou que a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 teve seu crescimento consideravelmente inibido sob alta concentração de arsenato de sódio (150 mM), mas, por outro lado, a produção de biomassa no meio contendo 50 mM de arsenato de sódio foi similar à obtida em meio sem o metalóide. A curva de crescimento sob o tratamento com 50 e 150 mM de arsenato de sódio revelou que a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, necessitou de um período maior para a adaptação ao meio em relação à curva de crescimento controle. Este resultado está de acordo com o obtido para a cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* PCC 7942 que, na presença de 3  $\mu\text{M}$  de cádmio, apresentou o dobro do período de adaptação em comparação a cultura controle (NADDAF, 2004).

Interessantemente, o conteúdo de clorofila *a* da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 foi reduzido durante o sétimo até o décimo dia de crescimento em 50 mM de arsenato de sódio. Este comportamento fisiológico também foi evidenciado em *Anabaena* sp. PCC 7120, quando Pandey *et al.* (2011) reportaram que o arsênio, especificamente o arsenato de sódio, afeta o metabolismo normal das células de *Anabaena* sp. PCC 7120, sobretudo, pela alteração do metabolismo energético, através da inibição da fixação de carbono e diminuição do conteúdo de ATP. Contudo, após 15 dias de crescimento, o metabolismo normal da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 foi, quase totalmente, restabelecido, fornecendo evidências da estratégia adaptativa deste organismo contra o estresse

por arsenato de sódio. Em *G. unigranulatum* UFV-E01, neste mesmo período de crescimento, que foi correspondente à fase estacionária, o conteúdo de clorofila *a* foi restabelecido e maior que no tratamento controle.

No presente trabalho, o acúmulo de arsenato de sódio durante a longa fase de adaptação, e durante a fase exponencial, mostrou ser o fator para a aceleração metabólica, uma vez que a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 apresentou rápidas fases exponencial e estacionária nas concentrações de arsenato de sódio. Porém, análises complementares, como a interferência do arsenato de sódio sob as vias metabólicas envolvidas em processos essenciais para a manutenção da integridade celular e crescimento da cianobactéria em estudo, devem ser realizadas para corroborar com este resultado. Em *Anabaena* sp. PCC 7120, o acúmulo de arsenato de sódio também foi reportado no primeiro dia de crescimento em exposição a 40 mM. No entanto, diferentemente da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, a liberação do conteúdo de arsênio, no meio de cultura, iniciou no segundo dia de crescimento da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 (PANDEY *et al.*, 2011).

O acúmulo de arsenato de sódio pela cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 ocorreu, gradualmente, ao longo dos dez primeiros dias de crescimento em meio contendo 50 mM de arsenato de sódio. Conforme ressaltado por Naddaf (2004), um fator importante sobre a determinação da quantidade de metal tolerável pelo micro-organismo, é a composição do meio. Certos componentes do meio de crescimento da espécie microbiana podem tornar menos disponíveis a forma tóxica do metal para célula, a partir da complexação do metal pelos componentes intrínsecos do meio. Em concordância, Castielli *et al.* (2009) relataram que variações de fatores como o pH, nível de oxigênio e a presença de outros íons implicam na toxicidade e biodisponibilidade dos metais. No entanto, na fase de declínio da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, o conteúdo de arsênio total extracelular alcançou o maior valor observado, demonstrando que a cianobactéria havia acumulado arsenato de sódio logo depois da inoculação no meio contendo este metalóide. Apesar dos dados observados, devem-se considerar as possíveis alterações na concentração do arsênio total extracelular durante as etapas de centrifugação.

Assim, durante dez dias a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 acumulou arsenato de sódio, o que foi inferido pela redução em 67% da concentração do

arsênio total extracelular, contudo dias depois a captação de arsênio total foi inibida, aumentando a sua concentração no meio extracelular. Uma resposta fisiológica similar foi apresentada pela cianobactéria *M. aeruginosa* FACHB 905 sob o efeito tóxico de 10  $\mu\text{M}$  de arsenato de sódio. Segundo Guo *et al.* (2011), a cianobactéria *M. aeruginosa* FACHB 905, quando cultivada em meio com arsenato de sódio e 175  $\mu\text{M}$  de fosfato, considerando que a concentração padrão de fosfato é 230  $\mu\text{M}$  em meio BG11, ativou o sistema de transporte específico de fosfato, inviabilizando a entrada de arsenato na célula. Com isso, o fosfato se tornou escasso no meio de cultura, permitindo o funcionamento do sistema de transporte de fosfato inorgânico e, conseqüentemente, a captação de arsenato devido à analogia estrutural com o fosfato, o que pode ser observado durante os dez primeiros dias de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01. O arsenato, por sua vez, no interior da célula de *M. aeruginosa* FACHB 905 foi reduzido a arsenito, o qual foi excretado e oxidado a arsenato devido à progressiva oxidação abiótica e aos efeitos biológicos. O que se pode inferir que a cultura de *G. unigranulatum* UFV-E01 tenha respondido da mesma forma.

Assim como no meio extracelular das culturas de *G. unigranulatum* UFV-E01, o meio extracelular de *M. aeruginosa* FACHB 905 apresentou a maior concentração de arsênio, especificamente arsenito e DMA, na fase estacionária (GUO *et al.*, 2011). Como era esperado, a concentração do arsênio total extracelular aumentou na fase de declínio devido a liberação do conteúdo de arsênio da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01, provavelmente, após a lise celular.

## 6 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos neste estudo, a cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 foi capaz de resistir a altas concentrações de arsenato de sódio comparável ao controle, o que foi apoiado pela análise estatística. O arsenato de sódio foi o fator determinante para a redução do conteúdo de clorofila *a* na fase exponencial, mas não nas fases de adaptação e estacionária.

Além disso, a acumulação de arsenato de sódio iniciou na fase de adaptação e se estendeu até o décimo dia de crescimento da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01.

Apesar dos resultados evidenciados, para considerar sua aplicação em ambientes impactados por arsênio, outras análises, como a caracterização das vias metabólicas envolvidas no processo de resistência, devem ser realizadas. Uma vez concluídas essas análises, pode-se, então, considerar a resposta fisiológica da cianobactéria *G. unigranulatum* UFV-E01 quando revisados os métodos de biorremediação.

## 7 REFERÊNCIAS

ABED, R. M. M.; DOBRETISOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, 106, 1, 1–12, 2009.

AGUIAR, R. M. **Estudos de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos**. Piracicaba-SP, 1992. 122. Dissertação de Mestrado, USP.

ALLEN, M. B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal Phycology**, 4, 1, 1-4, 1968.

ASADULLAH, M. N.; CHAUDHURY, N. Poisoning the mind: arsenic contamination of drinking water wells and children's educational achievement in rural Bangladesh. **Institute for the Study of Labor Discussion Papers**, 5716, 1-48. 2011.

AZEVEDO, J. S. N. *et al.* Gene expression of the arsenic resistance operon in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Canadian Journal of Microbiology**, 54, 137-142. 2008.

BADGER, M.; PRICE, G. D.; LONG, B. M. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. **Journal of Experimental Botany**, 57, 249–265. 2006.

BANERJEE, M.; EVERROAD, R. C.; CASTENHOLZ, R. W. An unusual cyanobacterium from saline thermal waters with relatives from unexpected habitats. **Extremophiles**, 13, 707–716. 2009.

BARRA, C. M. *et al.* Especificação de Arsênio - Uma Revisão. **Química Nova**, 23, 1, 58-70. 2000.

BHATTACHARYA, P.; PAL, R.. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. **Journal of Applied Phycology**, 23, 2, 293-299.2011.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. *et al.* *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure and DNA sequencing. **Journal of Phycology**, 45, 716–725. 2009.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. ed. New York, USA: Springer-Verlag, 2001. p. 721.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008. **Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 abr. 2008. Seção 1, Nº 66, p. 64-68.

- BRYAN, C. G. *et al.* Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. **BioMed Central Microbiology**, 9-127. 2009.
- CAICEDO, N. H. *et al.* Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. **Journal of Applied Phycology**. 2010.
- CAREPO, M. S. P. *et al.* Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Genetics and Molecular Research**, 3, 1, 181-194. 2004.
- CASTIELLI, O. *et al.* Proteomic analyses of the response of cyanobacteria to different stress conditions. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 583, 1753–1758. 2009.
- CERVANTES, C. *et al.* Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, 15, 355-367. 1994.
- CHEN, Y. *et al.* Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. **British Medical Journal**, 342, d2431, 1-11. 2011.
- CIPRANDI, A. **Análise proteômica da resposta ao arsênio e do exoproteoma de *Chromobacterium violaceum***. Belém-PA, 2011. 122. Tese de Doutorado, Doenças Tropicais, UFPA.
- CONCHA, G.; NERMELL, B.; VAHTER, M. Spatial and temporal variations in arsenic exposure via drinking-water in Northern Argentina. **Journal of Health Population and Nutrition**, 24, 3, 317-326. 2006.
- COSTA, W. C. **Seleção de biomassas para o estudo de biossorção dos radionuclídeos  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{137}\text{Cs}$** . Araraquara-SP, 2003. 125 p. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-SP.
- DE SOUZA, R. C. R. *Introdução*. In: Sant’Anna, C. L. *et al.* **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**, 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2006. Cap. 1, p. 1-4.
- DORADOR, C. *et al.* Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion?. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, 64, 419–432. 2008.
- FIGUEIREDO, B. R.; BORBA, R. P.; ANGÉLICA, R. S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. **Environmental Geochemistry Health**, 29, 109–118. 2007.

GANTAR, M.; SEKAR, R.; RICHARDSON, L. L. Cyanotoxins from Black Band Disease of corals and from other coral reef environments. **Microbial Ecology**, 58, 856–864. 2009.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. *et al.* Ability of immobilized cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains. **Journal of Hazardous Substance Research**, Kansas, 1, 1-18, 1998.

GOMES, C. Q. *et al.* Absorção e toxicidade do arsênio em *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-02 (Chlorophyta). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 5, 1125-1127. 2007.

GONG, Y. *et al.* Effects of arsenate on microcystin content and leakage of *Microcystis* strain PCC 7806 under various phosphate regimes. **Environmental Toxicology**, 24, 87–94. 2009.

GUO, P. *et al.* Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 30, 8, 1754-1759. 2011.

HELLWEGER, F. L. *et al.* Greedy algae reduce arsenate. **Limnology and Oceanography**, 48, 6, 2275-2288. 2003.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algological Studies**, 117, 95-115. 2005.

HUQ, S. M. I; ABDULLAH, M. B.; JOARDAR, J. C. Bioremediation of arsenic toxicity by algae in rice culture. **Land Contamination & Reclamation**, 15, 3, 327-333. 2007.

JOHNSTON, R. B.; HANCHETT, S.; KHAN, M. H. The socio-economics of arsenic removal. **Nature Geoscience**, 3, 2-3. 2010.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, 35, 1–9. 2001.

KALTREIDER, R. C. *et al.* Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. **Environmental Health Perspectives**, 109, 245-251. 2001.

KIRKWOOD, A. E. *et al.* Cyanobacterial diversity and halotolerance in a variable hypersaline environment. **Microbial Ecology**, 55, 453–465. 2008.

KOMÁREK, J.; AZEVEDO, M. T. P. *Geitlerinema unigranulatum*, a common tropical cyanoprokaryote from freshwater reservoirs in Brazil. **Algological Studies**, 99, 39-52. 2000.

LEFEBVRE, D. D.; KELLY, D.; BUDD, K. Biotransformation of Hg(II) by Cyanobacteria. **Applied and environmental microbiology**, 73, 1, 243–249. 2007.

- LIN, Y. F.; WALMSLEY, A. R.; ROSEN, B. P. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, 42, 15617-15622. 2006.
- LIU, S. X. *et al.* Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98, 1643-1648. 2001.
- LÓPEZ-CORTÉS, A. *et al.* Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. **International Microbiology**, 4, 227-236, 2001.
- LÓPEZ-MAURY, L.; FLORENCIO, F. J.; REYES, J. C. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, 185, 18, 5363–5371. 2003.
- LÓPEZ-MAURY, L. *et al.* The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, 191, 11, 3534–3543. 2009.
- MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, 58, 201-235. 2002.
- MARGHERI, M. C. *et al.* Genotypic diversity of oscillatoriacean strains belonging to the genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis. **Current Microbiology**, 46, 359–364. 2003.
- MATSCHULLAT, J. *et al.* Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry**. 15, 193-202. 2000.
- MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere - a review. **The Science of the Total Environment**, 249, 297-312. 2000.
- MEEKS, J. C.; CASTENHOLZ, R. W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). **Archives of microbiology**, 78, 1, 25-41.1971.
- MESSENS, J.; SILVER, S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. **Journal of Molecular Biology**, 362, 1, 1-17. 2006.
- MUKHERJEE, A. *et al.* Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. **Journal Health, Population and Nutrition**, 24, 2, 142-163. 2006.
- MUKHOPADHYAY, R. *et al.* Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, 26, 311-325. 2002.

NADDAF, Y. G. **Análise proteômica de *Synechococcus leopoliensis* PCC 7942 em resposta ao cádmio**. Piracicaba-SP, 2004. 101. Dissertação de Mestrado, Agronomia-Microbiologia Agrícola, USP.

OREMLAND, R. S; STOLZ, J. F. The ecology of arsenic. **Science**, 300, 939-944. 2003.

OREMLAND, R. S. *et al.* A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. **Science**, 308, 1305-1308. 2005.

OREMLAND, R. S. *et al.* Arsenic in the evolution of Earth and extraterrestrial ecosystems. **Geomicrobiology Journal**, 26, 522-536. 2009.

OREN, A. *Salts and Brines*. In: B. A. Whitton, & M. Potts (eds). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Dordrecht-Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 10, 281-306.

PANDEY, S.; RAI, R.; RAI, L. C. Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. **Journal of Proteomics**, 1-17. 2011.

PEREIRA, S. F. P. *et al.* Arsenic in the hair of the individuals in Santana-AP-Brazil: significance of residence location. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 84, 368–372. 2010.

PFEIFER, H-R. *et al.* Natural arsenic-contamination of surface and ground waters in Southern Switzerland (Ticino). **Bulletin Applied Geology**, 7, 1, 81-103. 2002.

RANGSAYATORN, N. *et al.* Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. **Environmental Pollution**, 119, 45–53. 2002.

RICHARDSON, L. L. *et al.* The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, 272, 182–187. 2007.

RIPPKA, R. *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, 111, 1-61. 1979.

ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 529, 86-92. 2002.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. *Identificação e ilustração dos principais gêneros*. In: Sant'Anna, C. L. *et al.* *Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras*, 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2006. Cap. 6, p. 35-53.

SANTOS, E. C. O. *et al.* Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 6, 2, 171-185. 2003.

- SCARPELLI, W. Arsenic in the rivers of the Amazon Basin. **TERRÆ**, 2, 1-2, 20-27. 2005.
- SCHOPF, W. J. *The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage*. In: Whitton, B. A. & Potts, M. (eds). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Dordrecht-Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 02, 13-35.
- SHAHEEN, R.; MAHMUD, R.; SEN, J. A study on arsenic decontaminating cyanobacteria of an arsenic affected soil. **Journal of Soil and Nature**, 1, 2, 23-29. 2007.
- SILVER, S. & PHUNG, L. T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. **Applied and environmental microbiology**, 71, 2, 599–608. 2005.
- SRIVASTAVA, A. K. *et al.* Differential response of antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* under arsenite and arsenate stress. **Journal of Basic Microbiology**, 49, 63-72. 2009.
- TAKAHASHI, A *et al.* Some characteristics of arsenate transport in a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. **Applied Organometallic Chemistry**, 15, 291-298. 2001.
- TATON, A. *et al.* Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, 57, 272–289. 2006.
- THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, 89, 1, 47-57. 2005.
- THAKUR, J. K. *et al.* Arsenic contamination of groundwater in Nepal – An Overview. **Water**, 3, 1, 1-20. 2011.
- THIEL, T. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology**, 170, 3, 1143-1147. 1988.
- TSAI, S.; SINGH, S.; CHEN, W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 20, 659–667. 2009.
- TURPEINEN, R. *et al.* Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. **The Science of the Total Environment**, 285, 133-145. 2002.
- WALSBY, A. E. Gas Vesicles. **Microbiological Reviews**, 144, 58, 94-144. 1994.

WANG, S.; ZHAO, X. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. **Journal of Environmental Management**, 90, 8, 2367-76. 2009.

WARD, D. M.; CASTENHOLZ, R. W. *Cyanobacteria in geothermal habitats*. In: B.A. Whitton and M. Potts (eds.). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Dordrecht-Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 03, 37–59.

WASSERMAN, G. A. *et al.* Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, 112, 13, 1329-1333. 2004.

WATERBURY, J. B. *The cyanobacteria – Isolation, purification and identification*. *Prokaryotes*. 2006. Cap. 2.1, 1053-1073.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. *Introduction to the Cyanobacteria*. In: Whitton, B. A. & Potts, M. (editors). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht-Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 01, 1-11.

YBARRA, G. R.; WEBB, R. Differential responses of groel and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. **Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research**, 76-86. 1998.