



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

ANNA RAFAELLA DOS SANTOS FERREIRA

RESISTÊNCIA E BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO NA
CIANOBACTÉRIA *Phormidium* sp.

BRAGANÇA/PA

2012

ANNA RAFAELLA DOS SANTOS FERREIRA

RESISTÊNCIA E BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO NA
CIANOBACTÉRIA *Phormidium* sp.

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: Dr^a. Maria Paula Cruz Schneider

BRAGANÇA/PA

2012

ANNA RAFAELLA DOS SANTOS FERREIRA

RESISTÊNCIA E BIOACUMULAÇÃO DE ARSÊNIO NA CIANOBACTÉRIA
Phormidium sp.

Este trabalho foi julgado para a obtenção do grau de Mestre em
Biologia Ambiental do Instituto de Estudos Costeiros, Universidade
Federal do Pará.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Maria Paula Cruz Schneider (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof.^a. Dr.^a. Alessandra Ciprandi – Membro Titular
Escola Superior da Amazônia - ESAMAZ

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena – Membro Titular
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Dr. Marcelo de Oliveira Lima – Membro Titular
Instituto Evandro Chagas - IEC

BRAGANÇA/PA
2012

I

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas em parceria com o Instituto Evandro Chagas, Laboratório de Toxicologia.

As fontes financiadoras do projeto foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através da concessão de bolsas de estudo e de recursos para desenvolvimento do projeto, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e a Universidade Federal do Pará (UFPA).

II

Dedico à base da minha vida: minha mãe e meus irmãos.

III

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

IV

Agradecimentos

Agradeço à todas as agências de fomento, sem as quais o desenvolvimento deste trabalho não seria possível: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em especial pela concessão da bolsa de estudos contemplada. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e à Universidade Federal do Pará (UFPA).

Agradeço especialmente à minha orientadora Prof. Dra. Paula Schneider pela oportunidade de trabalhar e desenvolver um projeto de pesquisa sobre sua orientação.

Ao Prof. Dr. Agenor Valadares Santos que sempre esteve disposto a nos ajudar. Agradeço toda a ajuda nos experimentos laboratoriais e aos ensinamentos fornecidos durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Evonnildo Gonçalves pelas inúmeras contribuições ao trabalho desenvolvido e pelos “puxões de orelha” que foram fundamentais para adquirir o conhecimento à respeito do trabalho.

Agradeço o pesquisador Dr. Marcelo Lima, do Instituto Evandro Chagas, pelo auxílio no desenvolvimento das análises da dosagem do arsênio.

À professora Rosane Aguiar, da Universidade Federal de Viçosa (MG), que forneceu a cianobactéria utilizada no presente estudo.

À Dr. Alessandra Ciprandi, que mesmo a distância, contribuiu imensamente no trabalho, com os ensinamentos sobre proteômica e arsênio e pela ajuda com os programas.

À todos os membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Polimorfismo de DNA (LPDNA), em especial a Laise Gomes, pela amizade, pelo incentivo fornecido durante alguns momentos ruins e pela ajuda prestada durante os experimentos. Ao Fábio Daniel, pela grande amizade criada durante esses dois anos e ao Rafael Baraúna, que sempre nos auxiliou com os trabalhos da proteômica. Obrigada pela paciência em tirar minhas dúvidas e por sempre ser prestativo nos auxiliando durante os experimentos.

Agradeço minha família, minha mãe Ana Carolina e meus irmãos Renato e José pelo apoio, carinho e compreensão.

À todos, meu muito obrigada!

V
Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	AS CIANOBACTÉRIAS	1
1.1.1	A ESPÉCIE <i>Phormidium</i> sp.	3
1.2	SIGNIFICÂNCIA AMBIENTAL E SOCIAL DO ARSÊNIO	5
1.3	EFEITOS BIOLÓGICOS DO ARSÊNIO EM MICRO-ORGANISMOS	8
1.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM PROCARIOTOS	10
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>Phormidium</i> sp.....	15
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA.....	15
3.3	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Phormidium</i> sp.....	16
3.4	DOSAGEM DO ARSÊNIO.....	17
4	RESULTADOS.....	18
4.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO PARA <i>Phormidium</i> sp.....	18
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Phormidium</i> sp.....	19
4.3	PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>Phormidium</i> sp. EM MEIO CONTENDO ARSENATO DE SÓDIO	19
4.4	CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO DE CULTURA.....	20
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO.....	25
7	REFERÊNCIAS.....	26

VI

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Classificação polifásica das cianobactérias (Hoffmann *et al.*, 2005).....pág. 02

Figura 1: Espécie *Phormidium* sp. (A) aspecto geral da espécie; (B) hormogônio. Fonte: Sant'anna, (2006).....pág. 04

Figura 2: Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do arsênio no ambiente. O ciclo mostra as duas principais fontes de arsênio e a conseqüente contaminação ambiental. Adaptado de Qin *et al.* (2006).....pág. 06

Figura 3: Mapa mundial das populações em risco pela contaminação por arsênio. Os números indicam o número de pessoas cujo consumo diário de água inclui níveis de arsênio acima dos limites estabelecidos (10 µg/L). As regiões mais escuras indicam as maiores contaminações. Fonte: Liévremont *et al.* (2009).....pág. 08

Figura 4: Mecanismos bioquímicos realizado por micro-organismos como resistência ao arsênio. (1): Entrada do arsênio na célula; (2): Redução de arsenato para arsenito pela proteína ArsC; (3): Expulsão do arsenito da célula pela proteína ArsB em associação com uma ATPase; (4): Metilação; (5): Redução dissimilatória; (6): Oxidação de arsenito. Fonte: Tsai *et al.* (2009).....pág. 11

Figura 5: Procedimento utilizado para extração da clorofila *a* de *Phormidium* sp. em metanol.....pág. 16

Figura 6: Perfil de crescimento de *Phormidium* sp. em diferentes concentrações de arsenato de sódio durante 20 dias de cultivo.....pág. 18

Figura 7: Curva de crescimento de *Phormidium* sp. expressa em função da concentração de clorofila *a* (µg/ml).....pág. 19

Figura 8: Perfil de crescimento de *Phormidium* sp. em meio de cultura sem a presença do arsenato de sódio (setas com losango), em meio de cultura contendo 30 mM de arsenato (setas com quadrados) e em meio com 100 mM de arsenato (setas com triângulos).....pág. 19

Figura 9: Concentração de arsênio no meio de cultura durante o crescimento de *Phormidium* sp. em 30 mM de arsenato de sódio e em meio desprovido do metalóide. A curva de crescimento indica os pontos selecionados para a dosagem do arsênio durante o cultivo cianobacteriano.....pág. 21

VII

Lista de Abreviaturas e Símbolos

As	Arsênio
As(-III)	Arseneto
As(0)	Arsênio elementar
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
ATP	Trifosfato de Adenosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMAA	Ácido Dimetilarsínico
DMA(III)	Ácido Dimetilarsenioso
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FeAsS	Arsenopirita
FeAsO₄	Arsenato de Ferro
GSH	Glutathiona
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Vírus</i>)
MMA	Ácido Monometilarsônico
MMA(III)	Ácido Monometilarsenioso
NCM	Nível de Contaminação Máxima
Nm	Nanômetro
PPB	Partes por Bilhão
PPM	Partes por Milhão
Sb	Antimônio
TMA(III)	Trimetilarsina
TMAO	Óxido de Trimetilarsina
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFV	Universidade Federal de Viçosa

VIII RESUMO

A contaminação ambiental por arsênio vem aumentando nos últimos anos, seja através de fontes naturais ou antropogênicas, o que pode ocasionar uma maior exposição do homem a este composto tóxico. Vários estudos vêm analisando o potencial de espécies cianobacterianas como possíveis biorremediadoras na busca de soluções para diminuir os impactos causados por este metaloide. A cianobactéria filamentosa *Phormidium* sp. se destaca por apresentar mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às diversas condições ambientais. O presente estudo objetivou analisar o perfil de resistência da *Phormidium* sp. em diferentes concentrações de arsenato de sódio. A cianobactéria foi inoculada em tubos contendo 4 mL de meio BG-11 líquido e diferentes concentrações de arsenato (5, 10, 30, 50, 100, 130, 150, 200 e 250 mM) e sem a presença do metaloide (controle) e cultivadas durante 20 dias a 25°C, sem agitação e com fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. A toxicidade do arsenato para *Phormidium* sp. foi caracterizada pela inibição do crescimento, sendo este determinado pela concentração de clorofila *a*. Todas as condições foram realizadas em triplicatas. A determinação do arsênio total presente nas amostras foi obtida através da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido, do Instituto Evandro Chagas. A resistência de *Phormidium* sp. ao arsenato foi observada em até 50 mM do composto ($p > 0,05$). À partir de 100 mM de arsenato foi observada inibição do crescimento cianobacteriano ($p < 0,05$). As análises da dosagem de arsênio total no meio de cultura mostram que, durante os primeiros dias de experimento, a concentração de arsênio no meio de cultura foi reduzido, seguido de um aumento gradativo na concentração deste metaloide. Provavelmente, esta cianobactéria pode acumular o arsênio e posteriormente excretar este metaloide para o meio extracelular. Os resultados obtidos indicam a capacidade que a cianobactéria *Phormidium* sp. possui de crescer em meio contendo altas concentrações de arsênio. No entanto, outras análises se tornam fundamental para elucidar as vias metabólicas envolvidas durante o processo de resistência a este metaloide.

Palavras-chaves: Arsênio, Bioacumulação, Cianobactéria, *Phormidium* sp.

IX

ABSTRACT

Environmental contamination by arsenic has been increasing in recent years, either through natural or anthropogenic sources, which can cause greater exposure of humans to this toxic compound. Several studies have been developed to analyze the capacity of cyanobacterial species in bioremediation. The filamentous cyanobacterium *Phormidium* sp. excels due to well developed mechanisms to adapt to different environmental conditions. The present study aimed to analyze the resistance profile of *Phormidium* sp. at different concentrations of sodium arsenate. The cyanobacterium was inoculated in tubes containing 4 ml of BG-11 liquid medium and different concentrations of arsenate (5, 10, 30, 50, 100, 130, 150, 200 and 250 mM) without the presence of metalloid (control) and cultured for 20 days at 25 ° C without agitation and with a photoperiod of 12/12 h light / dark. The toxicity of arsenate to *Phormidium* sp. has been characterized by growth inhibition being determined by the concentration of chlorophyll *a*. All conditions were performed in triplicate. The determination of total arsenic in the samples was obtained using the technique of optical emission spectrometry with inductively coupled plasma, the Instituto Evandro Chagas. The resistance of *Phormidium* sp. to arsenate was observed up to 50 mM of compound ($p>0.05$). Growth inhibition was observed above 100mM of arsenate ($p<0.05$). The analyzes of the total dose of arsenic in the culture medium showed that during the first day of experiment, the concentration of arsenic in the culture medium was lowered, followed by a gradual increase in the concentration of this metalloid. Probably, this cyanobacteria can accumulate arsenic and later excrete this metalloid to the extracellular medium. The results indicate the ability of the cyanobacterium *Phormidium* sp. has to grow in medium containing high concentrations of arsenic. However, other analyzes become fundamental for elucidating the metabolic pathways involved in the process of resistance to this metalloid.

Key-words: Arsenic, Bioremediation, Cyanobacterium, *Phormidium* sp.

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias compreendem um dos maiores e mais diversos grupos de procariotos, podendo ser encontradas em ambientes aquáticos, terrestres e até mesmo em condições extremas como em geleiras, proximidades de vulcões e fontes termais (AZEVEDO & SANT'ANNA, 2006). Apresentam uma diversificação quanto à sua forma, sendo encontradas espécies unicelulares cocóides, filamentosas ou filamentosas ramificadas (BRANDÃO & DOMINGOS, 2006). A parede celular é semelhante a de bactérias Gram-negativas, porém com envoltório mais espesso, podendo chegar até 700 nm de espessura, como observado em *Oscillatoria princeps* (HOICZIK & BAUMEISTER, 1995).

A adaptação das cianobactérias aos mais variados ambientes pode estar associada à presença de determinadas estruturas, como os heterócitos, estruturas especializadas na captação de nitrogênio atmosférico; os acinetos, células que funcionam como esporos de resistência em condições adversas; aerótopos, que permitem a migração vertical na coluna d'água, e à presença de grãos de polifosfatos (BRANDÃO & DOMINGOS, 2006; AZEVEDO & SANT'ANNA, 2006).

Atualmente, a taxonomia das cianobactérias tenta reunir as características morfológicas, ecológicas, bioquímicas, ultraestruturais e genéticas em sistemas de classificação polifásicos. Dessa forma, Hoffmann *et al.* (2005) propuseram uma nova revisão taxonômica com base nesta nova abordagem. Nesta classificação, as ordens cianobacterianas estão agrupadas em quatro subclasses como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação polifásica das cianobactérias (Hoffmann *et al.*, 2005)

Taxonomia	Morfologia
Subclasse Gloeobacterophycidae	
Ordem Gloeobacterales	Cocóides sem tilacóides
Subclasse Synechococcophycidae	
Ordem Synechococcales	Unicelulares ou coloniais, tilacóides paralelos à superfície da célula.
Ordem Pseudanabaenales	Tilacóides paralelos à superfície da célula, filamentos finos.
Subclasse Oscillatoriophyycidae	
Ordem Chroococcales	Unicelulares ou coloniais, arranjo radial dos tilacóides.
Ordem Oscillatoriales	Arranjo radial dos tilacóides, filamentosos largos.
Subclasse Nostocophycidae	
Ordem Nostocales	Filamentosos heterocitados, arranjo irregular dos tilacóides.

As cianobactérias vivem em equilíbrio como os demais organismos, quando em condições naturais. Entretanto, alterações nesses ambientes, ocasionam a presença de florações ou “blooms” de cianobactérias, fenômeno caracterizado pelo intenso crescimento desses micro-organismos na água (CARMICHAEL, 1994). As florações são ocasionadas pela eutrofização dos ambientes aquáticos, decorrentes principalmente de atividades urbanas e industriais, que descarregam seus efluentes nos corpos d’água provocando o acúmulo de nutrientes ricos em fósforo e nitrogênio que, juntamente com a elevada temperatura da água, se tornam ambientes propícios para estas florações (FERNANDES, 2009).

As florações de cianobactérias causam impactos sociais, econômicos e ambientais. Entre estes impactos, pode-se destacar a alteração da coloração da água (“natas” verdes na superfície), odor desagradável, além de afetar a capacidade de sobrevivência de organismos aquáticos, pois estas florações acarretam na desoxigenação, alterando assim a química da água. Além disso, esse fenômeno ocasiona a produção de metabólitos secundários bioativos, como as cianotoxinas, com

propriedades tóxicas que pode afetar a saúde de muitos animais, inclusive o homem (CARMICHAEL, 1997).

As cianotoxinas são um grupo diverso de toxinas naturais. A maioria das cianotoxinas identificadas até o momento apresentam efeito tóxico para a maioria dos mamíferos terrestres e para a biota aquática (WHO 1999). Os mecanismos de toxicidade cianobacterianas atualmente descritos são diversos e variam de efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos (WHO 1999).

Muitas pesquisas têm demonstrado a importância das cianobactérias na biotecnologia (PINOTTI & SEGATO, 1991; ABED *et al.*, 2008; BERRY *et al.*, 2008). Algumas dessas aplicações incluem o uso destes micro-organismos na agricultura, na área médica, na alimentação e na produção de vários metabólitos secundários, incluindo toxinas, vitaminas, enzimas e produtos farmacêuticos. A aplicação de cianobactérias tem se mostrado promissora na proteção ambiental, devido à capacidade que muitas espécies apresentam de absorver poluentes inorgânicos, como metais e metalóides, em ambientes impactados. Entre estes organismos, pode-se destacar a cianobactéria *Phormidium* sp., espécie alvo do presente estudo.

1.1.1 A ESPÉCIE *Phormidium* sp.

De acordo com Hoffmann *et al.* (2005), a cianobactéria *Phormidium* sp. (Figura 1-A) pertence à Classe Cyanophyceae, Subclasse Oscillatoriophyceae, Ordem Oscillatoriales e Família Phormidiaceae. O gênero *Phormidium* (KÜTZING ex GOMONT, 1892) compreende espécies filamentosas, com tricomas relativamente longos e homocitados (constituídos apenas de células vegetativas), normalmente com 2-12 µm de largura. As células são tipicamente isodiamétricas, ou pouco mais longas ou mais curtas do que largas e geralmente não apresentam aerótopos, mas estes podem ser formados em condições propícias.

A reprodução desses micro-organismos ocorre pela fragmentação do tricoma formando pequenas células denominadas hormogônias (Figura 1-B). Em alguns casos a fragmentação do tricoma pode ser auxiliada por células necróticas, células encontradas de um ou de ambos os lados do tricoma e sua morte e lise auxilia na quebra transcelular do tricoma e liberação das hormogônias (HOFFMANN *et al.*, 2005). Neste tipo de

reprodução, a região final do tricoma se diferencia, formando o hormogônio, e este é liberado do tricoma, dando origem a novos indivíduos (BRANDÃO E DOMINGOS, 2006).

Assim como a maioria das cianobactérias, *Phormidium* sp. pode ser encontrada nos mais variados ambientes, inclusive nos extremos como os polares, os desérticos e em águas termais. Este gênero inclui por volta de 200 espécies distribuídas em todo o globo (BICUDO, 2006).

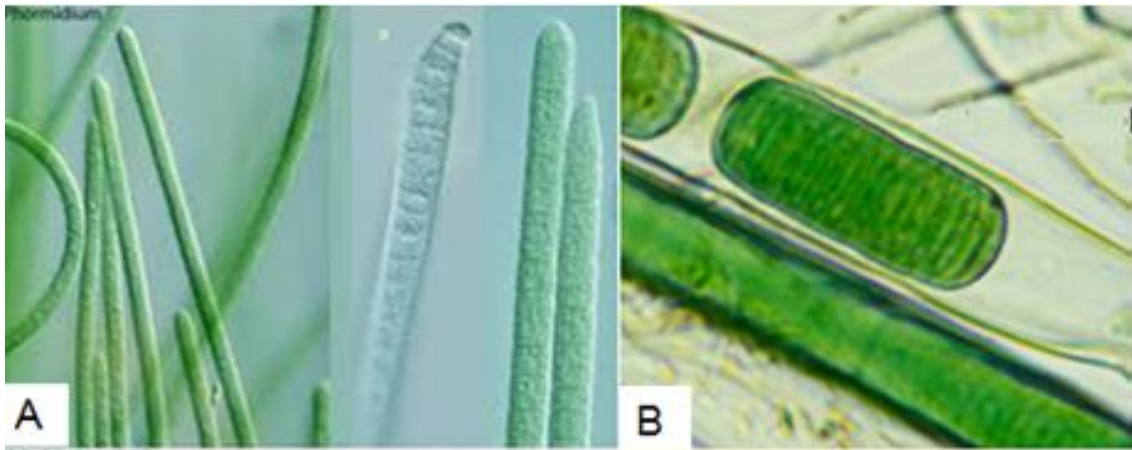


Figura 1: Espécie *Phormidium* sp. (A) aspecto geral da espécie; (B) hormogônio. Fonte: Azevedo & Sant'anna, 2006.

Vários estudos observaram que algumas espécies do gênero *Phormidium* apresentam grande importância no campo terapêutico, alimentício e ambiental (ABED *et al.*, 2008; BHATTACHARYA & PAL, 2011; BLOOR & ENGLAND, 1989, RESHEF *et al.*, 1997). Glicolipídeos isolados de *P. tenue* demonstraram inibir a atividade da DNA polimerase associada com a transcriptase reversa do HIV-1 (RESHEF *et al.*, 1997; RAJEEV & XU, 2004). Na Índia, a espécie *P. valderianum* tem sido usada como uma fonte completa para alimentação de organismos aquáticos, devido ao seu valor nutricional e sua natureza não tóxica (ABED *et al.*, 2008). Polissacarídeos capsulados isolados de diferentes linhagens de *Phormidium* mostraram propriedades anti-inflamatórias (TENEVA *et al.*, 2005).

Alguns estudos analisaram o potencial das espécies de *Phormidium* para a remoção de poluentes de ambientes aquáticos contaminados (MATSUTO *et al.*, 1984; WANG *et al.*, 1998; COHEN, 2002). Em estudo realizado por Wang *et al.* (1998) a biorremediação de alguns metais traços (chumbo, cobre, cádmio, zinco, níquel) pela

Phormidium sp. foi avaliada em diferentes valores de pH. Os resultados mostraram que as maiores taxas de absorção foram as de chumbo (13.600 mg/Kg) e cobre (10.100 mg/Kg) em solução levemente ácida (pH=5). Dentro de 60 minutos, a *Phormidium* sp. reduziu as concentrações destes metais, exceto o cádmio, para níveis abaixo dos critérios de qualidade da água estipulados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) (0,01 mg/L).

Em relação ao arsênio, algumas espécies de *Phormidium* mostraram tolerar altas concentrações deste metalóide (MATSUTO *et al.*, 1984; BHATTACHARYA & PAL, 2011; MAEDA *et al.*, 2004). A resistência dessas espécies ao composto tóxico foi detectada por Bhattacharya & Pal (2011), que observaram um crescimento em até 0.003 mM de arsenato de sódio, e por Shaheen *et al.* (2007), que observaram uma tolerância em até 30 mM de arsenato em meio de cultura líquido.

1.2 SIGNIFICÂNCIA AMBIENTAL E SOCIAL DO ARSÊNIO

Estudos enfocando a contaminação ambiental por compostos tóxicos são de extrema importância, pois os metais e metalóides liberados na natureza permanecem durante centenas de anos afetando os ambientes aquáticos e terrestres. Entre estes elementos tóxicos, pode-se destacar o metalóide arsênio (As), que vem recebendo atenção das autoridades governamentais e de saúde pública devido ao seu potencial poluidor e ao grande volume gerado diariamente (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002).

O arsênio apresenta uma ampla distribuição sendo encontrado nos solos, atmosfera, em ambientes aquáticos (SPERLING, 2002) e em organismos, como ostras e crustáceos (WANG & ZHAO, 2009). No ambiente, ocorre em quatro estados de oxidação: arseneto As(-III), arsênio elementar As(0), arsenito As(III) e arsenato As(V), sendo as duas últimas as formas inorgânicas mais comuns (ROSEN, 2002). Outras formas em que este elemento pode ser encontrado incluem as formas orgânicas como a arsenobetaína, comumente encontrada em ambientes marinhos (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002; DEMBITSKY & REKANZA, 2003), e os arsenoaçúcares, que são mais abundantes em plantas (WANG & ZHAO, 2009). Além destes, podem ser encontradas espécies metiladas voláteis, como ácido monometilarsenioso (MMA(III)), ácido monometilarsônico (MMA(V)),

ácido dimetilarsenioso (DMA(III)), trimetilarsina (TMA(III)) e óxido de trimetilarsina (TMAO) (BARRA, 2000).

Este metalóide pode ser liberado para o ambiente através de fontes naturais (vulcões, erosão e intemperismo de solos e rochas), e de atividades antropogênicas, como queima de combustíveis fósseis, indústrias de fundição de metais, uso de pesticidas, preservantes de madeira, refinaria do petróleo e atividades de mineração (DEMBITSKY & REZANKA, 2003; SANTOS *et al.*, 2003).

O mineral de arsênio mais comum é o arsenopirita (FeAsS) (SMEDLEY & KINNIBURGH, 2002). A oxidação natural deste mineral, promovido pelo intemperismo, forma compostos pentavalentes, como o arsenato de ferro (FeAsO₄), e assim, liberam arsênio para águas subterrâneas, águas superficiais, solo e atmosfera, ocasionando a contaminação destes ambientes (BORBA *et al.*, 2004) (Figura 2). O ciclo biológico do arsênio, inclui a metilação de arsenito para ácido monometilarsonico (MMA(V)) ou ácido dimetilarsinico (DMAA), seguido por outros compostos organoarsênicos e à metilação do arsênio a trimetilarsina (TMA), o qual se volatiliza na atmosfera (ROY & SAHA, 2002).

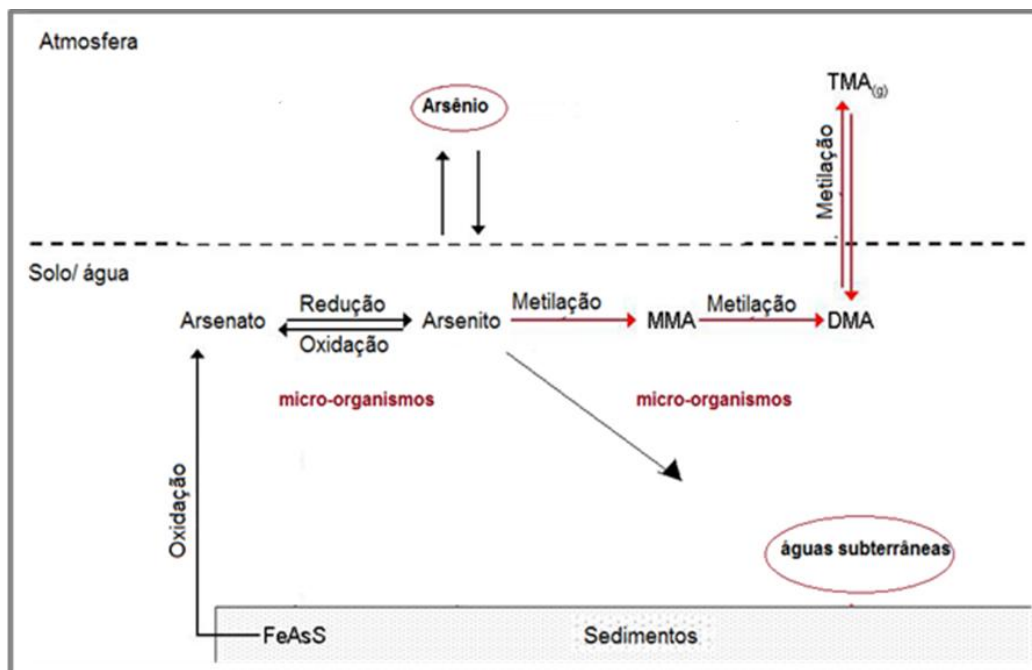


Figura 2: Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do arsênio no ambiente. O ciclo mostra as duas principais fontes de arsênio e a consequente contaminação ambiental. Adaptado de Qin *et al.* (2006).

Vários países já relataram casos de contaminação por arsênio, entre os quais podemos destacar: Bangladesh, China, Índia, Estados Unidos e Nepal (WHO, 2001). No Brasil, a contaminação ambiental por este metalóide foi relatado no Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais), onde a contaminação está relacionada à intensa mineração do ouro; no Vale do Ribeira, localizado no sul do estado de São Paulo e ao leste do estado do Paraná, onde ocorreu intensa atividade de mineração e refino de metais até 1996 e em Santana, no Amapá, que apresenta uma alta contaminação por arsênio em decorrência das atividades do minério de manganês por cerca de 50 anos (SANTOS *et al.*, 2003).

A população humana contamina-se por arsênio pela ingestão da água e alimentos contaminados por este metalóide, pela inalação de gases, contato dérmico e via parental (KHAN, 2009). O contato com o arsênio em altas concentrações e a exposição prolongada pode causar câncer de pele, de pulmão e de pâncreas, abalos no sistema nervoso (CHEN *et al.*, 1992), assim como conjuntivite e problemas cardiovasculares (CERVANTES *et al.*, 1994; BARRA *et al.*, 2000).

Diante destes riscos, os níveis de contaminação máxima (NCM) permitidos para o arsênio estão sendo reduzidos em águas de abastecimento público. Em 2003, a Comissão Europeia reduziu o NCM de arsênio em água de consumo de 50 para 10 µg/L (EUROPEAN COMMISSION DIRECTIVE, 1998). No Brasil, a concentração máxima permitida é de 10 µg/L (portaria 2914/2011 do MINISTÉRIO DA SAÚDE e portaria 396/2008 CONAMA). Entretanto, em alguns países como Argentina, Austrália, Chile e México, os níveis de arsênio na água potável estão acima dos limites estabelecidos (WHO, 2001) (Figura 3).

Apesar da toxicidade, alguns compostos de arsênio apresentam uma ampla utilização, com cerca de 75% do consumo total de arsênio sendo utilizado na agricultura, como em herbicidas, inseticidas e desfolhantes (SUBRAMANIAN *et al.*, 2002). Os compostos inorgânicos do arsênio foram muito utilizados como medicamentos até a metade do século XX, como no tratamento de leucemia, psoríase e asma crônica (ATSDR, 2000). Atualmente, agentes terapêuticos como o melarsoprol são utilizados no tratamento de estágios avançados da doença do sono (BHATTACHARJEE, 2009). O trióxido de arsênio apresenta efeito antitumoral, sendo utilizado no tratamento da leucemia promielocítica aguda (PLATANIAS, 2009). Além disso, este elemento é bastante

utilizado na fabricação de pigmentos, vidros, pesticidas e em ração animal, principalmente de aves e suínos, como promotor do crescimento (SPERLING, 2002).

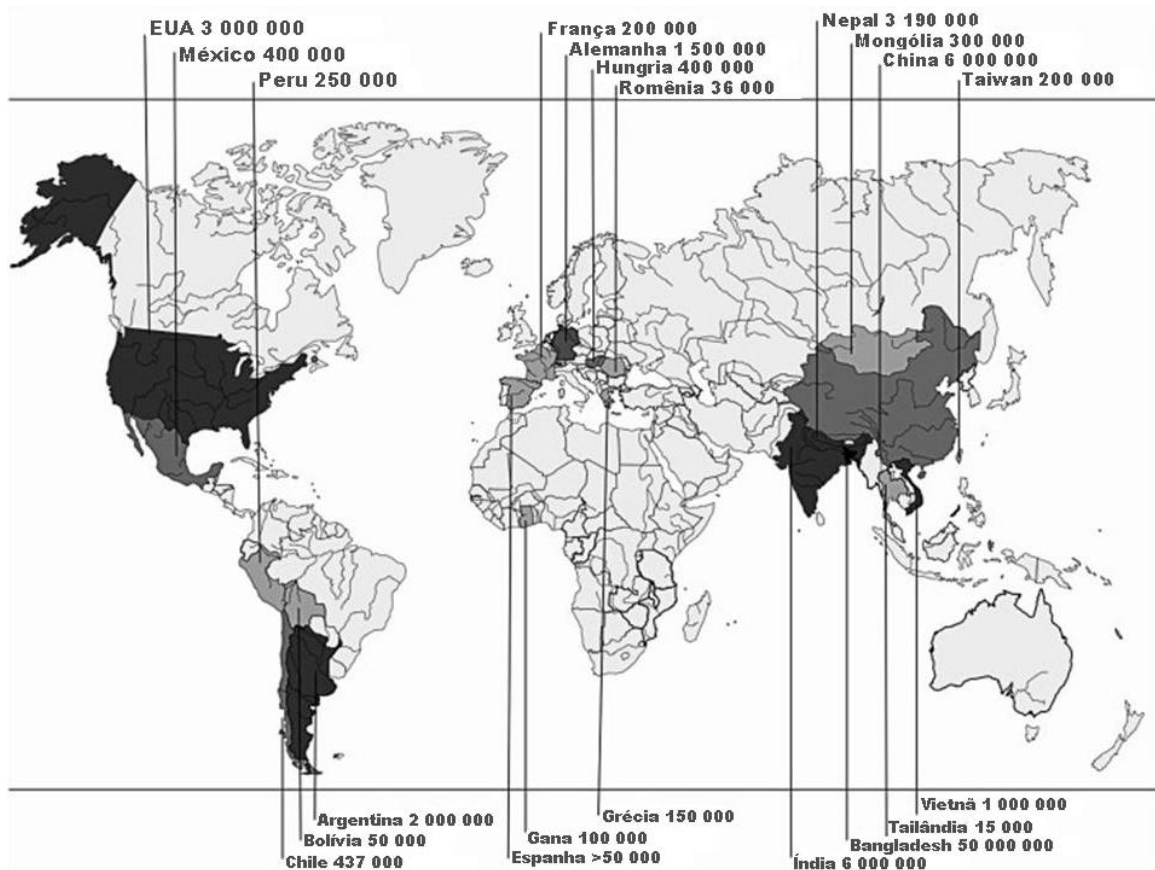


Figura 3: Mapa mundial das populações em risco pela contaminação por arsênio. Os números indicam o número de pessoas cujo consumo diário de água inclui níveis de arsênio acima dos limites estabelecidos (10 µg/L). As regiões mais escuras indicam as maiores contaminações. Fonte: Liévremont *et al.* (2009).

1.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ARSÊNIO EM MICRO-ORGANISMOS

As duas formas mais comuns de arsênio, arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)], possuem efeitos tóxicos diferentes dentro das células dos micro-organismos, sendo o arsenito cerca de 60 vezes mais tóxico que arsenato (BARRA *et al.*, 2000). Os danos causados pelo arsenito são ocasionados pela sua ligação aos grupos tióis dos resíduos de cisteína e ao nitrogênio imidazólico dos resíduos de histidinas, produzindo

modificações estruturais nas proteínas e levando à inativação de algumas enzimas (VENTURA–LIMA *et al.* 2010). O arsenato, por ser um análogo estrutural do fosfato e competir com ele pelo mesmo sítio de ligação, afeta as atividades de fosforilação, principalmente a síntese de ATP, devido à inativação da fosforilação oxidativa (LÉONARD & LAUWERYS, 1980; CERVANTES *et al.* 1994), interferindo no metabolismo energético das células (LIÈVREMONT, 2009).

A toxicidade do arsenito já foi analisada por Budd *et al.* (1986), que observaram que 200 µM de arsenito interferiu na fotossíntese e na biosíntese de aminoácidos da cianobactéria *Synechococcus leopoliensis*. Ciprandi *et al.* (2012) observaram que o proteoma diferencial de *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria Gram-negativa, em resposta ao arsenito de sódio, revelou que as maiores alterações causadas por este metalóide estão associadas com o estresse oxidativo, que podem acarretar lesões no DNA, inativação de enzimas e alteração no metabolismo (IMLAY, 2008). Além disso, os autores observaram a expressão de enzimas do metabolismo dos lipídeos (acil-CoA desidrogenase e enoil-CoA hidratase), uma do metabolismo de aminoácidos (3-hidroxi-isobutirato) e uma do metabolismo de coenzimas (riboflavina sintase), após exposição ao arsenito, o que demonstra que os efeitos do arsênio podem atingir vias metabólicas importantes para a manutenção da célula.

Devido a similaridade estrutural entre o arsenato e fosfato, vários estudos são realizados com o intuito de verificar a toxicidade deste metalóide na presença e/ou ausência do fosfato (THIEL, 1988; GOMES *et al.*, 2007; GONG *et al.*, 2009). Thiel (1988) relata que não ocorre uma competição entre o fosfato e o arsenato para entrar nas células da cianobactéria *Anabaena variabilis*, onde o arsenato não inibiu a absorção de fosfato. Desta forma, o fosfato protege as células contra a toxicidade do arsenato. Gomes *et al.* (2007) observaram que a cianobactéria *Geitlerinema* UFV-E01 absorveu as maiores concentrações de arsenato em meio contendo baixas concentrações de fosfato e, após 24 horas de exposição ao arsênio, esta espécie acumulou cerca de 665,25 µg/g de As em suas células, e não foi observada redução na produção de biomassa. Entretanto, ao analisarem a resistência de *Stigeoclonium* UFV-E01, uma clorófito, ao arsenato de sódio, estes autores observaram que o seu crescimento não foi influenciado pelas concentrações de fosfato no meio de cultura. Diferentemente do que foi observado em *Geitlerinema*, esta espécie apresentou redução na produção de biomassa e alterações

morfológicas nos filamentos caracterizados pelo aparecimento de células estreitas e longas, com cloroplastos deformados e de tamanhos reduzidos quando comparados com as células saudáveis.

O arsenato pode induzir, em algumas cianobactérias, a transcrição de genes da síntese de microcistina, uma hepatotoxina, ou seja, uma toxina responsável por graves problemas hepáticos, podendo causar a morte de animais e seres humanos (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003). Em estudo realizado por Gong *et al.* (2009), os autores observaram que o conteúdo de microcistina celular da cianobactéria *Microcystis* PCC7806 aumentou linearmente com a exposição desta espécie a diferentes concentrações de arsenato (0,01 μM a 100 μM), e os corpos de polifosfato celular auxiliaram as enzimas necessárias e precursoras para a síntese de microcistina (DAI *et al.*, 2008). De acordo com Rohrlack *et al.*, (1999) essa liberação de toxinas pode ocorrer como um sistema de defesa destes organismos quando em contato com o metalóide.

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO EM PROCARIOTOS

A ubiquidade do arsênio nos ambientes naturais tem permitido aos microorganismos o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra a toxicidade deste metalóide (MATEOS *et al.*, 2006). Com isso, alguns organismos podem minimizar a captação de arsenato através do sistema de transporte de fosfato (CERVANTES *et al.*, 1994), outros podem volatilizar o metalóide através da metilação enzimática (QIN *et al.*, 2005) e muitos possuem o mecanismo mais comum de resistência, arranjados na forma de operon (operon *ars*), os quais podem estar presentes em genes cromossômicos ou plasmidiais (ORDÓÑZ *et al.*, 2005).

O operon *ars* possui diferentes arranjos gênicos, podendo ser encontrado um agrupamento de três genes (*arsRBC*) ou cinco genes (*arsRDABC*) que estão organizados em uma simples unidade transcricional (SILVER & WALDERHAUG, 1992). Este mecanismo de resistência já foi descrito em várias bactérias como *Escherichia coli* (SILVER *et al.*, 1981), *Comamonas* sp. (Zhang *et al.*, 2007), entre outras (CARLIN, 1995; MATEOS *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007; LÓPEZ-MAURY *et al.*, 2003).

Nesta via de detoxificação (Figura 4), os organismos absorvem o arsenato (V) pelo sistema de transporte de fosfato (Pit e Pst em *Escherichia coli*), já o arsenito é captado através de aquaglicerolporinas, canais multifuncionais que transportam solutos como glicerol e uréia (MENG *et al.*, 2004) (Figura 4-1). No interior celular, o arsenato é reduzido a arsenito pela enzima ArsC (Figura 4-2) e é, então, expelido do citoplasma através de uma proteína carreadora de arsenito, ArsB (Figura 4-3), que usa a energia do potencial de membrana, ou sequestrado em compartimentos intracelulares, como arsenito livre ou junto com a glutaciona (GSH) ou outros tióis (MATEOS *et al.*, 2006).

As proteínas ArsR e ArsD atuam como repressoras regulatórias (BUTCHER & RAWLINGS, 2002). ArsR é um repressor que controla os níveis basais de expressão em resposta a presença do arsenito, ao passo que ArsD é uma metalochaperona que transfere o arsenito para ArsA, esta por sua vez é uma ATPase que forma um complexo com a proteína transmembrana ArsB para expulsar o arsenito da célula (LIN *et al.*, 2006).

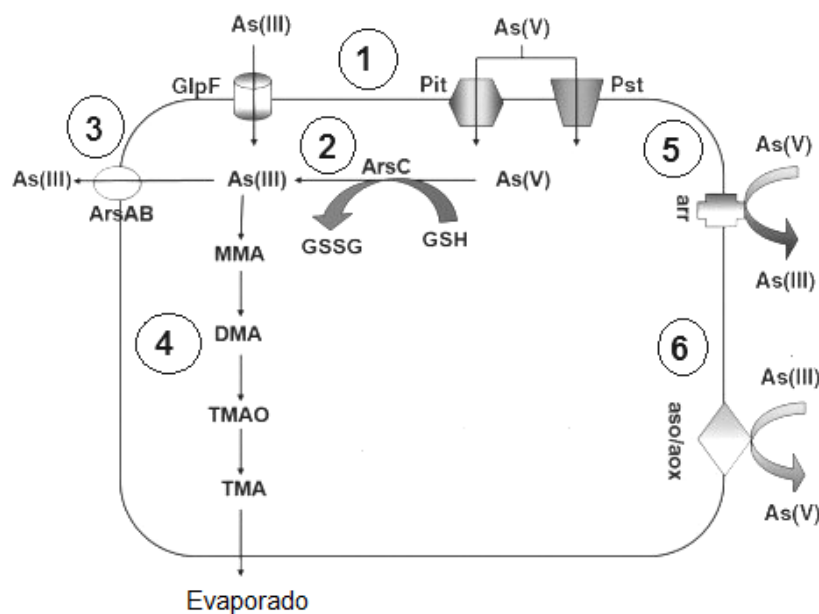


Figura 4: Mecanismos bioquímicos realizados por micro-organismos como resistência ao arsênio. (1): Entrada do arsênio na célula; (2): Redução de arsenato para arsenito pela enzima ArsC; (3): Expulsão do arsenito da célula pela proteína ArsB em associação com uma ATPase; (4): Metilação; (5): Redução dissimilatória; (6): Oxidação de arsenito. Fonte: Tsai *et al.*, 2009.

Em alguns casos, as bactérias são capazes de obter energia para o crescimento através de transformações redox de arsênio, como alguns procariontos capazes de “respirar” usando arsenato como aceptor de elétrons terminal, no lugar do oxigênio, em condições anaeróbicas (LLOYD & OREMLAND, 2006). Nesta situação, ocorre a redução de arsenato para arsenito pela subunidade ArrA no espaço periplasmático, e a condução dos elétrons para a cadeia respiratória pela subunidade ArrB (Figura 4-5). Já as bactérias quimiolitotróficas obtêm energia para o crescimento através da oxidação de arsenito, usando um pouco desta energia para fixar CO₂ para a síntese de material celular (LLOYD & OREMLAND, 2006). Esta oxidação ocorre por ação da enzima arsenito oxidase (Aso ou Aox) (Figura 4-6).

Os estudos que descrevem os mecanismos de resistência ao arsênio de cianobactérias são incipientes. Contudo, López-Maury *et al.* (2003), caracterizaram o operon *ars* na espécie *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dentro do genoma completamente sequenciado, foi encontrado um agrupamento de três genes denominados *arsB*, que codifica um suposto carreador de arsenito e antimônio, *arsH* que codifica uma proteína de função desconhecida na resistência ao arsênio, e *arsC*, que codifica uma suposta arsenato redutase. Além de resistência ao arsênio, este operon também confere resistência ao antimônio (Sb), que possui propriedades químicas similares ao arsênio.

Além deste operon, López-Maury *et al.* (2009) identificaram dois genes adicionais e similares que codificam para uma arsenato redutase em *Synechocystis* sp. PCC 6803, os quais foram designados de *arsI1* e *arsI2*. Estes genes mostraram um papel secundário na resistência ao arsenato, sendo essenciais apenas na ausência de *ArsC*, permitindo a tolerância desta cianobactéria a baixas concentrações de arsênio.

Vários estudos já mostraram que espécies do gênero *Phormidium* apresentam alta resistência em ambientes contaminados por metais e metalóides, como o arsênio (AKHTAR *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1998; MAEDA *et al.*, 2004; MATSUTO *et al.*, 1984; BHATTACHARYA & PAL, 2011), onde já foi observado a tolerância desta cianobactéria em até 30 mM de arsenato de sódio (SHAHEEN *et al.*, 2007). Esses dados indicam a importância de estudos enfocando a resistência desta cianobactéria a um dos metalóides mais prejudiciais ao ambiente e aos animais, incluindo os seres humanos. O arsênio é o composto tóxico mais comum no ambiente, sendo o primeiro da lista de substâncias perigosas segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA)

(<http://www.atsd.cdc.gov/cercla/07list.html>). As tecnologias utilizadas para a remediação de As em ambientes contaminados, tornam-se cada vez mais importantes em todo o mundo (SMITH *et al.*, 2000; MATSCHULLAT *et al.*, 2000; MEHARG, 2004; JANKONG *et al.*, 2007). Algumas técnicas de remediação química ou física têm sido utilizadas, como coagulação com sais de ferro e de alumínio seguida de filtração, além da adsorção química e troca iônica (TSAI, 2009). Entretanto, são técnicas demoradas, dispendiosas e podem resultar em poluição secundária (HUANG *et al.*, 2004). Em comparação, as técnicas utilizadas para remediação de poluentes por micro-organismos, como bioprocessos de mobilização ou imobilização do metalóide por adsorção, precipitação, biometilação, complexação e oxidação - redução de arsênio (WANG, 2009), se tornam promissoras, devido ao menor custo nos processos de remediação, sem acúmulo de resíduos e, conseqüentemente, atuando com baixo impacto ambiental (YANG *et al.*, 2012).

Neste sentido, se torna fundamental conhecer o metabolismo de *Phormidium* sp., ou seja, analisar a capacidade que *Phormidium* sp. tem para transformar ou acumular o arsênio presente no meio. E, portanto, contribuir para o desenvolvimento dos processos que visem reduzir a contaminação ambiental por este composto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a resistência da cianobactéria *Phormidium* sp. ao arsenato de sódio.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a curva de crescimento de *Phormidium* sp.;
- Analisar o perfil de crescimento da cianobactéria na presença do arsenato em comparação ao crescimento sem o metalóide;
- Analisar o nível de resistência da cianobactéria em diferentes concentrações de arsenato de sódio;
- Avaliar o processo de bioacumulação do arsênio pela cianobactéria *Phormidium* sp.;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA *Phormidium* sp.

A cianobactéria *Phormidium* sp., gentilmente cedida pela professora Rosane Aguiar da Universidade Federal de Viçosa (MG), foi isolada de um descarte de arsênio do laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Viçosa e foi cultivada em meio BG-11 líquido (ALLEN, 1968) a 25°C, com fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro, conforme Gomes *et al.* (2007).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA

Para a determinação da maior concentração de arsenato de sódio que não afetou o crescimento da cianobactéria *Phormidium* sp., esta foi cultivada em meio BG-11 sólido durante vinte dias. Após esse período, a cianobactéria foi inoculada em meio líquido contendo diferentes concentrações de arsenato (0 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 130 mM, 150 mM, 200 mM e 250 mM). Os inóculos foram retirados do meio sólido com o auxílio de uma ponteira, onde retirava-se do meio, pequenos “círculos” com diâmetro de 0,5 cm contendo células de cianobactéria que eram, então, inoculadas em tubos 13x10 mm contendo 4 mL de BG-11 líquido (Figura 5).

Após 20 dias de cultivo, os tubos contendo a cianobactéria foram centrifugados a 19.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de metanol. Posteriormente, os tubos foram agitados em vórtex por 15 minutos. Com a finalidade de obter máxima extração de clorofila *a*, após a agitação, os tubos ficaram em repouso durante 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após o repouso, centrifugou-se os tubos por 20 minutos a 19.000 g para a obtenção do sobrenadante. A densidade celular de cada amostra foi determinada pela concentração de clorofila *a*, calculada através da absorbência em 665 nm, utilizando o espectrofotômetro Novaspec II (Pharmacia Biotech), e usando o metanol puro como branco, de acordo com o protocolo descrito por Aguiar (2002).

O cálculo da concentração de clorofila *a* foi determinado com base na fórmula descrita por Meeks & Castenholz (1971), com modificações de Fiori *et al.* (2000): $C = A \times a$, onde C = concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g/mL}$); A= valor de absorbância da amostra; e a= coeficiente de absorvidade para clorofila extraída com metanol, que corresponde a 12,7. Todas as análises foram realizadas em triplicatas biológicas.

A resistência de *Phormidium* sp. frente ao arsenato foi caracterizada pela inibição do crescimento desta cianobactéria exposta ao arsênio em comparação com um grupo controle não exposto. Para comparação dos resultados de resistência entre os grupos cultivados nas diferentes concentrações de arsênio, utilizou-se a análise estatística ANOVA (*Analysis of Variance*) do programa BioEstat v.5.0 (AYRES *et al.*, 2007).



Figura 5: Procedimento utilizado para extração da clorofila *a* de *Phormidium* sp. em metanol.

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Phormidium* sp.

Inicialmente uma curva de crescimento em condições normais de cultivo da cianobactéria foi obtida. Esta curva foi realizada durante 30 dias sendo os pontos de leitura da curva obtidos a cada três dias na semana num intervalo de 48 horas. A análise foi realizada com triplicatas biológicas. A metodologia empregada para leitura da densidade celular no meio de cultivo foi a mesma empregada no tópico 3.2 acima, baseada na concentração de clorofila *a*.

Posteriormente, três curvas de crescimento de *Phormidium* sp. foram realizadas: uma curva controle, analisando o crescimento em meio BG-11 sem arsenato, outra em meio de cultura contendo a maior concentração de arsenato de sódio na qual o

crescimento cianobacteriano não foi afetado, e uma terceira curva analisando o crescimento em meio de cultura contendo uma concentração tóxica de arsênio para a cianobactéria. Dessa forma, verificou-se o perfil de crescimento desta espécie durante o estresse induzido pelo arsênio.

3.4 DOSAGEM DO ARSÊNIO

As mudanças na concentração de arsênio do meio de cultura foram monitoradas durante a curva de crescimento de *Phormidium* sp. em meio contendo 30 mM de arsenato de sódio e em meio desprovido deste. Após a separação das células de cianobactérias, o meio BG-11, em que a cianobactéria foi cultivada, foi transferido para tubos de centrífuga e armazenados em -20°C até as análises da dosagem do As.

Para as análises foram selecionados cinco pontos da curva de crescimento, tais quais: ponto de inoculação da amostra, início e meio da fase exponencial e durante a fase de declínio. As amostras foram diluídas para uma concentração de 25 ppb em uma solução de ácido clorídrico 2%.

A determinação do arsênio total presente nas amostras foi obtida através da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP-OES) iCAP 600 (Thermo Scientific), do Instituto Evandro Chagas. As condições de operação do aparelho foram potência da RF (Rádio Frequência) 1100 Watts, fluxo do gás auxiliar 0,5 L/min, fluxo do gás nebulizador 0,5 L/min; rotação da bomba peristáltica 45 rpm; rotação da bomba da análise 45 rpm; tempo de estabilização 5 segundos; limite de detecção: 0,563 ppb e comprimento de onda para a leitura do arsênio 1937 nm. A curva de calibração ficou na faixa de 0 a 32 ppb e foi linear em toda a faixa de concentração.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO PARA *Phormidium* sp.

A resistência de *Phormidium* sp. ao arsenato de sódio, através dos testes da ANOVA, mostraram que o crescimento cianobacteriano não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, controle e tratado com arsênio, ($p>0,05$) em meio contendo até 50 mM de arsenato de sódio (Figura 6).

A tolerância de *Phormidium* sp. ao arsenato de sódio foi afetada a partir do crescimento em meio contendo 100 mM do metalóide ($p<0,05$), onde nesta condição de cultivo a concentração de clorofila *a* foi de 2,72 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que as células em meio sem o arsênio apresentaram uma concentração de 4,33 $\mu\text{g/mL}$, o que mostra uma redução de 37% no crescimento cianobacteriano (Figura 6). O cultivo de *Phormidium* sp. em meio de cultura contendo 130, 150, 200 e 250 mM de arsenato de sódio mostraram uma redução de 74,6%, 77,4%, 91% e 93% em seu crescimento, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 6).

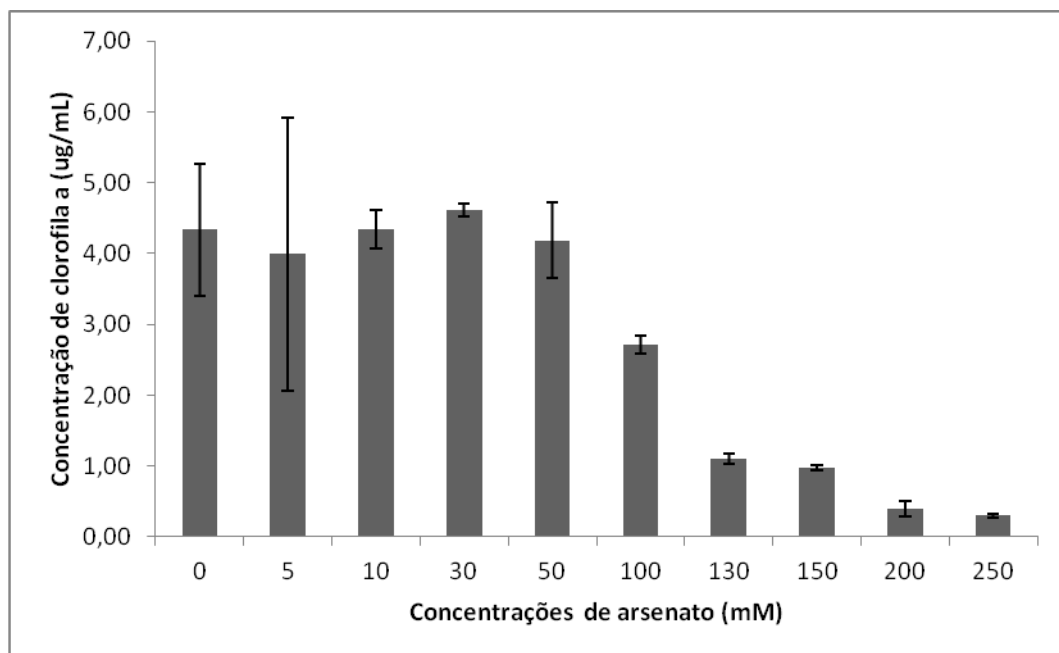


Figura 6: Resistência de *Phormidium* sp. em diferentes concentrações de arsenato de sódio após 20 dias de cultivo.

4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Phormidium* sp.

A curva de crescimento de *Phormidium* sp. mostrou uma fase lag com duração de cinco dias (Figura 7). A fase exponencial iniciou-se no quinto dia após o início do experimento e teve duração de sete dias. *Phormidium* sp. apresentou uma fase estacionária com duração de 9 dias. Durante esta fase, algumas oscilações no crescimento celular foram observadas. Após 28 dias de cultivo, a cianobactéria apresentou um grande declínio em seu crescimento, ocasionado pela morte celular.

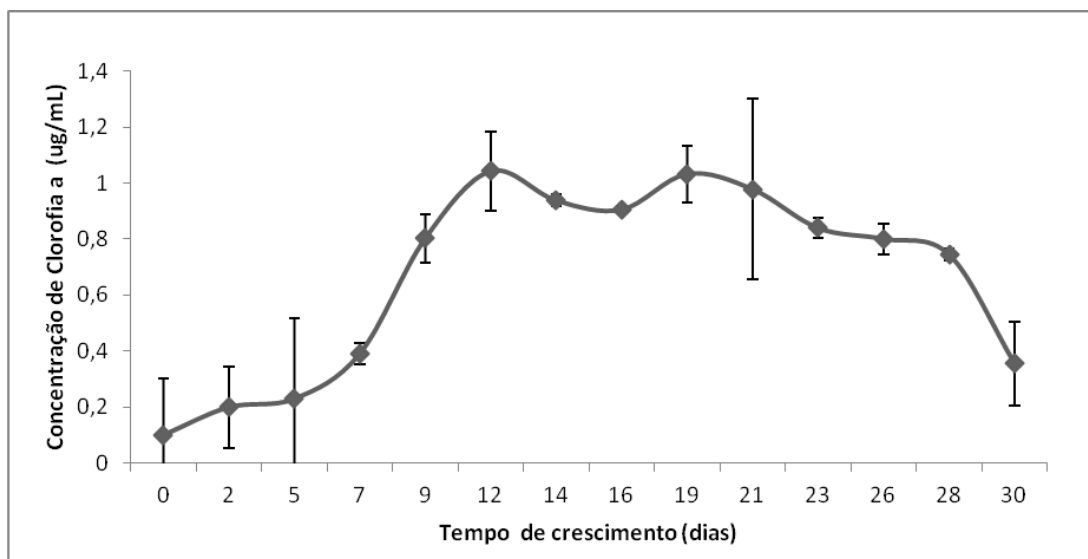


Figura 7: Curva de crescimento de *Phormidium* sp. em meio BG-11 líquido e sem arsenato de sódio.

4.3 PERFIL DE CRESCIMENTO DE *Phormidium* sp. EM MEIO CONTENDO ARSENATO DE SÓDIO

Com os resultados obtidos da caracterização da resistência de *Phormidium* sp. ao arsênio, comparou-se o perfil de crescimento desta cianobactéria durante o tratamento com 30 mM de arsenato de sódio (concentração em que a cianobactéria apresentou alta resistência), 100 mM de arsenato (tratamento que afeta o crescimento cianobacteriano) e na ausência do metalóide.

O crescimento cianobacteriano em meio contendo 30 mM de arsenato apresentou uma estagnação no início da fase exponencial (Figura 8). Durante as análises do 4º e 6º dia de cultivo, observa-se que não ocorreu crescimento de *Phormidium* sp. nesse período, diferentemente do que se observa durante o cultivo sem o arsênio. No meio da fase exponencial, o crescimento da cianobactéria, na presença do arsênio, é inferior em relação ao meio sem o arsenato. Entretanto, próximo ao ápice da curva, observa-se que o perfil de crescimento, em ambos os cultivos, foram semelhantes (Figura 8).

O perfil de crescimento de *Phormidium* sp. em 100 mM de arsenato de sódio foi caracterizado por um pequeno crescimento durante a fase lag, seguido de um declínio na biomassa cianobacteriana, sem definição de fase exponencial e fase estacionária, acarretando em morte celular após 18 dias de cultivo (Figura 8).

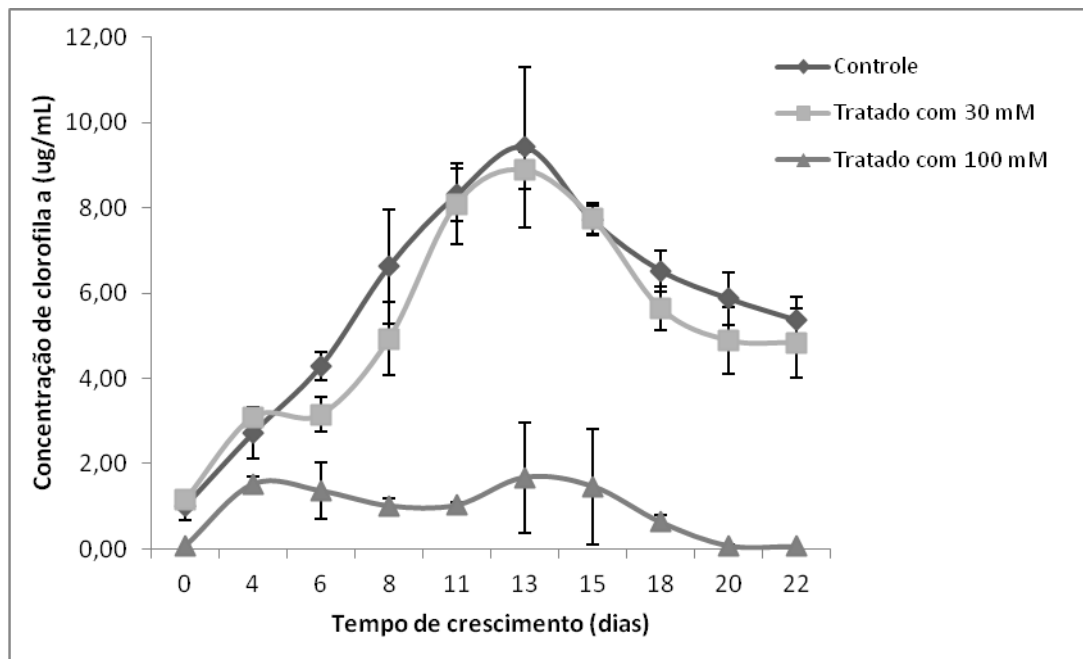


Figura 8: Comparação do perfil de crescimento de *Phormidium* sp. em meio de cultura na ausência do arsenato, e em meio com 30 mM e 100 mM de arsenato de sódio.

4.4 CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO DE CULTURA

A concentração de arsênio total presente no meio de cultura foi alta no primeiro dia de inoculação, apresentando uma concentração de 2988 ppm de arsênio (Figura 9). Após

quatro dias de cultivo de *Phormidium* sp. em meio contendo arsênio, observou-se uma redução brusca na concentração deste metalóide, com concentração de 999,8 ppm de arsênio, cerca de 66% de redução (Figura 9).

A concentração de arsênio foi aumentando a partir do meio da fase exponencial (11 dias de crescimento) até o início da fase de declínio, como mostrado na Figura 9. Após 22 dias de crescimento, a concentração de arsênio no meio de cultura apresentou uma pequena redução, com concentração de 1546,6 ppm de arsênio.

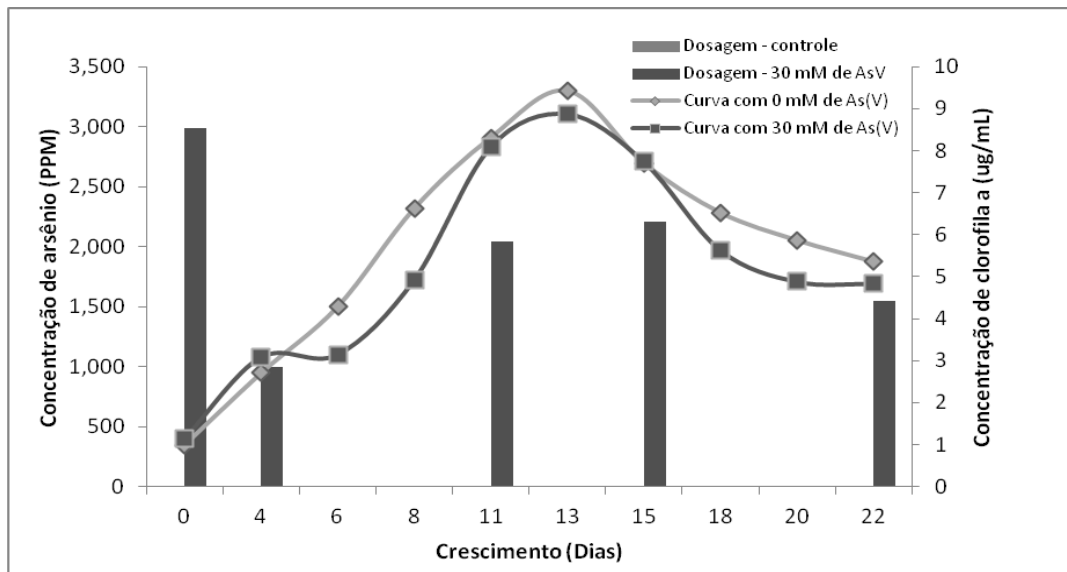


Figura 9: Variação da concentração de arsênio no meio de cultura durante o crescimento de *Phormidium* sp. em 30 mM de arsenato de sódio e em meio sem metalóide (gráfico de barras). A curva de crescimento indica os pontos selecionados para a dosagem do arsênio durante o cultivo cianobacteriano.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm observado que diversos organismos podem tolerar altas concentrações de arsênio (IMAMUL HUG *et al.*, 2005; MAEDA *et al.*, 2004; SHAMSUDDOHA *et al.*, 2006). No presente estudo, observou-se que quando exposta ao arsenato de sódio, *Phormidium* sp. resistiu na presença de 30 mM do metalóide. Esta tolerância foi observada por Shaheen *et al.* (2007) utilizando *Phormidium* sp., uma cianobactéria isolada em área contaminada por arsênio na Índia.

Outras análises de resistência ao arsênio, no gênero *Phormidium*, foram relatadas (BHATTACHARYA E PAL, 2011; MAEDA *et al.*, 1988). Bhattacharya e Pal (2011) observaram a tolerância de *P. laminosum* em concentração de 0,03 mM de arsenato de sódio. Maeda *et al.* (1988), por sua vez, relataram a resistência de *Phormidium* sp. em meio de cultura contendo até 0,3 mM de arsenato. Portanto, a cianobactéria utilizada no presente estudo apresentou um ótimo perfil de resistência ao metalóide quando comparado com estes resultados.

O arsênio parece exercer um pequeno efeito positivo no crescimento de organismos expostos à este metalóide. Em estudo realizado por Maeda *et al.* (1988) foi observado que a cianobactéria *Phormidium* sp. foi capaz de crescer melhor em meio com arsenato do que em meio sem este metalóide. Outro estudo que vem corroborar com esses resultados é o de Bhattacharya e Pal (2012), que após 63 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de arsenato de sódio, a cianobactéria *Phormidium tenue* obteve um crescimento maior em meio contendo 0,08 mM e 0,3 mM de arsenato do que em meio na ausência de arsênio, sendo o conteúdo máximo de clorofila *a* observado em 0,15 mM de arsenato. No presente estudo, a cianobactéria *Phormidium* sp. possui a mesma capacidade de crescimento nos meios contendo até 50 mM de arsenato quanto em meio sem este metalóide ($p > 0,05$). Esta diferença só foi significativa a partir da concentração de 100 mM de arsenato, onde a bactéria apresentou uma grande inibição em seu crescimento em relação ao grupo controle.

De acordo com Maeda *et al.* (1988), esta resistência ocorre porque as cianobactérias impedem a interação do arsênio inorgânico com o grupo SH das proteínas, sendo o processo de biometilação um dos meios de detoxificação do arsênio inorgânico no interior celular. Portanto, sem a ligação do composto tóxico ao grupo SH, mantêm-se a

atividade das proteínas, o que permite a sobrevivência destas espécies em meio contaminado por arsênio.

As diferentes fases de crescimento (lag, exponencial e estacionária) foram evidentes no presente estudo. A fase exponencial de crescimento se caracteriza por ser a de maior aproveitamento de nutrientes e de maior atividade metabólica. Portanto, os experimentos de resistência ao arsênio foram realizados com as células nesta fase de crescimento. A curva de crescimento de *Phormidium* sp. apresentou fases de crescimento diferente às curvas relatadas na literatura para este gênero (MAEDA *et al.*, 1988; NAGLE *et al.*, 2010). Maeda *et al.*, (1988) observou uma fase lag, de *Phormidium* sp., com duração de 4 dias, um dia a menos do que foi demonstrada pela *Phormidium* sp. no presente estudo. As fases exponencial (com duração de 16 dias) e estacionária (com duração de sete dias) foram 4 e 3 dias mais longas, respectivamente, em comparação com as fases de crescimento de *Phormidium* sp. apresentadas no presente estudo.

O crescimento de *Phormidium* sp. em meio contendo 30 mM de arsenato mostra que esta espécie apresenta uma fase de adaptação quando em contato com o metalóide, pois nos primeiros dias de cultivo observa-se uma estagnação no crescimento celular, em comparação com a curva de crescimento sem a presença de arsênio.

As análises da concentração de arsênio no meio de cultura da cianobactéria *Phormidium* sp. mostrou, nos primeiros dias de experimento, grande redução de arsênio no meio, seguido de um aumento gradativo de arsênio até o último ponto de coleta, o qual observou-se uma pequena redução na concentração deste metalóide. A técnica utilizada para quantificação do arsênio não permite a caracterização da espécie de arsênio presente no meio. Contudo, os resultados indicam que houve absorção e acumulação do arsênio no início da fase exponencial de crescimento, devido a diminuição da concentração de arsênio entre o primeiro e o quarto dia de crescimento. Posteriormente, ocorreu excreção de As para o meio extracelular. Este padrão de bioacumulação foi observado por Matsuto *et al.* (1984), que expôs a cianobactéria *Phormidium* sp. a 0,03 mM de arsenato durante 65 dias. Durante os 15 primeiros dias de crescimento, *Phormidium* apresentou uma rápida absorção de arsenato, e em seguida, houve um aumento significativo na concentração de arsenito no meio. Isto sugere que esta cianobactéria reduziu arsenato para arsenito, dentro de suas células, acompanhado de uma rápida excreção após a redução. Estudos utilizando *Synechococcus* sp. mostraram,

também, que esta cianobactéria cultivada em meio contendo arsenato, após determinado tempo, passou a produzir a forma trivalente do composto, o arsenito (TAKAHASHI *et al.*, 2001). Este processo de transformação da forma pentavalente para a forma trivalente do metalóide é observado em micro-organismos que possuem o operon de resistência ao arsênio *arsRBC*. Contudo, outras análises são necessárias para descrever de forma mais objetiva que tipo de via metabólica é utilizada pela *Phormidium* sp. para resistir à altas concentrações de arsênio.

6 CONCLUSÃO

A cianobactéria *Phormidium* sp. apresentou resistência para sobreviver em meio contendo altas concentrações de arsênio. A curva de crescimento de *Phormidium* sp. apresentada foi satisfatória, onde foi possível detectar as fases de crescimento exponencial, estacionária e de declínio celular, e assim, realizar os experimentos de resistência e bioacumulação do arsênio na fase de crescimento cianobacteriano adequada.

A metodologia utilizada para padronização de inóculos de cianobactérias filamentosas não foi adequada, mostrando grande variação nos resultados obtidos. Dessa forma, é de fundamental importância que novas análises sejam utilizadas para a obtenção de um método satisfatório.

A cianobactéria *Phormidium* sp. apresentou uma adaptação quando exposta em meio de cultura contendo arsenato de sódio, seguido de um ótimo crescimento após esta adaptação. As análises de bioacumulação do arsênio mostraram que esta espécie possivelmente acumula altas concentrações de arsenato do meio de cultura, devido a redução deste composto no início do experimento, seguido do aumento gradativo do arsênio após a redução. Entretanto, outras análises envolvendo a especificação do arsênio, a descrição das vias metabólicas alteradas durante o processo de resistência ao metalóide devem ser realizadas para o melhor entendimento da resposta de *Phormidium* sp. ao metalóide tóxico.

7 REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**. 106: 1-12, 2008.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Department of Health and Human Services, Public Health Service Public Health Statement: Arsenic. Atlanta, 2007, GA: U.S.; 2000. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/>
- 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. 122p. Dissertação de Mestrado, USP.
- AKHTAR N; IQBAL M; ZAFAR SI; IQBAL J. Use of microalgal biomass for the removal of heavy metals from aqueous system. **Pakistan Journal Botany**. 33: 773-777, 2001.
- ALLEN MB. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal Phycology**. 4:1-4, 1968.
- AYRES M; AYRES JUNIOR M; AYRES DL; SANTOS AA. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas da ciência bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém-Pa, 2007.
- AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. Morfologia e reprodução de cianobactérias. In: SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; *et al.* **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. 1th ed. Brasil: Interciência. Cap. 02, p. 5-8, 2006.
- BARRA C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. Especificação de Arsênio-Uma Revisão. **Química Nova**. 23(1): 58-70, 2000.
- BERRY J; GANTAR M; PEREZ M; BERRY G; NORIEGA F. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. **Marine Drugs**. 6: 117:146, 2008.
- BHATTACHARJEE H, ROSEN BP, MUKHOPADHYAY R. Aquaglyceroporins and metalloid transport: implications in human diseases. **Handbook of Experimental Pharmacology**. 2009;(190):309-25.
- BHATTACHARYA P; PAL R. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. **Journal of Applied Phycology**. 23(2) 293-299, 2011.
- BHATTACHARYA P; PAL R. Scope of phycoremediation of arsenic using *Phormidium tenue* with special reference to modulation in cellular biochemistry. **Journal Algal Biomass utilization**. 3(2): 1-8, 2012.

BICUDO MM. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições.** 2º edição. Ed Rima. Cap. 5, pag. 47. 2006

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOURA, A.N. Influence of abiotic variables and polluting source in the structure of the phytoplankton community in Tibagi river, Paraná state, south Brazil. **Algology Study** 101:73-93, 2001.

BLOOR S; ENGLAND RR. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Journal Applied Phycology.** 1: 367-372, 1989.

BORBA RP, FIGUEIREDO BR, CAVALCANTI JA. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). REM: **Revista Escola de Minas.** 57(1):45-51, 2004.

BRANDÃO LH; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. **Saúde e Ambiente em Revista.** 1(2): 40-50, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004. Norma de qualidade da água para consumo humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BUDD K; CASEY JR; MACARTHUR JD. Arsenite toxicity and arsenite tolerance in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. **Canadian Journal of Botany.** 64(11): 2433-2440, 1986.

BUTCHER, BG; RAWLINGS, DE. The divergent chromosomal ars operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. **Microbiology.** 148: 3983-3992. 2002.

CARLIN, A; SHI, W; DEY, S; ROSEN, BP. The ars Operon of *Escherichia coli* confers arsenic and antimonial resistance. **Journal of Bacteriology.** 177(4): 981-986, 1995.

CARMICHAEL WW. Toxins of cyanobacteria. **Scientific American.** 270: 64-72, 1994.

CARMICHAEL WW. The cyanotoxins. **Advances in Botanical Research.** 27: 211-256, 1997.

CERVANTES, C., RAMIREZ, J.L., SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews.** 15: 355-367, 1994

CHEN, C. J.; CHEN, C. W.; WU, M. M.; KUO, T. L. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic drinking water. **British Journal of Cancer.** 66: 888-892, 1992.

CIPRANDI A; BARAÚNA RA; SANTOS AV; GONÇALVES EV; CAREPO MSP; SCHNEIDER MPC; SILVA A. Proteomic response to arsenic stress in *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Integrated Omics.** 2(1): 69-73, 2012.

- COHEN, Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats. **International microbial**. 5: 189-193, 2002.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº396. Brasília, 03 de abril de 2008.
- DAI R; LIU H; QU J; ZHAO X; RU J; HOU Y. Relationships of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen limited or phosphorous-limited cultures. **Toxicon**. 51: 649-658, 2008.
- DEMBITSKY, V. M. & REKANZA, T. Natural Occurrence of Arseno Compounds in Plants, Lichens, Fungi, Algal Species, and Microorganismos. **Plant Science**. 165: 1177-1192, 2003.
- ERB TJ; KIEFER P; HATTENDORF B; GUNTHER D; VORHOLT J. GFAJ-1 Is an arsenate resistant , phosphate dependent organism. Published online July 2012, acessado em: <http://www.sciencemag.org/content/early/2012/07/06/science.1218455>
- EUROPEAN COMISSION DIRECTIVE. 98/83/EC, related with drinking water quality intended for human consumption. **European Comission Directive Brussels Belgium**. 1998.
- IORE, MF; MOON DH; TSAI, SM; LEE H; TREVORS JT. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal Microbiology Methods**. 39: 159-69, 2000.
- FERNANDES VO; CAVATI B; OLIVEIRA LB; SOUZA B. Ecologia de cianobactérias: Fatores Promotores e Consequências das Florações. **Oecologia Brasiliensis**. 13(2): 247-258, 2009.
- GADD GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**. 156(Pt 3):609-43, 2010.
- GOMES, C.Q.; FRANCO, M.W.; SOUZA, E.A.; AGUIAR, R. Absorção e toxicidade do arsênio em *Geitlerinema* UFV-E01 (Cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-02 (Chlorophyta). **Revista Brasileira de Biociências**. 5 (2): 1125-1127, 2007.
- GONG, Y. *et al.* Effects of arsenate on microcystin content and leakage of *Microcystis* strain PCC7806 under various phosphate regimes. **Environmental Toxicology**, 24, 87–94. 2009.
- HOFFMANN L; KOMÁREK J; KASTOVSKY J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) – state in 2004. 117 (1): 95-115, 2005.
- HOICZYK E; BAUMEISTER W. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. **Journal Bacteriology**. 177: 2387-2395, 1995.

HUANG XD; EL-ALAWI Y; PENROSE DM; GLICK BR; GREENBERG BM. A multi process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**. 130: 465-476, 2004.

IMAMUL HUQ SM; ALAM MD. A handbook on analyses of soil, plants and water. **Bacer-Du**. University of Dhaka, Bangladesh, 2005.

IMLAY JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review Biochemistry**. 77: 755-776, 2008.

JANKONG P, VISOOTTVISETH P, KHOKIATTIWONG S. Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. **Chemosphere**. 68(10): 1906-1912, 2007.

KHAN NI, OWENS G, BRUCE D, NAIDU R. Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: a review. **Environmental Geochemistry Health**. Apr;31 Suppl 1:143-66, 2009.

Kützing ex Gomont, *Phormidium*, Phycologia Generalis. **Annals Science Natural Botanic**. 7: 16 – 156, 1892.

LÉONARD, A.; LAUWERYS, R. R. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. **Mutation Research**. 75: 49-62, 1980.

LIÈVREMONT D, BERTIN PN, LETT MC. Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. **Biochimie**. Oct;91(10):1229-37, 2009.

LIN, Y; WALMSLEY, AR; ROSEN, BP. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. **PNAS**, vol. 103, n. 42, pp. 15617-15622, 2006

LLOYD, J.R.; OREMLAND, R.S. Microbial Transformation of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers. **Elements**. 2: 85-90. 2006.

LÓPEZ-MAURY, L.; FLORENCIO, J.F.; REYES. J.C. Arsenic Sensing and Resistance System in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**. 185: 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.

MAEDA S; FUJITA S; OHKI H; YOSHIFUKU I; HIGASHI S; TAKESHITA T. Arsenic accumulation by arsenic tolerant freshwater blue-green alga (*Phormidium* sp.). **Applied Organometallic Chemistry**. 2: 353-357, 1988.

MAEDA, S.; WADA, H.; KUMEDA, K. Methylation of inorganic arsenic by arsenic-tolerant freshwater algae. **Applied Organometallic Chemistry**. 1: 465-472, 2004.

MAESTRIN APJ; NERI CR; OLIVEIRA KT; SERRA AO; YAMAMOTO Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**. 32(6):1670-1672, 2009.

MATEOS, LM; ORDÓÑES, E; LETEK, M; GIL, JÁ. *Corinebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. **International Microbiology**. 9: 207-215, 2006.

MATSCHULLAT, J. BORBA, R.P.; DESCHAMPS, E.; FIGUEIREDO, B.R.; GABRIO, T.; SCHWENK, M. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry**. 15: 193-202, 2000.

MATSUTO, S.; KASUGA, H.; OKUMOTO, H.; TAKAHASHI, A. Accumulation of arsenic in blue-green alga, *Phormidium* sp. **Comparative Biochemistry Physiology**. 78(2): 377-382, 1984.

MEHARG AA. Arsenic in rice understanding a new disaster for South East Asia. **Trends Plant Science**. 9: 415-417, 2004.

MEEKS JC; CASTENHOLZ, RW. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). **Archives Microbiology**. 78: 25-41, 1971.

MENG YL; LIU Z; ROSEN BP. As (III) and Sb (III) uptake by GlpF and Efflux by ArsB in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**. 279: 18334-18341, 2004.

MUKHOPADHYAY, R; ROSEN, BP; PHUNG, LT; SILVER, S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **FEMS Microbiology Reviews**. 26: 311-325, 2002.

NAGLE VL; MHALSEKAR NM; JAGTAP TG. Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members. **Indian Journal of Marine Science**. 39(2): 212-218, 2010.

ORDÓÑEZ E; LETEK M; VALBUENA N; GIL JA; MATEOS LM. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. **Applied Environmental Microbiology**. 71(10): 6206-6215, 2005.

OREMLAND, S.R.; STOLZ, J. S. The Ecology of Arsenic. **Science**. 300: 939- 943, 2003.

PATEI, CP *et al.* Arsenate detoxification in a *Pseudomonad* hypertolerant to arsenic. **Archives Microbiology**. (2007) 187:171-183.

PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R. Cianobactérias: Importância econômica. **Semina**. 12(4):275-280, 1991

PLATANIAS LC. Biological responses to arsenic compounds. **Journal Biological Chemistry**. 10: (28):18583-7, 2009.

QIN J; ROSEN BP; ZHANG Y; WANG GJ; FRANKE S; RESING C. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 103: 2075 -2080, 2006.

AJEEV KJ, XU Z. Biomedical compounds from marine organisms. **Marine Drugs**. 2: 123–146, 2004.

REAVES M; SINHA S; RABINOWITZ J; KRUGLYAK; REDFIELD R. Absence of detectable arsenate in DNA from arsenate grown GFAJ-1 cells. Publish online July 2012, acessado em: <http://www.sciencemag.org/content/early/2012/07/06/science.1219861>

RESHEF V; MIZRACHI EREZ; MARETZKY T; *et al.* New acylated sulphoglycolipids and digalactolipids and related know glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal Natural Products**. 60: 1251- 1260, 1997.

ROHRLACK T; DITTMANN E; HENNING M; BORNER T; KOHL JG. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**. 65: 737-739, 1999.

ROSEN BP. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**. 2;529(1):86-92, 2002.

ROY P; SAHA, A. Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen. **Current Science**. 82: 38-45, 2002

SANTOS ECO, JESUS IM, BRABO ES, FAYAL KF, SÁ FILHO GC, LIMA MO, MIRANDA AMM, MASCARENHAS AS, CANTO DE SÁ LL, SILVA AP, CÂMARA VM. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira Epidemiologia**. 6(2): 171-85, 2003.

SAY PJ; WHITTON BA; Change in flora down a stream showing a zine gradient. **Hydrobiologia**. 76: 255-266, 1980.

SHAHEEN, F.; MAHMUD, R.; SEN, J. A study on arsenic decontaminating cyanobacteriaof an arsenic affected soil. **Journal Soil Nature**. 1(2): 23-29, 2007.

SHAMSUDDOHA ASM; BULBUL A; IMAMUL HUQ SM. Accumulation of arsenic in green algae and its subsequent transfer to the soil plant system. **Bangladesh Journal Microbiology**. 22(2): 148-151, 2006.

SHEVCHENKO, A. WILM, M. VORM, O. MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**. 68: 850-858, 1996.

SILVER S; WALDERHAUG M. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiological Reviews**. 195-228, 1992.

SILVER S; BUDD K; LEAHY KM; SHAW WV; HAMMOND D; NOVICK RP; WILLSKY GR; MALAMY MH; ROSENBERG H. Inducible plasmid determined resistance to arsenate, arsenite and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. 146: 983-996, 1981

SILVER S; PHUNG T. Novel expansion of living chemistry or just a serious mistake? **Currente Controversies in Microbiology**. 315: 79-80, 2011.

SIMON FL; BLUM JS; KULP TR. *et al.* A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. **Science express**. Acessado em : www.scienceexpress.org em 17 de agosto de 2011.

SMEDLEY P.L. & KINNIBURGH D.G. A review of the source,behavior and distribution of arsenic in natural waters Source and behavior of arsenic in natural waters. **Applied Geochemistry**. 17:517-568, 2002.

SMITH AH, LINGAS EO, RAHMAN M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. **Bulletin of the World Health Organization**. 78 (9): 1093-1103, 2000.

SPERLING, E. V. Considerações sobre o Problema do Arsênito em Águas de Abastecimento. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vitória-ES. 2002.

SUBRAMANIAM V; MADHAVAN N; NAQVI SAS. Arsenic in our enviroment: a critical review. **Capital Publishing Company**. 189, 2002.

TAKAHASHI A; HAWAKAMI H; BADA A; OKONOGI Y; MATSUTO S. Effects of phosphate on arsenate inhibition in a marine cyanobacterium, *Phormidium* sp. **Applied Organometallic Chemistry**. 4:269-279, 1990.

TAKAHASHI A, KAWAKAMI H, IWAKIRI K, MATSUTO S. Some characteristics of arsenate transport in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Applied Organometallic Chemistry**. 15:291–298, 2001.

TENEVA, I.; DZHAMBAZOV, B.; KOLEVA, L.; MLADENOV, R.; SCHIRMER, K. Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota). **Elsevier**. 45: 711-725, 2005.

THIEL, T. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology**. 170(3): 1143-1147, 1988.

TONDELL M; RAHMAN M; MAGNUSON A; CHOWDHURY IA; FARUQUEE MH; AHMAD SA. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. **Environmental Health Perspect**. 107: 727-729, 1999.

TSAI SL, SINGH S, CHEN W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. **Current Opinion Biotechnology**. Dec;20(6):659-67, 2009.

VENTURA –LIMA J; BOGO M; MONSERRAT JM. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**. 74(3): 211-218, 2010.

WANG, T.C.; WEISSMAN, J.C.; RAMESH, G.; VARADARAJAN, R.; BENEMANN, J.R. Heavy Metal Binding and Removal by *Phormidium*. **Environmental Contamination and Toxicology**. 60: 739-744, 1998.

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

WHITTON BA, Zinc and plants in rivers and streams. In: Nriagu JO, ed. Zinc in Environment. Part II. 364:400, 1980.

WHO, Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. 1999.

WHO. Arsenic in drinking water. Fact Sheet N. 210, 2001. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html>

YANG Q; TU S; WANG G; LIAO X; YAN X. Effectiveness of Applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris Vittata* L. **International Journal of Phytoremediation**. 14: 89-99, 2012.

ZHANG Y, MA YF, QI SW, MENG B, CHAUDHRY MT, LIU SQ, LIU SJ. Responses to arsenate stress by *Comamonas* sp. strain CNB-1 at genetic and proteomic levels. **Microbiology**. 153(11):3713-21, 2007.