

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Interação entre a matéria orgânica natural, o cobre e microorganismos heterotróficos: implicações na dinâmica do metal e sua disponibilização para a biota aquática

PATRÍCIA FRANKLIN MAYRINK NOGUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, com ênfase em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos-SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

N778ie

Nogueira, Patrícia Franklin Mayrink.
Interação entre a matéria orgânica natural, o cobre e
microorganismos heterotróficos : implicações na dinâmica
do metal e sua disponibilização para a biota aquática /
Patrícia Franklin Mayrink Nogueira. -- São Carlos : UFSCar,
2007.
163 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2007.

1. Limnologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Cadeia trófica. 4.
Cobre. 5. MOD (Matéria Orgânica Dissolvida). I. Título.

CDD: 574.52632 (20^a)

Patrícia Franklin Mayrink Nogueira

**INTERAÇÃO ENTRE A MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL, O
COBRE E MICROORGANISMOS HETEROTRÓFICOS:
IMPLICAÇÕES NA DINÂMICA DO METAL E SUA
DISPONIBILIZAÇÃO PARA A BIOTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2007

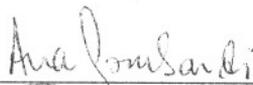
BANCA EXAMINADORA

Presidente



Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
(Orientadora)

1º Examinador



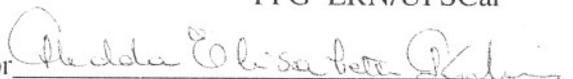
Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
PPG ERN/UFSCar

2º Examinador



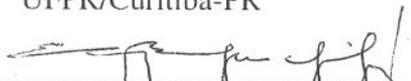
Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
PPG ERN/UFSCar

3º Examinador



Profa. Dra. Hedda Elisabeth Kolm
UFPR/Curitiba-PR

4º Examinador



Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espindola
USP/São Carlos-SP

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento desse trabalho, o apoio dos amigos, profissionais e familiares foi fundamental. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela orientação e pela oportunidade de realização deste projeto.

À Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi, pela amizade, companheirismo, paciência nas correções e acima de tudo por ter contribuído para minha formação profissional através de seus conhecimentos e ensinamentos, os quais com certeza foram valiosos e imprescindíveis para o meu crescimento.

Às amigas de laboratório Irene, Twiggy, Alessandra e Inessa que deixaram meus dias de trabalho mais alegres.

Ao Prof. Dr. Armando A. H. Vieira, pela permissão de utilização da infra-estrutura do Laboratório de Fisiologia de Algas e pelas sugestões fornecidas no exame de qualificação.

Ao técnico Luís Sartori, pela amizade e auxílio na realização dos cultivos da alga, extração dos polissacarídeos, e análises de TOC.

Ao Prof. Dr. Evaldo Gaeta Espíndola, pelo uso do espectrofotômetro de absorção atômica.

À Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleguin pela permissão da coloração de filtros no Laboratório de Microbiologia e pelas sugestões fornecidas no exame de qualificação.

Ao Prof. José Eduardo dos Santos pelas sugestões fornecidas no exame de qualificação.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao meu marido Marcelo, pela ajuda nas análises de cobre total, pelo apoio incondicional e por me fazer sentir cada vez mais realizada ao seu lado.

Aos meus filhos que tanto amo, Lorena e Diego, que me fazem sentir emoções fortes com gestos tão pequenos.

A presença e o apoio constante de meus pais, Roseny e Flávio, e meus irmãos, Rodrigo e Luiza.

RESUMO

O aumento da eutrofização e da contaminação de ambientes aquáticos levam ao interesse em estudos sobre a interação entre a matéria orgânica dissolvida, metais traços e a biota. Os metais são lançados nos ambientes aquáticos principalmente através dos processos industriais, enquanto que a eutrofização deve-se principalmente à entrada de esgotos domésticos. A união desses dois processos em um só ambiente causa riscos ainda pouco conhecidos à biota. Neste estudo, avaliou-se a capacidade de complexação da água do Reservatório do Monjolinho (eutrofizado), de onde os organismos teste foram obtidos para o desenvolvimento desta pesquisa. Os resultados mostraram que, com pelo menos dois sítios distintos para associação com o cobre, a concentração de cobre livre no reservatório é baixa. Sabe-se que a MOD natural é constituída por substâncias de natureza húmica e compostos recém produzidos pela biota. Neste estudo, foi usada matéria orgânica natural do Suwanee River (padrão comercial) como modelo de substância húmica e, como substância recém produzida, exopolissacarídeos de cianobactérias (obtidos em laboratório). Foi investigada a influência da interação entre MOD-Cu-organismos sobre a dinâmica de cobre e sua biodisponibilização. Os resultados mostraram a degradação de material húmico pelas bactérias heterotróficas e, ainda, que esses organismos são resistentes ao cobre, tolerando uma concentração de cobre total de 10^{-6} mol.L⁻¹. Através da atividade das bactérias sobre o complexo MOD-Cu, o cobre foi disponibilizado e magnificado na cadeia trófica. No entanto, não foi detectada liberação do cobre mediante a degradação do complexo exopolissacarídeo-cobre. De modo geral, os resultados mostraram que cobre complexado à MOD ou ao exopolissacarídeo foi menos tóxico aos organismos do que o íon livre. Os resultados aqui apresentados vêm contribuir para o conhecimento sobre a especiação, disponibilidade e interação do cobre com organismos aquáticos considerando a presença da MOD natural, importantes para o gerenciamento de ecossistemas aquáticos.

ABSTRACT

The increasing eutrophication and contamination of aquatic ecosystems motivates the study of interactions between natural dissolved organic matter (DOM), metals and the biota. Metals are mainly released into the environment by industrial processes, whereas organic materials through municipal sewage sludge. The association of these two processes and its effect on the environment poses unknown risks to aquatic communities. The support capacity of aquatic systems is related to its ability to associate with dissolved elements. In this study, the complexation capacity of Monjolinho Reservoir (eutrophic), from which the test organisms were obtained, was evaluated. The results showed that two copper-complexing sites were present, what contributes to the low free copper ion concentration in such environment. It is known that natural DOM is formed by humic like and recently produced organic compounds. Suwannee River natural organic matter was used throughout this investigation as models of humic substance – DOM (commercial standard), whereas as model substance of recently produced organic material, cyanobacteria (*Anabaena spiroides*) exopolysaccharides were used. Considering that the environmental fate and chemical speciation of copper are dominated by natural DOM and that heterotrophic bacteria processes are responsible for nutrient regeneration, carbon transfer and energy, it was also investigated the influence of the interaction DOM-Cu-organisms on copper dynamic and bioavailability. The results showed that the natural bacteria population was copper resistant, tolerating up to 10^{-6} M total copper concentration. The degradation of DOM by heterotrophic bacteria, detected by fluorescence spectroscopy, revealed that after Cu-complexed DOM degradation, the metal was liberated into the environment, causing toxicity and bioaccumulation in the microbial food chain. Nevertheless, this was less pronounced when the organic materials were exopolysaccharides. In general, the results showed that copper complexed to natural DOM or exopolysaccharides was less toxic to the organisms than free copper ions. The present results are a contribution to aquatic ecosystems management and to the knowledge of copper speciation, availability and interaction with aquatic organisms, as it relates to dissolved organic materials in aquatic ecosystems.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1. ÁGUA E POLUIÇÃO.....	01
1.2. ESPECIAÇÃO DO METAL E A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD).....	05
1.3. BIODISPONIBILIDADE E TOXICIDADE.....	09
2. OBJETIVO GERAL	15
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 01- ESPECIAÇÃO QUÍMICA DO COBRE NO RESERVATÓRIO DO MONJOLINHO (SÃO CARLOS, S.P.)	23
RESUMO.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVO.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1. O RESERVATÓRIO DO MONJOLINHO.....	26
2. ESPECIAÇÃO DE COBRE NO RESERVATÓRIO DO MONJOLINHO.....	27
3. COMPLEXAÇÃO DO COBRE NO RESERVATÓRIO DO MONJOLINHO.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO 02- EFEITO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA SOBRE A FLUORESCÊNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL	45
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	47

OBJETIVO.....	49
MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
1. A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL.....	49
2. CRESCIMENTO POPULACIONAL BACTERIANO.....	50
3. UTILIZAÇÃO DA MOD PELA POPULAÇÃO BACTERIANA.....	51
RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPÍTULO 03- INFLUÊNCIA DE MICROHETERÓTROFOS NA DINÂMICA DO COBRE COMPLEXADO À MOD.....	71
RESUMO.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
OBJETIVO.....	77
MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
1. RESISTÊNCIA BACTERIANA AO COBRE.....	78
2. INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO BACTERIANA SOBRE A DINÂMICA DE COBRE.....	79
RESULTADOS.....	81
DISCUSSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
CAPÍTULO 04- INFLUÊNCIA DA DEGRADAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL NA BIODISPONIBILIZAÇÃO DO COBRE EM UMA CADEIA ALIMENTAR AQUÁTICA.....	99
RESUMO.....	100
INTRODUÇÃO.....	101
OBJETIVO.....	102

MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
1. O METAL COBRE.....	103
2. A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL.....	103
3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO DA MOD COM O COBRE.....	104
4. OS ORGANISMOS.....	104
4.1. BACTERIOPLÂNCTON.....	104
4.2. CILIADO.....	105
4.3. COPEPODA.....	105
5. DESENHO EXPERIMENTAL.....	106
6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE.....	107
6.1. COBRE LIVRE.....	107
6.2. COBRE TOTAL.....	108
7. EXPERIMENTOS DE DINÂMICA DO COBRE ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS ORGANISMOS E O COMPLEXO MOD-CU.....	108
7.1. INTERAÇÃO ENTRE MOD-CU E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS.....	109
7.2. INTERAÇÃO ENTRE MOD-CU - BACTÉRIAS E CILIADOS.....	109
7.3. INTERAÇÃO ENTRE MOD-CU - BACTÉRIAS – CILIADOS E COPEPODAS.....	110
RESULTADOS.....	110
DISCUSSÃO.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
CAPÍTULO 05- INFLUÊNCIA DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>ANABAENA SPIROIDES</i> NA BIODISPONIBILIDADE DO COBRE EM UMA CADEIA ALIMENTAR AQUÁTICA.....	131
RESUMO.....	132
INTRODUÇÃO.....	133

OBJETIVO.....	135
MATERIAIS E MÉTODOS.....	135
1. O METAL COBRE.....	135
2. OS ORGANISMOS.....	136
2.1. CULTIVO DE <i>ANABAENA SPIROIDES</i> E EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	136
2.2. BACTERIOPLÂNCTON.....	137
2.3. CILIADO.....	138
2.4. COPEPODA.....	138
3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	139
4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE.....	140
4.1. COBRE LIVRE.....	140
4.2. COBRE TOTAL.....	141
5. EXPERIMENTOS DE DINÂMICA DO COBRE ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS ORGANISMOS E O COMPLEXO POLISSACARÍDEO-CU.....	141
5.1. INTERAÇÃO ENTRE POLISSACARÍDEO-CU E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS.....	142
5.2. INTERAÇÃO ENTRE POLISSACARÍDEO-CU - BACTÉRIAS E CILIADOS.....	142
5.3. INTERAÇÃO ENTRE POLISSACARÍDEO-CU - BACTÉRIAS - CILIADOS E COPEPODES.....	143
RESULTADOS.....	143
DISCUSSÃO.....	150
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
4. CONCLUSÃO GERAL.....	163

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. ÁGUA E POLUIÇÃO

A água, constituinte da hidrosfera e da atmosfera, infiltra-se através dos solos, regula as condições climáticas do planeta e representa uma parte essencial de todos os organismos vivos, inclusive o homem. A distribuição da água no planeta é heterogênea, sendo 97,5% água salgada e 2,5% água doce. Dos 2,5% de água doce, cerca de 69,8% constituem as calotas polares e geleiras, 29,9% são águas subterrâneas, 0,3% são rios e lagos e 0,9% são referentes a outros reservatórios (Wetzel, 2001). Assim, a disponibilidade da água sofre variações no tempo e no espaço, sendo que muitas vezes não se encontra disponível onde é necessária (IETEC, 2001). Como pode ser demonstrado na figura 01, sua distribuição e utilização no Brasil não é homogênea (ANA, 2003).

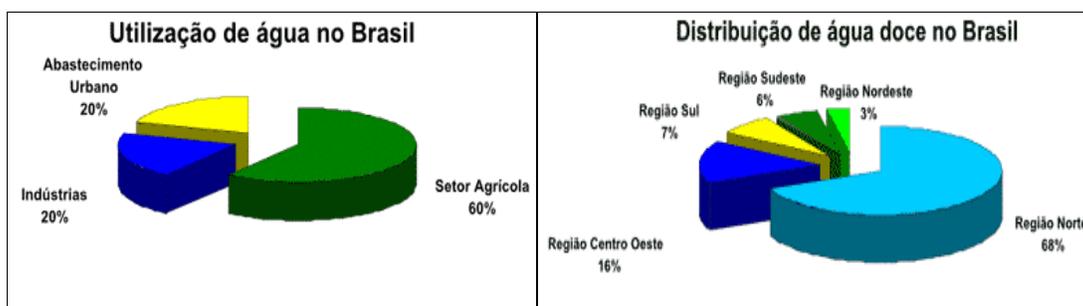


Figura 01- Distribuição e utilização de água doce no Brasil. Adaptado de ANA (2003).

O ciclo hidrológico (figura 02) representa a circulação da água nos diversos ecossistemas e envolve os estados gasoso, líquido e sólido. Segundo o Programa

Hidrologia Internacional (UNESCO, 2003), o ciclo hidrológico é responsável pela circulação de um volume de água de aproximadamente 577.200 km³/ano. Para a população mundial, lagos, reservatórios e rios são as fontes mais valiosas de água potável, sendo que a água doce é fonte de água para uso doméstico, agricultura e indústria. No entanto, os usos múltiplos da água tornam os ecossistemas de água doce vulneráveis à poluição e degradação (Tundisi, 2003).



Figura 02- Ciclo hidrológico. Adaptado de UNESCO, 2003.

A entrada de contaminantes nos ecossistemas aquáticos, tais como os esgotos domésticos, ainda que resultantes de tratamento secundário, leva ao desenvolvimento acelerado do processo de eutrofização. Este, por sua vez, leva à degradação da qualidade hídrica. Dentre os sintomas da eutrofização, encontram-se o aumento exagerado de algas e suas toxinas, infestações maciças de alguns vegetais aquáticos, aumento da incidência de doenças hidricamente transmissíveis, águas turvas, odores fétidos e alteração da palatabilidade da água, depleção dos níveis de oxigênio dissolvido e mortalidade da biota (Tundisi, 2003).

De acordo com dados produzidos pelo IETEC (2001) e UNESCO (2003), cerca de 1/3 da população mundial vive em países onde a falta de água oscila de moderada a

altamente impactante. Mais de 1 bilhão de pessoas têm problemas de acesso à água potável; 2,4 bilhões não tem acesso ao saneamento básico, resultando em casos de doenças de veiculação hídrica, com ocorrência de aproximadamente 5 milhões de mortes a cada ano. Estima-se que entre 10.000 e 20.000 crianças morrem por dia vítimas de doenças de veiculação hídrica. Em algumas regiões da Índia, o lençol freático afunda de 2 a 3 metros anualmente e 80% dos rios são muito tóxicos para suportar peixes e outros organismos aquáticos. Mais de 20% de todas as espécies de organismos de água doce estão ameaçadas ou em perigo em razão da construção de barragens, diminuição do volume de água e danos causados por poluição e contaminação. Aproximadamente 120.000 Km³ de água estão contaminados e para 2050 espera-se uma contaminação de 180.000 Km³ caso persista a taxa de contaminação atual.

Os sistemas de abastecimento público, que levam água para as cidades a partir de grandes reservatórios centrais, são susceptíveis à propagação de doenças. Tem-se, por exemplo, o tifo e a cólera, doenças causadas por bactérias que podem ser disseminadas através da água. Ainda, diversas formas de desintéria amébia são transmitidas por águas contaminadas, bem como enterobactérias e rotavírus. Muitas doenças podem ser transmitidas através de invertebrados aquáticos, como a esquistosomose, a infecção do verme-da-Guiné e a malária cuja transmissão dá-se através de insetos cujos estágios larvais ocorrem em ambientes aquáticos eutróficos (IETEC, 2001).

Além da eutrofização, a contaminação da água por metais também é um problema global. De acordo com Nriagu (1990), à partir do século XIX, com a expansão do desenvolvimento tecnológico, sócio-econômico e industrial teve início a descarga de quantidades significativas de metais tóxicos no ambiente. Esta poluição ambiental está

associada à atividade extrativista mineral, à indústria em geral e à agricultura através do uso de defensivos agrícolas (Nriagu, 1990). Seus principais indicadores são os aumentos das concentrações de metais traço, organoclorados, organofosforados e pesticidas no solo, na água, no sedimento e respectivas comunidades. Diferentemente de alguns poluentes orgânicos, como por exemplo, o herbicida 2,4-D, que pode ser degradado às custas de organismos heterotróficos (Van Demark e Batzing, 1987), os metais não são degradados quimicamente, nem biologicamente (Alloway, 1993), tendendo assim a sofrer um acúmulo no ambiente.

Muitos dos metais traços introduzidos no ambiente como resultado de atividades humanas são nutrientes, no entanto, quando presentes em concentrações pouco mais elevadas do que a natural, passam a exercer efeito tóxico em organismos autotróficos e heterotróficos. Como parte da cadeia alimentar, o homem também é atingido e sofre suas conseqüências, apresentando diversas doenças (Lacerda e Salomons, 1998; Chapman et al., 1977; Laws, 2000). O modo principal de ação pelo qual os metais tóxicos exercem efeitos adversos no ser humano consiste em reações com átomos doadores de enxofre das proteínas, resultando muito comumente em desativação enzimática. Além disso, competindo com elementos essenciais tais como cálcio e magnésio, os metais tóxicos podem desestabilizar a estrutura de biomoléculas, resultando em efeitos mutagênicos e genotóxicos, ocasionando doenças genéticas e câncer. Exemplos clássicos de contaminação por metais são a “Doença de Itai-Itai”, causada por exposição crônica ao cádmio, e a “Doença de Minimata”, pela exposição crônica ao mercúrio (Laws, 2000).

Os metais traços encontrados no ambiente podem ser essenciais ou não para sobrevivência dos organismos. Dentre os essenciais encontra-se o cobre, que está presente naturalmente no ambiente (Lewis e Cave, 1982). A essencialidade do cobre

relaciona-se à sua habilidade em se converter entre os estados reduzido e oxidado, sendo assim usado como cofator em um grande número de atividades enzimáticas, como por exemplo, transferência e transporte de elétrons. No entanto, devido à sua capacidade redox, o cobre em altas concentrações pode ser deletério à biota aquática. Conseqüentemente, o funcionamento saudável das células é dependente da perfeita regulação deste metal como transporte, estocagem e distribuição dentro da célula (Edding e Tala, 1996).

No ambiente, um metal pode seguir diversos caminhos, tais como interações iônicas simples, associação com partículas, precipitação e acúmulo no sedimento, oxidações e reduções químicas e biológicas, complexação com ligantes e adsorção e absorção por microorganismos dentro da cadeia alimentar (Sigg e Behra, 2005). No entanto, segundo Worms *et al.* (2006), os modelos disponíveis que visam esclarecer sobre o transporte e a transformação desses elementos em ecossistemas aquáticos são incompletos, em grande parte por falharem ao considerar a complexidade das interações biológicas com os metais.

1.2. ESPECIAÇÃO DO METAL E A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD)

A forma em que um metal é encontrado na natureza (Figura 03), definida como a especiação do elemento, pode ser classificada sob dois aspectos: (a) a especiação física, que compreende os metais nas formas dissolvida, coloidal e particulada, e (b) a especiação química, que compreende as formas complexada ou iônica, considerando-se os diferentes estados de oxidação do metal (Leppard, 1983).

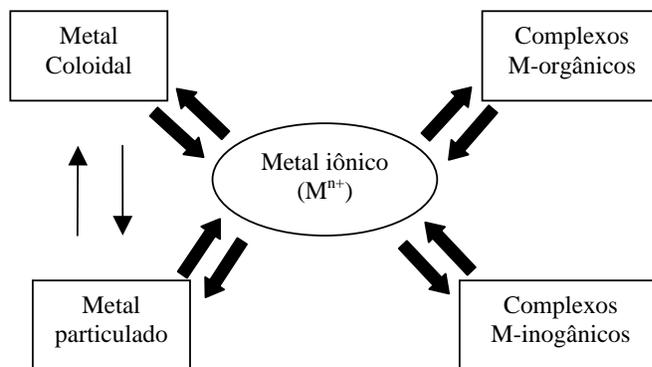


Figura 03- Esquema representativo da especiação dos metais (M).

A especiação dos metais em ecossistemas de água doce, assim como a sua concentração, transporte, transformação e destino, é controlada por fatores ambientais tais como características biológicas, químicas e físicas do ecossistema e as propriedades dos compostos com os quais os metais interagem (Leppard, 1983; Twiss *et al.*, 2000). A temperatura atua sobre a solubilização de muitas substâncias, influenciando a forma química ou especiação dos metais complexadas com elas (Leppard, 1983). O pH do ambiente atua sobre o processo de ionização de compostos e elementos específicos. No caso do cobre, por exemplo, sabe-se que sua forma iônica livre tende a ser favorecida em valores baixos de pH ($\text{pH} < 5$) (Tessier e Turner, 1995).

Os ligantes presentes em ecossistemas aquáticos e capazes de complexar os metais incluem elementos inorgânicos, compostos orgânicos de diversas massas moleculares e propriedades químicas, complexos orgânicos excretados pelos organismos ou mesmo introduzidos na água por atividades antropogênicas, macromoléculas e partículas coloidais, além de grupos funcionais na superfície dos organismos (Sigg e Behra, 2005). Os ligantes inorgânicos que influenciam a especiação dos metais compreendem os hidróxidos e carbonatos, cloretos, fosfatos e sulfatos,

dentre outros (Sigg e Behra, 2005). Nas células, biomoléculas como as fitoquelatinas, glutationinas e metalotioninas contribuem para a concentração e acúmulo de metais em seu interior (Sigg e Behra, 2005).

A matéria orgânica natural (MON) encontra-se entre os compostos orgânicos de maior importância ambiental capazes de complexação com os metais (Kaiser, 2002). De acordo com o critério arbitrário do tamanho das partículas, a MON pode ser dividida em três tipos principais: solutos ($<0,001 \mu\text{m}$), colóides ($\sim 0,001$ a $0,45 \mu\text{m}$) e sólidos ($>0,45 \mu\text{m}$) (Thurman, 1985). Moléculas orgânicas como os ácidos carboxílicos (oxalato, acetato, malonato e citrato), aminoácidos, fenóis e “catecóis” são ligantes de metais que podem ser disponibilizados através da decomposição da matéria orgânica ou excretados pelos organismos (Tessier e Turner, 1995). Do total da MON, a parcela dissolvida é de grande importância ambiental, destacando-se as substâncias húmicas (SH), que contribuem com cerca de 50% do carbono orgânico dissolvido em águas naturais.

Segundo Buffle (1990), a capacidade das substâncias húmicas (SH) de se associarem aos metais relaciona-se às suas propriedades polifuncionais e polieletrólíticas, além da conformação espacial da molécula. Das propriedades polifuncionais, pode-se dizer que as SH possuem cerca de 35% de oxigênio e 1-2% de nitrogênio e enxofre, os quais são os principais responsáveis pelas características de complexação dessas moléculas. O oxigênio encontra-se principalmente nas formas de grupos carboxílicos e fenólicos, enquanto que o nitrogênio e enxofre estão alocados em grupos peptídicos, sulfônicos e tióis. Os grupamentos com nitrogênio e enxofre possuem maior força de ligação por certos metais do que os grupamentos oxigenados (Buffle, 1990). Da conformação espacial da SH, pode-se afirmar que fatores ambientais como força iônica, pH e hidratação são aspectos importantes em relação à complexação de metais.

Também constituinte da MON, os polissacarídeos são importantes na regulação dos elementos metálicos nos ecossistemas aquáticos através da formação de complexos (Lombardi *et al.*, 2002, 2007). No entanto, diferentemente das substâncias húmicas, moléculas de difícil degradação, os polissacarídeos são degradados mais facilmente pela biota. Colombo *et al.* (2004) observaram que a degradação dos polissacarídeos ocorre em duas fases. Na primeira, parte do polissacarídeo (41%) é degradado rapidamente enquanto que na segunda fase, a degradação do polissacarídeo restante (59%) ocorre mais lentamente. Tais macromoléculas contribuem de 1 a 30% para a concentração de carbono orgânico dissolvido em ecossistemas aquáticos (Hellebust, 1974). A maior parte dos carboidratos excretados por microalgas é polimérica e podem ser estruturais, de reserva e/ou extracelulares. Os polissacarídeos extracelulares, além de formarem cápsulas e bainhas de muitas espécies de algas (Brook, 1981), podem sofrer processo de dissolução para o meio circundante (Boney, 1981; Paulsen e Vieira, 1994).

A complexação de íons metálicos com polissacarídeos apresentando grupos funcionais com cargas negativas, tais como ácidos urônicos, piruvatos, fosfatos, hidroxilas, além de proteínas (Kieras *et al.*, 1977), pode ser quantitativamente importante (Lombardi e Vieira, 1999), uma vez que consideráveis quantidades desses compostos são produzidos nos ambientes aquáticos.

A importância ambiental dos exopolissacarídeos produzidos pelas microalgas e cianobactérias tem sido demonstrada na literatura. Sua degradação pela microbiota foi documentada por Colombo *et al.* (2004), assim como sua contribuição como matriz para a formação de agregados gelatinosos orgânicos (TEP) que, por sua vez, podem ser utilizados como substrato alimentar por vários organismos (Cho e Azam, 1988). Choueri *et al.* (2007) demonstraram a utilização de exopolissacarídeos de cianobactérias como fonte alimentar para cladóceros, aumentando a produção secundária e as taxas de

crescimento desses microcrustáceos filtradores. Além disso, os exopolissacarídeos são importantes reguladores da disponibilidade de íons metálicos (Sigg *et al.*, 1987; Lombardi *et al.*, 2002; 2007).

1.3. BIODISPONIBILIDADE E TOXICIDADE

O impacto dos metais sobre os invertebrados aquáticos está ligado direta ou indiretamente à interação entre o elemento químico e os organismos, sendo esta interação fortemente dependente da especiação dos metais (Rainbow, 2002). De acordo com Sigg e Behra (2005), a biodisponibilidade dos metais precisa ser discutida como uma função dos complexos fortes e fracos na solução, sua solubilidade, precipitação, co-precipitação e/ou adsorção em superfícies. Para evidenciar a biodisponibilidade dos metais, fatores como a estabilidade termodinâmica dos complexos e o resultado da atividade dos íons livres, a labilidade cinética, o tamanho e as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas dos complexos devem ser considerados (Sigg e Behra, 2005). Adicionalmente, segundo Rainbow (2002), a captura dos metais é dependente de fatores biológicos como as taxas de crescimento dos organismos e o metabolismo celular.

A biodisponibilidade ambiental é definida por Rand (1995) e Rainbow e Darllinger (1993b) como o metal que está disponível para ser capturado pelos organismos passando a fazer parte de seus processos metabólicos. Já a biodisponibilidade toxicológica é definida como a fração da concentração do metal que é absorvida e/ou adsorvida pelo organismo e, necessariamente, interage com receptores e sítios fisiológicos fundamentais ao metabolismo do organismo, causando desse modo, possíveis danos celulares.

Sabe-se, por exemplo, que as mitocôndrias possuem enzimas e proteínas ligadas às funções respiratórias, as quais ao se ligarem a metais, perdem sua eficiência na

conversão de energia e paralisam a fosforilação oxidativa, causando danos à célula (Rand, 1995). Laws (2000) demonstrou que, em nível celular, há sítios de ligação de metais que agem regulando a disponibilidade tanto dos metais essenciais, como também dos não essenciais. Esses sítios, como a metalotionina (MT) e a fitoquelatina, e o seqüestramento de metais em vesículas de membrana, tais como lisossomos secundários e terciários, possuem as funções de estocar, transportar ou compartimentalizar os metais, evitando seus efeitos tóxicos. Deste modo, a toxicidade celular tem início após a saturação desses sítios. A figura 04 ilustra possíveis interações dos metais com as células.

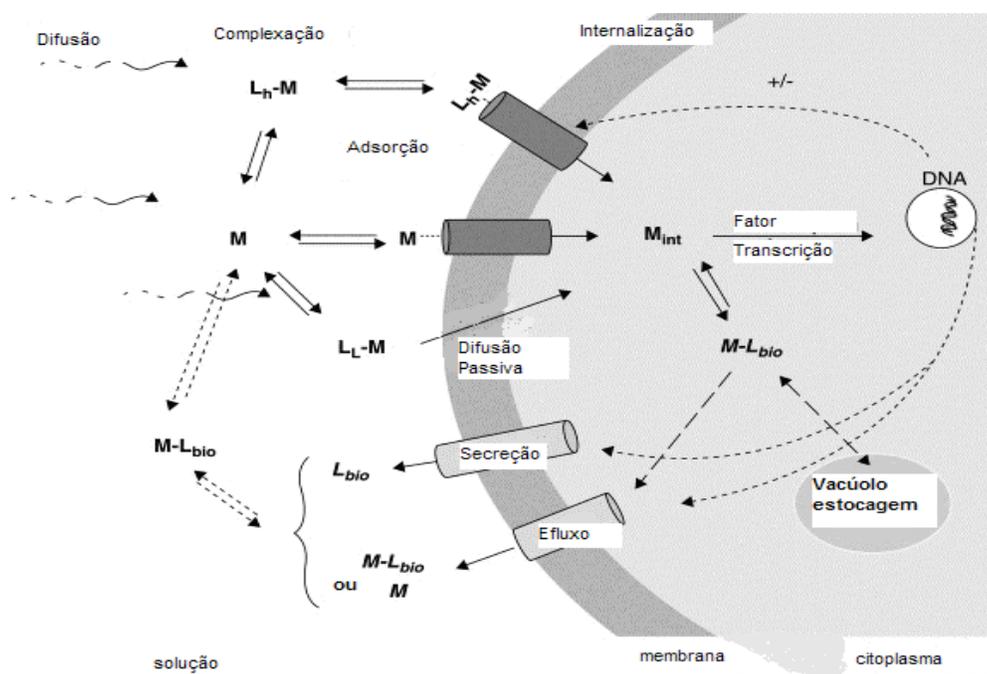


Figura 04- Esquema representativo da interação entre os metais e uma célula: L= ligante complexante de metal (M), L_L= ligante lipofílico, L_h= ligante hidrofílico, L_{bio}= ligante biológico, int = metal internalizado. Adaptado de Worms *et al.* (2006).

De acordo com Rainbow (2002), o acúmulo de metais por invertebrados aquáticos é definido como a captura do metal menos sua eliminação pelo organismo e pode ser dividida em três fases: *i*) captura do metal; *ii*) transporte e distribuição do metal no corpo e *iii*) excreção do metal. A interação desses processos define a estratégia de acumulação do metal no invertebrado. Há uma fração de metais que pode ser passivamente adsorvida ao exoesqueleto, a qual é excluída dos metais descritos como acumulados, uma vez que não entram em processos metabólicos.

A quantidade de metais traços que pode ser acumulada nos invertebrados, varia com o animal. Assim, uma concentração de metal traço que é considerada tipicamente alta para algumas espécies, pode ser baixa para outras (Eisler, 1981; Phillips e Rainbow, 1994). Portanto, sempre que um metal traço é capturado por um invertebrado aquático, seja diretamente do meio aquático circundante ou através do alimento, seu destino dentro do organismo irá variar de acordo com as características do animal e com a biodisponibilidade do metal (Rainbow e Wang, 2001).

Rainbow (2002) descreve alguns modelos com as possíveis rotas dos metais essenciais nos invertebrados aquáticos. São elas:

(a) Regulação da concentração do metal no corpo do indivíduo, como mostrado na figura 05, onde observa-se que a captura do metal ocorre na proporção em que este é disponibilizado para o organismo. No entanto, uma quantidade equivalente de metal é excretado. Assim, a concentração intracelular do metal no invertebrado permanece constante ao longo da exposição.

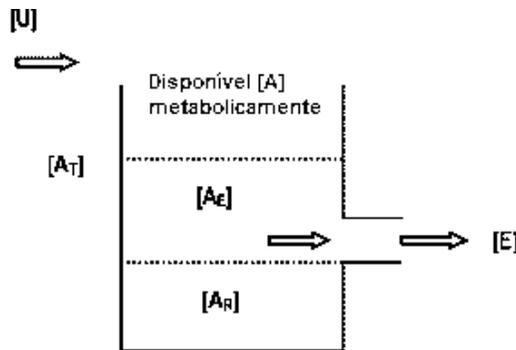


Figura 05- Esquema representativo da regulação de metal por invertebrados. [U]=captura, [E]=excreção, [A]=metal acumulado e disponível metabolicamente. Este é subdividido em metal requerido [A_R] e metal em excesso [A_E]. Adaptado de Rainbow (2002).

(b) Acumulação sem excreção, como mostrado na figura 06, onde observa-se que o metal acumulado e estocado em compartimentos não tóxicos é a forma mais comum de desintoxicação utilizada pelos invertebrados. No entanto, quando a capacidade de estocar metal desses compartimentos é excedida, os organismos sofrem os efeitos tóxicos, uma vez que não são excretados.

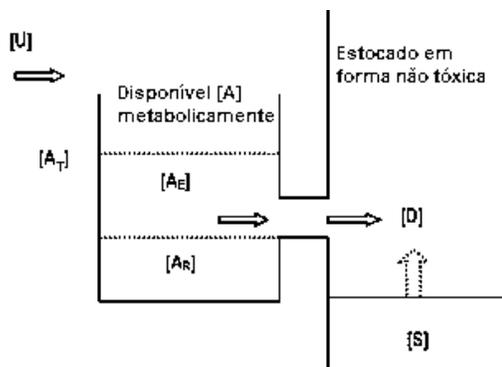


Figura 06- Esquema representativo da acumulação de metal sem excreção pelo invertebrado. [U]= captura, [A]= metal acumulado e disponível metabolicamente, subdividido em metal requerido [A_R] e metal em excesso [A_E]. [S]= metal estocado, [D]= desintoxicado. Adaptado de Rainbow (2002).

(c) Acumulação com excreção, como mostrado na figura 07. Esse modelo pode apresentar duas rotas, uma na qual o organismo regula a taxa de metal necessária dentro de seu corpo até o momento em que a captura excede a capacidade de regulação e, a partir de então, o metal é detoxificado ou excretado (Figura 7A), e a outra rota dá-se através da acumulação líquida do metal e o metal excretado é aquele que se encontra detoxificado (Figura 7B).

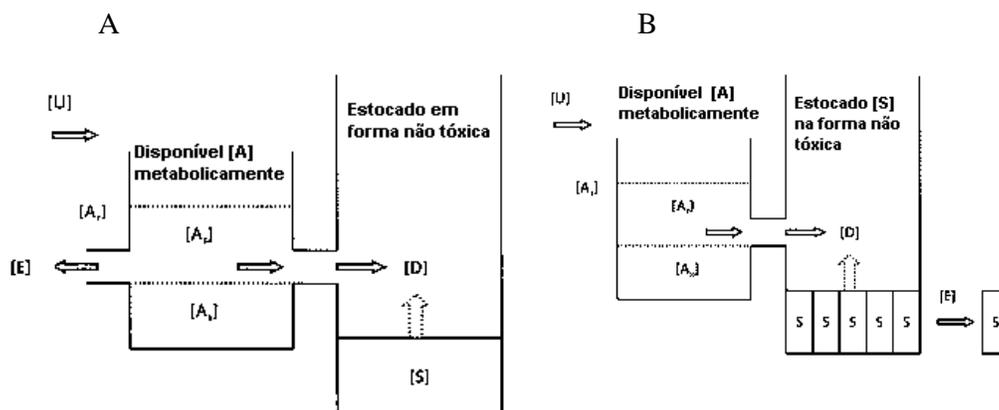


Figura 07- Esquema representativo da acumulação de metal com excreção pelo invertebrado. [U]= captura, [E]= excreção, [A]= metal acumulado e disponível metabolicamente, no qual é subdividido em metal requerido $[A_R]$ e metal em excesso $[A_E]$. [S]=metal estocado, [D]=desintoxicado. Adaptado de Rainbow (2002).

A transferência de metais traços na cadeia alimentar pode ser significativa para os invertebrados aquáticos, uma vez que é controlada não somente pela quantidade de metal acumulado pelo alimento, mas também pelos processos fisiológicos e químicos que compreendem a interação invertebrado-metal (Rainbow, 2002).

Os metais interferem no ciclo de vida dos organismos, podendo causar modificações sobre a reprodução e sobre os processos fisiológicos normais, tais como crescimento e desenvolvimento. Além disso, os metais influenciam o comportamento dos organismos, tendo como consequência uma variedade de efeitos em relação às interações biológicas (Bruland *et al.*, 1991). Desta forma, as interferências irão afetar a longevidade e dinâmica de populações (Rand, 1995; Laws *et al.*, 2000), podendo causar desequilíbrio ecológico no ecossistema aquático.

A acumulação dos metais nos consumidores aquáticos está intrinsecamente ligada ao destino e efeito dos poluentes na cadeia alimentar e nos ciclos biogeoquímicos. As

informações geradas através dos estudos sobre estas interações podem contribuir para a geração de procedimentos que visem o controle da contaminação, além de servir como subsídio para avaliação da amplitude dos riscos de uma contaminação ambiental ocasionada por metais com suas possíveis conseqüências para biota e para a saúde pública em geral.

2. OBJETIVO GERAL

A interferência da matéria orgânica dissolvida natural sobre a biodisponibilidade e toxicidade de elementos metálicos para a biota é amplamente reconhecida (Morel *et al.*, 1991; Rainbow e Darlinger, 1993; Laws, 2000; Nogueira *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2007). A maioria dos trabalhos relata uma redução significativa nos efeitos tóxicos de metais quando complexados à MOD. No entanto, este efeito parece ser dependente da natureza da MOD e dos organismos em questão, permanecendo incerto os efeitos do metabolismo dos organismos heterotróficos sobre a MOD natural e sobre a biodisponibilização de metais no ambiente aquático.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi verificar os efeitos da matéria orgânica dissolvida natural (substância húmica e exopolissacarídeos de cianobactéria) sobre a disponibilidade de um elemento metálico para microheterotróficos, considerando-se as reações fisiológicas e químicas relacionadas com a interação MOD – METAL – ORGANISMO. Para verificar tal interação, fez-se uso do elemento metálico cobre, nutriente essencial requerido em quantidades traço e dotado de grande afinidade por materiais orgânicos. Desse modo, a hipótese delineada para suportar esta pesquisa foi a de que o metal, ainda que complexado à MOD, seja passível de ser biodisponibilizado para organismos de outros níveis tróficos através de processos microheterotróficos sobre a MOD e o ambiente circundante, alterando a disponibilização do elemento químico.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA), **Estado das águas no Brasil 2001-2002**, Brasília, 2003, 514p.

ALOWAY, B.J. **Heavy metal in soil**. 2. ed., New York: John Wiley e Sons, 1993, 339 p.

BONEY, A.D. Mucilage: the ubiquitous algal attribute. *Br. Phycol. J.*, v.16, p.115-132, 1981

BROOK, A.J. **The biology of Desmids**. Oxford: Blackwell Scientific, 1981. 276p. (Botanical Monographs, v.16).

BRULAND, K.W.; DONAT, J.R.; HUTCHINS, D.A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnol. Oceanogr.**, v. 36, n.8, p.1555-1577, 1991.

BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. New York: Ellis Horwood, 1990, 692 p.

CHO, B.C.; AZAM, F. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. **Nature**, v. 332, p. 441-443, 1988.

CHOERI, R.B.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Effects of cyanobacteria of polisaccharidae on life history of Ceriodaphnia cornuta SARS. **J. of plankton research**, no prelo.

COLOMBO, V.; VIEIRA, A.A.H.; MMORAES, G. Activity of Glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on the degradation of extracellular polysaccharide produced by Anabaena spiroides (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 110-116, 2004.

EDDING, M.; TALA, F. Copper transfer and influence on a marine food chain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 617-624, 1996.

EISLER, R. **Trace metal concentration in marine organisms**. Oxford: Pergamon Press, 1981.

HELLEBUST, J.A. Extracellular products. In: STEWART, W.D.P. (ed.) **Algal physiology and biochemistry**. Oxford: Blackwell scientific, 1974. 838-863 p.(Botanical Monographs, v.10).

INTERNATIONAL ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY CENTRE (IETEC). **Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: uma abordagem integrada ao problema da eutrofização**. Local e editora, 2001. 385 p. v. 11.

KAISER, K., GUGGENBERGER, G. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. **Org. Geochem.** V. 31, p. 711-725, 2002.

KIERAS, J.H.; RODEN, L.; CHAPMAN, D.J. The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein- polysaccharide from the red algae *Porphyridium cruetum*. **Biochemistry Journal**, v.165, p.1-9, 1977.

LACERDA, D.L.; SALOMONS, W. **Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb?** Berlin: Springer, 1998, 16 p.

LAWS, A.E. Metals. In : Laws, A.E. **Aquatic pollution** : an introductory text. 3. ed. University of Hawaii: An interscience publishers, 2000. p.351-415.

LEPPARD, G.G. **Trace element speciation in surface waters and its ecological implications**. New York: Plenum Press, 1983. 319pp.

LEWIS, A.C.; CAVE, W.R. The biological importance of copper in oceans and estuaries. **Oceanography and Marine Biology Annual Review**, v. 20, p. 471-696, 1982.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Copper complexation by metabolites excreted by some freshwater Cyanophyceae and Chlorophyceae at stationary and exponential growth phases. **Phycologia**, v. 38, n. 4, p. 283-288, 1999.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.H.; SARTORI L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.M.R.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74 – 78, 2007.

MOREL, F.M.M.; HUDSON, R.J.M.; PRICE N.M. Limitation of productivity by trace metals in the sea. **Limnology and Oceanography**, v.36, p. 1742-1755, 1991.

NIRAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, v. 50, p. 139-161,1988.

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolisaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Research**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

PAULSEN, B.S.; VIEIRA, A.A.H. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polyssacharides produced by *Spondylosium panduriforme*. **Journal of Phycology**, v.30, n. 4, p. 638-641, 1994

PHILIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S. Biomonitoring of trace aquatic contaminations. 2. ed. London: Chapman e Hall, 1994.

RAINBOW, P.S.; DALLINGER, R. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrate. In:_____. **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton: FL: Lewis publishers, 1993. p.119-131.

RAINBOW, P.S.; WANG, W.X. Comparative assimilation of Cr, Se and Zn by the barnacle *Elminus modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. **Marine Ecology Progress Series**, v. 218, p. 239-248, 2001.

RAINBOW, P.S. () Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002

RAND G.M. Introduction to aquatic toxicology. In: _____. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. Palm Beach, Florida: Taylor e Francis Publishers, 1995. p.3-66.

SIGG, L., STURM, M.; KISTLER, D. Vertical transport of heavy metal by settling particles. **Limnol. Oceanogr.**, v. 32, n. 1, p. 112-130,1987.

SIGG, L.; BEHRA, R. Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. In: Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R.K.O. (eds). **Metals ions in biological systems**. Boca Rotan: Taylor e Francis Group, 2005. p. 47-73.

TESSIER, A. TURNER, D.R. **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. Chichester: John Wile e Sons, 1995. p.679pp.

THURMAN, E.M. Humic substances in groundwater. In: AIKEN, G. R. (Ed.), **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry and characterization**. New York: John Wiley e Sons, 1985. p. 87-104.

TUNDISI, J.G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: RiMa, 2003.

UNESCO. Compartilhar a água e definir o interesse comum. In: _____. **Água para todos: água para vida**. Edições Unesco, p. 25-26, 2003.

VanDEMARK, P. J.; BATZING, B. L. **The microbes: an Introduction to their Nature and Importance**. Benjamin: Cummings Publishing Company, 1987. p. 991.

VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O.R. An EPR determination of copper complexation by excreted high molecular weight compounds of *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyta). **Journal of Plankton Research**, v. 10, p.1313-1315, 1988

WETZEL, R.G. **Limnology: lake and river Ecosystems**, 3. ed.
San Diego: Academic, 2001.

WORMS, I.; SIMON, D.F.; HASSLER, C.S.; WILKINSON K.J. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. **Biochimie**, v. 88, p. 1721–1731, 2006.

Especiação do cobre no reservatório do Monjolinho (São Carlos, SP)

RESUMO

Os metais traços estão naturalmente presentes nos ecossistemas aquáticos. A forma ou espécie química em que o metal se encontra no ambiente relaciona-se aos seus efeitos sobre a biota, biodisponibilidade e toxicidade. Esta parte da pesquisa teve como objetivo verificar a especiação do cobre no reservatório do Monjolinho, local onde os organismos foram obtidos. Além disso, avaliou-se a capacidade de complexação da água do reservatório, quantificando-se a força de associação (K') e a concentração de sítios (CL) disponíveis para ligação com o cobre. Foram determinadas as espécies de cobre livre, total dissolvido e total particulado. Os resultados mostraram que grande parte do cobre encontra-se na forma particulada, e que praticamente todo o cobre dissolvido encontra-se complexado. Através da titulação complexométrica, dois ligantes distintos foram detectados na água do reservatório, um mais forte ($\text{Log } K'_1 = 6.6$; $\text{CL}_1 = 2.8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e outro mais fraco ($\text{Log } K'_2 = 4.8$; $\text{CL}_2 = 6.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas de água doce superficiais são fundamentais para a humanidade, atendendo a um amplo espectro de suas necessidades. No entanto, o aumento das atividades antrópicas tem levado ao desequilíbrio desses ambientes, tornando-os cada vez mais impróprios para sobrevivência de muitas espécies, e para os vários usos necessários para a qualidade de vida humana (Nriagu, 1990).

O cobre é um elemento traço encontrado naturalmente no ambiente e essencial aos seres vivos, uma vez que é requerido para o crescimento normal de plantas e animais (Lewis e Cave, 1982). Isso se deve em grande parte à habilidade do cobre em converter-se entre os estados reduzido e oxidado, sendo assim usado como cofator em um considerável número de atividades enzimáticas, como por exemplo, transferência e transporte de elétrons. No entanto, em altas concentrações o cobre pode ser deletério à biota aquática (Edding e Tala, 1996). Conseqüentemente, o funcionamento saudável das células é dependente da perfeita regulação desse metal considerando seu transporte, estocagem e distribuição dentro da célula.

O impacto dos metais nos organismos aquáticos está relacionado à interação entre o metal e os organismos, sendo esta interação controlada pela espécie química, ou especiação, do metal (Leppard, 1983). Sabe-se que a biodisponibilidade dos metais traços no ambiente é controlada pela presença de vários ligantes, os quais são capazes de formar complexos com esses elementos (Sigg e Behra, 2005).

Os ligantes atuantes na especiação dos metais em ecossistemas aquáticos podem apresentar grande diversidade, podendo ser orgânicos e/ou inorgânicos. Dentre os ligantes orgânicos, pode-se citar as substâncias húmicas, compostos produzidos pelos organismos (autóctones), compostos introduzidos na água por atividades

antropogênicas, macromoléculas e partículas coloidais, e ainda grupos funcionais localizados na superfície dos organismos (Leppard, 1983; Sigg e Behra, 2005). Assim, os metais são distribuídos nos ambientes aquáticos em formas dissociadas ou em complexos com diferentes propriedades, tais como a estabilidade termodinâmica, labilidade cinética e tamanho do composto.

O estudo da especiação dos metais traços nos ambientes aquáticos é importante para o entendimento da reatividade, mobilidade, biodisponibilidade e principalmente toxicidade dos metais para biota (Tessier e Turner, 1995; Nogueira *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2007), contribuindo para o conhecimento a respeito dos impactos ecológicos dos metais sobre os ecossistemas aquáticos.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi inferir sobre a especiação do cobre na água do reservatório do Monjolinho, onde os organismos da pesquisa foram obtidos. Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- » Determinar as concentrações de cobre livre, cobre total dissolvido e cobre particulado no reservatório Monjolinho;
- » Determinar a constante de estabilidade condicional e a concentração de ligantes para o cobre presentes no reservatório Monjolinho, através de titulações complexométricas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. O RESERVATÓRIO DO MONJOLINHO

De acordo com Sé (1992), a bacia hidrográfica do rio Monjolinho é caracterizada, na sua maior parte, por área rural com solo arenoso. No entanto, no trecho do rio que antecede a represa do Monjolinho, pode-se distinguir duas áreas: uma

compreende a nascente, localizada em área rural com pastagens, sendo o leito do rio preservado por mata ciliar, com ponto de captação de água para abastecimento ao público; a segunda área possui uma ocupação sub-urbana (margem esquerda), além da ocupação rural (margem direita).

O reservatório do Monjolinho é um ambiente eutrófico tropical, construído com objetivo paisagístico em 1970 no campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (47°53'W e 22°01'S), SP.

Segundo Nogueira e Matsumura-Tundisi (1996), o reservatório do Monjolinho está localizado a uma altitude de 816 m, apresenta área superficial de 4,6 ha, volume de 73.251,0 m³, largura máxima de 150,0 m, comprimento máximo de 510,0 m, profundidade máxima de 3,0 m, profundidade média de 1,54 m, área inundada de 47.157 m³, tempo de retenção no período de seca de 22,9 dias e tempo de retenção no período de chuva de 2,1 dias.

2. ESPECIAÇÃO DO COBRE NO RESERVATÓRIO MONJOLINHO

Três formas do metal cobre foram determinadas no presente estudo: íons cobre livre, cobre total dissolvido e cobre total particulado. Para tanto, 50 mL de água coletada do reservatório do Monjolinho foram filtradas em filtros de acetado de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro previamente lavado com ácido nítrico (HNO₃ 1,0 mol.L⁻¹). O filtrado foi separado para análise de íons cobre livre (30 mL) e cobre total dissolvido (20 mL), enquanto que o filtro seguiu para análise de cobre total particulado. Três réplicas deste procedimento foram realizadas no mês de outubro/2006.

O cobre livre (mol.L⁻¹) foi determinado através da técnica de potenciometria, usando-se um eletrodo seletivo ao íon cobre (ANALION – SP, Brasil) em conjunto com um eletrodo de referência de vidro de dupla junção Ag/AgCl (ANALION – SP, Brasil).

Para a quantificação foi utilizado um potenciômetro ANALION 2000. A força iônica das amostras foi ajustada para $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com NaNO_3 ultrapuro (MicroSelect, Fluka Chemie). Sabe-se que a estabilidade na resposta do eletrodo seletivo varia com a concentração do metal em solução (Lombardi *et al.*, 2007) e, para uma concentração da ordem de $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, foi requerido um tempo de 4h para estabilização. Esse tempo diminui com o aumento da concentração de cobre. Todas as medições foram realizadas em temperatura constante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

O limite de detecção em técnicas potenciométricas pode restringir seu uso em concentrações ambientalmente relevantes. No entanto, quando a calibração do equipamento é realizada com tampões metálicos, estende-se o limite de detecção para concentrações na faixa de $10^{-12} - 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ (Jardim *et al.*, 1986; Lombardi *et al.*, 2007). Um tampão metálico atua de maneira similar ao tampão de pH, como descrito a seguir.

Em uma solução contendo o metal (M) e o ligante (L), um tampão metálico pode ser formado desde que exista um excesso de ligantes e, assim, o metal iônico encontrar-se-á na forma de complexo ML (Eq. 1). Nesta situação, o metal pode ser tamponado da mesma maneira que os íons de hidrogênio em tampões de pH,



com o início do equilíbrio expresso quantitativamente pela constante de estabilidade apropriada

$$\beta_n = \frac{(\text{ML}_n)}{(\text{M})(\text{L})^n} \quad (2)$$

o qual pode ser escrito

$$pM = \log \beta_n + \frac{\log(L)^n}{(ML)_n} \quad (3)$$

onde pM é o logaritmo negativo da atividade do metal livre análogo ao pH . A similaridade entre pM e pH é maior para sistemas contendo metal e complexos na proporção de 1:1 pois, na presença de excesso de ligantes e pH constante, a razão $[L] : [ML]$ não é significativamente alterada sob diluição e, ainda, através da Eq. 3, observa-se que pM permanece essencialmente constante. Usando-se tampão metálico, as espécies de metal livre variam com a função da razão metal : metal - ligante, assim como com pH , desde que a protonação do metal não seja afetada (Perrin e Dempsey, 1979).

No presente estudo, foi usado um tampão metálico para confecção da curva de calibração. A solução de tampão metálico usada foi composta de cobre, NTA (ácido nitrilo triacético) e um ajustador da força iônica ($NaNO_3$) para trabalhar com coeficiente de atividade fixo. O tampão metálico foi preparado como descrito em Jardim *et al.* (1986) e a curva de calibração obtida é mostrada na figura 01. O limite de detecção do aparelho estendeu-se para $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre livre.

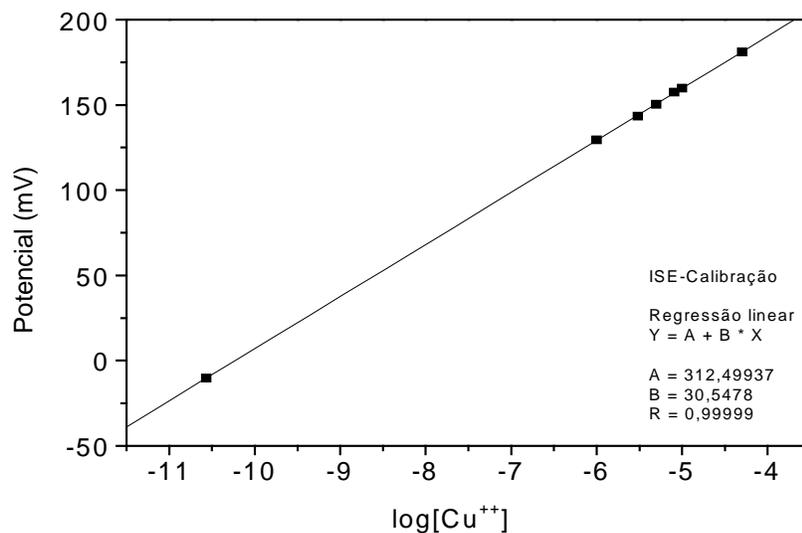


Figura 01- Exemplo da regressão linear resultante da curva de calibração do ISE com uso do tampão metálico. O potencial de leitura do aparelho (mV) é plotado em função do log da concentração de cobre livre (M).

Cobre total dissolvido (mol.L^{-1}) inclui todas as espécies de cobre não retidas pelo filtro, quer seja íon livre, ligado a compostos orgânicos ou inorgânicos. Neste trabalho, as determinações de cobre total dissolvido foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com auxílio de forno de grafite (VARIAN, Spectra A.A 220, Austrália), após terem sido fixadas com HNO_3 em uma concentração final de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

Para a determinação do cobre total particulado, os filtros de acetado usados no processo de filtração foram previamente numerados e pesados em balança microanalítica com legibilidade de $1 \mu\text{g}$ (Sartorius MC21S, Alemanha). Posteriormente, esses filtros contendo todo o material particulado retido no processo de filtração, foram colocados em estufa a uma temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h para secagem do material e determinação do peso seco (PS). Assim, cobre total particulado é reportado como $\mu\text{gCu}.\mu\text{gPS}^{-1}$. Em seguida, o material particulado sofreu processo de digestão ácida

adicionando-se 2 mL de HNO₃ concentrado e transferindo-o para uma estufa a 90° C onde permaneceram por 48 h, seguindo a metodologia descrita por Lores *et al.* (1999). Após digestão, o volume da amostra foi completado para 50 mL com água deionizada e seguiu para determinação em espectrofotômetro de absorção atômica com auxílio de forno de grafite. A curva de calibração do espectro de absorção atômica é mostrada na figura 02.

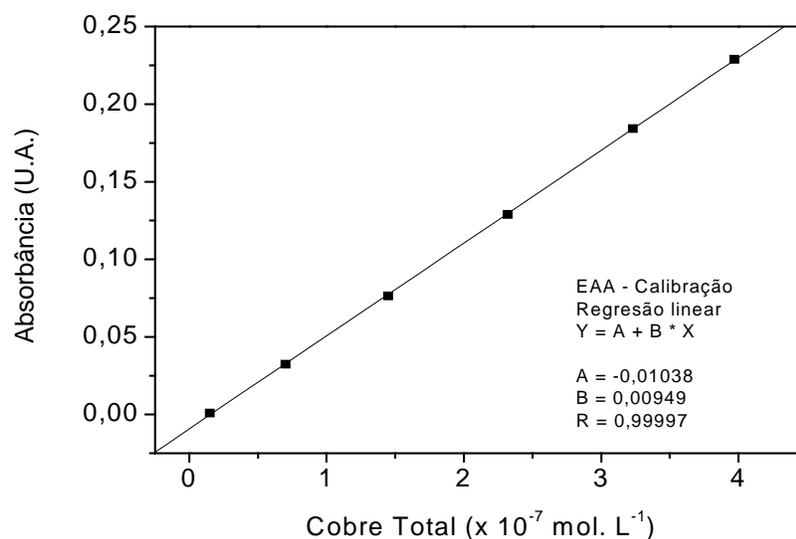


Figura 02- Exemplo da curva de calibração do espectro de absorção atômica a partir de uma regressão linear onde a concentração de cobre total é plotada em função da leitura de absorbância do aparelho.

3. COMPLEXAÇÃO DO COBRE NO RESERVATÓRIO MONJOLINHO

As propriedades de complexação da água do reservatório do Monjolinho em relação ao cobre foram obtidas em amostras filtradas através de filtros de acetato de celulose com 0,45 μ m de diâmetro de poro previamente lavados com HNO₃ 1,0 mol.L⁻¹. As amostras foram submetidas ao processo de titulação complexométrica através da adição de solução padrão de cobre (1 mg.mL⁻¹ CuCl₂, Titrisol, Merck) em concentrações crescentes do metal. A força iônica foi mantida constante através da

adição de NaNO_3 (MicroSelect, Fluka) em concentração final de $1 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$. O pH foi mantido constante utilizando-se o tampão orgânico PIPES (sal disódio hidratado, 98%, Aldrich) em concentração final de $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. A concentração total de ligantes (CL) e a constante de estabilidade condicional (K') foram obtidas analisando-se a curva de titulação através do Modelo de Scatchard (Scatchard *et al*, 1957), onde a concentração do metal ligado (ML) dividido pela concentração do metal iônico (M^{2+}) é plotado como uma função de ML. Como resultado desse tratamento matemático, quando mais de um sítio de ligação está presente, uma curva côncava é obtida. Quando há apenas um sítio presente, uma reta é obtida.

RESULTADOS

As concentrações das três espécies de cobre determinadas no reservatório do Monjolinho são apresentadas na Tabela 01. Os resultados mostram que grande parte do cobre encontra-se na forma particulada ($8,1 \times 10^{-3} \mu\text{gCu. } \mu\text{gPS}^{-1}$), enquanto que na forma dissolvida foram encontrados $4,8 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, cerca de 100 vezes mais do que a concentração de íons cobre livre ($5,1 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$).

Tabela 01- Valores das concentrações das formas químicas de cobre (cobre livre, total dissolvido, total particulado) determinadas na água do reservatório do Monjolinho. Na última linha da tabela é apresentado o valor médio \pm o desvio padrão.

Cu ²⁺ (mol.L ⁻¹)	Cu Total dissolvido (mol.L ⁻¹)	Cu Total particulado ($\mu\text{gCu. } \mu\text{gPS}^{-1}$)
$4,3 \times 10^{-10}$	$5,3 \times 10^{-8}$	$6,2 \times 10^{-3}$
$5,9 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-8}$	$9,6 \times 10^{-3}$
$5,1 \times 10^{-10}$	$3,9 \times 10^{-8}$	$8,5 \times 10^{-3}$
$5,1 \times 10^{-10} \pm 8 \times 10^{-11}$	$4,8 \times 10^{-8} \pm 7,6 \times 10^{-9}$	$8,1 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-3}$

Na figura 03, pode-se visualizar os resultados da titulação complexométrica da água com o cobre (Fig. 3A), assim como a análise de Scatchard (Fig. 3B). O gráfico mostra duas classes de ligantes, uma com ligantes mais fortes, $\text{Log } K'_1 = 6,6$ em concentração de $\text{CL}_1 = 2,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Os ligantes mais fracos foram encontrados em concentração de $\text{CL}_2 = 6,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e com força de associação $\text{Log } K'_2 = 4,8$, portanto apresentando menor afinidade para o cobre.

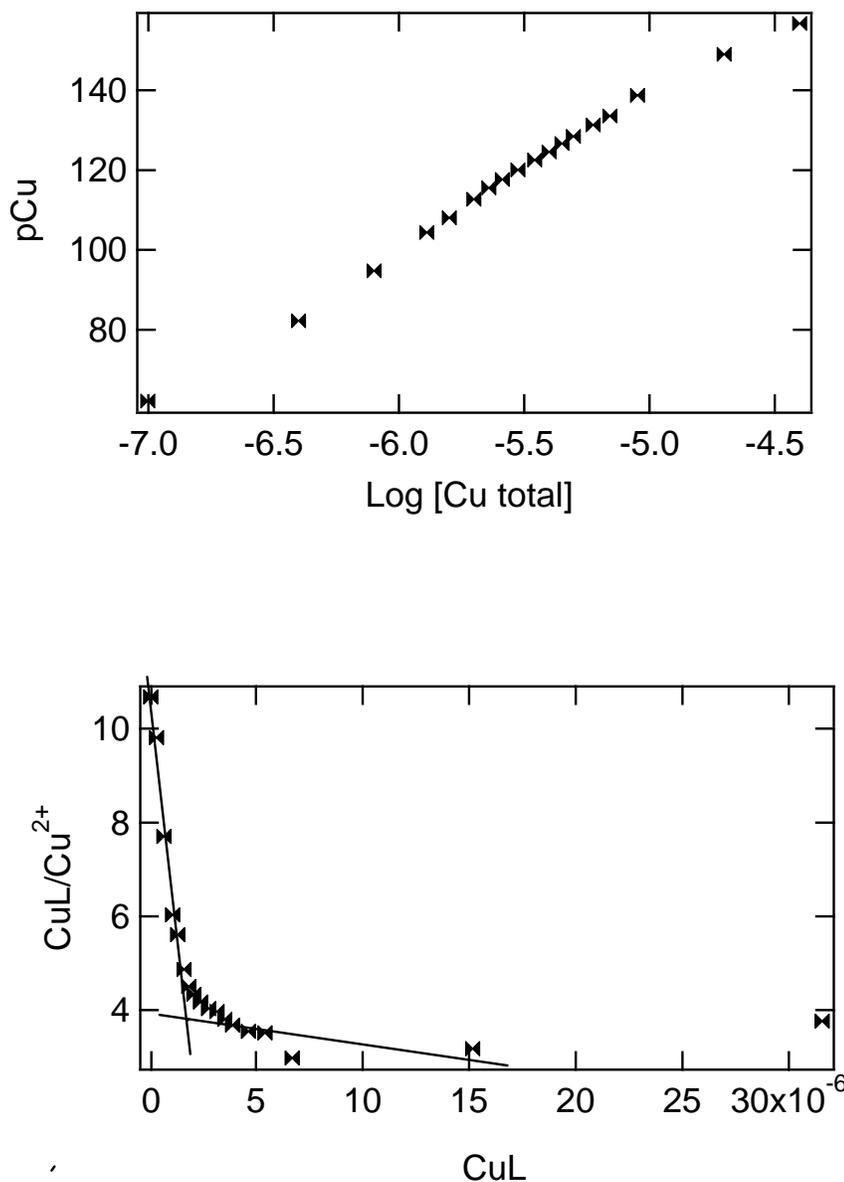


Figura 03- Capacidade de complexação da água do reservatório do Monjolinho. A = Curva de titulação complexométrica com cobre, obtida a partir da água do reservatório; B = Modelo de Scatchard obtido a partir dos dados da curva de titulação. Parâmetros obtidos: $\text{Log } K'_1 = 6.6$ $\text{CL}_1 = 2.8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{Log } K'_2 = 4.8$ $\text{CL}_2 = 6.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

DISCUSSÃO

A especiação dos metais em ambientes aquáticos possui grande influência na biodisponibilidade desses elementos (Sigg e Behra, 2005) e conseqüentemente em sua toxicidade. As formas em que um metal se encontra no ambiente podem ser física (particulado e dissolvido) e quimicamente fracionadas (livres ou complexados).

A distribuição dos metais entre as formas particuladas e dissolvidas é regulada por fatores físicos e químicos da água, pela atividade biótica e pelas propriedades do próprio elemento (Leppard, 1983). No presente trabalho, a concentração de metal particulado ($8,1 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-3}$) foi superior ao dissolvido ($4,8 \times 10^{-8} \pm 7,6 \times 10^{-9}$). Segundo Sigg *et al.* (1995) os metais traços ligados à partículas abióticas são removidos da coluna d'água através da sedimentação. Neste estudo, as amostras de água foram coletadas na superfície da região mais profunda do reservatório, em um período com ausência de chuvas e pouca variação de temperatura. Estas características dão estabilidade à dinâmica de movimentação das águas no referido reservatório. Seguindo discutido por Sigg *et al.* (1995), podemos considerar que a maior contribuição para os valores de metal particulado neste estudo foi de origem biótica.

Além do cobre ser um metal essencial requerido em diminutas quantidades pela biota, de acordo com Rand (1995), a proporção entre a razão da concentração do metal na biota em relação ao seu habitat é sempre maior que 1, fazendo com que os metais sejam acumulados e biomagnificados na cadeia trófica. Os resultados apresentados aqui estão de acordo com estudos relacionados com análises sobre concentrações de metais em vários compartimentos ambientais (Blanchard *et al.* 1999; Wastras *et al.* 1998; Twiss *et al.*, 1996). Blanchard *et al.* (1999), estudando o impacto das atividades industriais e urbanas do rio Sena, verificaram que a biota continha uma concentração de cobre 40 x maior do que a encontrada na água. Wastras *et al.* (1998), ao estudarem a

biomagnificação do mercúrio ao longo de uma cadeia alimentar aquática observaram que uma concentração maior de mercúrio foi encontrado na biota (47 x maior) em relação à fração dissolvida. Twiss *et al.* (1996) verificaram que, no lago Erie, tanto a concentração de zinco quanto a de cádmio estavam presentes em valores mais elevados na biota (> 70 %) do que na forma dissolvida.

Dependendo da concentração e do grau de complexação, os metais essenciais podem tanto limitar o crescimento dos organismos quanto causar toxicidade (Meylan *et al.*, 2004; Rainbow, 2000). Para o entendimento da dinâmica desses elementos nos ambientes aquáticos é importante a determinação da habilidade dos ambientes em complexar o metal. Em relação à toxicidade, a força dos ligantes assim como sua concentração têm grande significado, uma vez que ligações fracas são ineficientes em reduzir a toxicidade. Deste modo, esses dois parâmetros, a constante de estabilidade (relacionada com a força de associação) e a concentração de ligantes determinam a capacidade complexante de uma amostra de água (Jin e Gogan, 2000).

A capacidade complexante da água do reservatório do Monjolinho foi determinada através da titulação complexométrica na qual verificou-se duas classes de ligantes, onde a constante de estabilidade correspondente a associações mais fortes ($\log K'_1 = 6.6$) apresentou concentração de ligantes $CL_1 = 2.8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, ou seja, superior à concentração de cobre total dissolvido ($4,8 \times 10^{-8} \pm 7,6 \times 10^{-9}$). Considerando a equação (4), demonstra-se que praticamente todo o cobre dissolvido ($4.7 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$) encontra-se na forma de complexos orgânicos e/ou inorgânicos.

$$\text{CuTC} = \text{CuTD} - \text{CuL} \quad (4)$$

onde:

CuTC = cobre total complexado; CuTD = cobre total dissolvido; CuL = íons cobre livre.

No reservatório do Monjolinho, cerca de 98,9% do cobre total dissolvido foi encontrado na forma complexada, enquanto que somente 1,1% do cobre total dissolvido foi encontrado na forma iônica livre. Estes resultados estão de acordo com outros da literatura, que mostram que em ambientes naturais, a especiação do cobre é dominada pela formação de complexos (Achterberg *et al.*, 1997; Hellebusch *et al.*, 2003, Mylon *et al.*, 2003; Meylan *et al.*, 2004). Achterberg *et al.* (1997) observaram que 94% do cobre no lago Esthwaite encontrava-se complexado por ligantes naturais. Similarmente, Hullebusch *et al.* (2003), ao estudarem a especiação do cobre no reservatório Sant German Les Belles, verificaram que de 84 a 99% do cobre encontrava-se na forma complexada. Mylon *et al.* (2003), encontraram no lago de Connecticut (Hannonasset) o mesmo comportamento, onde somente 8,8% do cobre estavam na forma iônica. O mesmo foi verificado no lago Suíço Greifen, por Meylan *et al.* (2004), onde 99,9% do cobre dissolvido estava complexado.

A complexação do cobre nos ecossistemas aquáticos pode ocorrer através de elementos inorgânicos e compostos orgânicos (Sigg e Behra, 2005). No entanto, são os compostos orgânicos os de maior importância na complexação desse elemento (Apte *et al.*, 2000; Jin e Gogan, 2000; Kaiser, 2002; Unsworth *et al.*, 2006), principalmente em ambientes eutrofizados (Xue *et al.*, 2004; Gouvêa *et al.*, 2005) onde a atividade do fitoplâncton pode ser elevada. Apte *et al.* (2000), ao estudarem os complexos dissolvidos de cobre, demonstraram que a destruição da matéria orgânica das amostras através de luz UV, resultou em perda da capacidade complexante dessas amostras, confirmando que a complexação do cobre estava mais associada a ligantes orgânicos do que aos inorgânicos.

Através do estudo da capacidade complexante do cobre em águas naturais, Jin e Gogan (2000) demonstraram que a existência de complexos com alta constante de estabilidade condicional ($\log k'_1 = 15,68 - 18,25$) para cobre devia-se a compostos orgânicos. Xu *et al.* (2004), ao estudarem a especiação de cobre em alguns lagos da Suíça, concluíram que este metal é fortemente complexado por ligantes orgânicos produzidos provavelmente por processos biológicos, como indicado pela variação sazonal nos lagos eutróficos e pela relação entre a complexação do cobre e a atividade algal nesses ambientes. Esses autores encontraram a constante de estabilidade com associações mais fortes para o lago Greifen de $\log K'_1 = 14,5$, para o lago Sempach de $\log K'_1 = 15,5$ e para o lago Lucerne de $K'_1 = 13,0$.

Gouvêa *et al.* (2005) encontraram correlação entre os ligantes de cobre e a matéria orgânica dissolvida excretada por cianobactérias ($\log K_1 = 9,2 - 9,5$) e a MOD isolada da água de um reservatório eutrofizado ($\log K_1 = 8,6 - 8,8$), indicando que as fortes associações do cobre em ambientes eutrofizados podem ser devidas principalmente aos polissacarídeos excretados pelo fitoplâncton.

Unsworth *et al.* (2006), ao detectarem as espécies de cobre no lago Greifen e no rio Wyre, através das técnicas de filme de gradiente difuso (DGT) e voltametria com gel integrado ao microeletrodo, observaram que 99% do cobre dissolvido do rio Wyre estava complexado aos ácidos fúlvios, e que mais do que 99% do cobre dissolvido do lago Greifen estava ligado às substâncias húmicas.

Os valores de constante de estabilidade condicional (K') obtidos pelos autores citados acima são superiores àqueles encontrados no presente estudo. Isto pode ser devido ao fato de que os ambientes aquáticos possuem uma variedade de ligantes com diferentes características. Além disso, essas variáveis são dependentes do método usado, da composição da água e do tratamento dos dados (Jin e Gogan, 2000), uma vez que os

valores de K' obtidos são relacionados à amplitude de concentração do metal utilizada na titulação complexométrica.

A determinação da concentração total de um metal no ambiente não é suficiente para prever seus efeitos tóxicos. A importância da determinação da especiação dos metais no ambiente refere-se principalmente à necessidade de avaliar-se o impacto ambiental desses elementos. Ainda, para a correta interpretação do destino e impacto ambiental dos metais e seus complexos, é necessário considerar a importância do fluxo e reatividade dos compostos, além das trocas dos metais entre o ambiente e a biota (van Leeuwen *et al.*, 2005). Assim, as análises da dinâmica de especiação de metais em ecossistemas aquáticos podem ser consideradas um dos passos para a tomada de base ao desenvolvimento de modelos de biodisponibilidade e de estratégias de gerenciamento dos riscos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTERBERG, E.P.; VAN DEN BERG, C.M.G.; BOUSSEMART, M.; DAVISON W. Speciation and cycling of trace metals in Esthwait water: a productive english lake with seasonal deep-water anoxia. **Geochimistry Cosmochimistry Acta**, v. 61, p. 5233-5253, 1997.

APTE, S.; ROWLAND, R.; PATNEY, H. **Size distribution of copper complexing ligands in tropical freshwaters. CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY**, v. 12, n^o 3, p. 79-88, 2000.

BLANCHARD, M.; TEIL, M.J.; CARRU, A.M.; GARBAN, B.; OLLIVON, D.; CHESTERIKOFF, A.; CHEVREUIL, M. Biota contamination by PCBs and trace metals in the freshwater estuary of the River Seine (France). **Hydrobiologia**, v. 400, p. 149-154, 1999.

EDDING, M.; TALA, F. Copper transfer and influence on a marine food chain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** , v. 57, p. 617-624, 1996.

GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A.A.H.; LOMBARDI, A.T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60, p. 1332–1339, 2005.

JARDIM, W.F.; GIMENEZ, S.M.N.; NERY, J.A.S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selectie electrodes. In: Anais do Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, V, 1986, São Paulo. p.226-230.

JIN, L.; GOGAN, N. J. Copper complexing capacities of freshwaters by adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 77–88, 2000.

KAISER, K., GUGGENBERGER, G. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. **Org. Geochem.** V. 31, p. 711–725 , 2002.

LEPPARD, G.G. (Ed.) **Trace element speciation in surface waters and its ecological implications**. New York: Plenum Press, 1983. 319 p.

LEWIS, A.C.; CAVE, W.R. The biological importance of copper in oceans and estuaries. **Oceanography and Marine Biology Annual Review**, v. 20, p. 471-696, 1982.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). **Phycologia**, v. 37, p. 34-37, 1998.

LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.M.R.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI, A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74 – 78, 2007.

MEYLAN S.; BEHRA R.; SIGG L. Influence of metal speciation in Natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A Microcosm Study. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 3104-3111, 2004.

MYLON, S.; TWINING, B.S.; FISHER, N.S.; BENOIT, G. Relating the Speciation of Cd, Cu, and Pb in Two Connecticut Rivers with Their Uptake in Algae. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, p. 1261-1267, 2003.

NIRAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, v. 50, p. 139-161, 1988.

NOGUEIRA, M.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Limnologia de um sistema artificial raso. Dinâmica das populações planctônicas. **Acta Limnologica Brasiliense**, v. 8, p. 149-168, 1996.

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolisaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Research**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

PERRIN, D. D.; DEMPSEY B. **Buffers for pH and metal ion concentration**. London: Chapman e Hall, 1979.176p.

RAND, G.M. Introduction to aquatic toxicology. In: **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. (ed G.M Rand)

Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida. Taylor e Francis publishers, 3-66 pp., 1995.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

SÉ, J.A.S. **O Rio Monjolinho e sua bacia hidrográfica como integrantes de sistemas ecológicos. Um conjunto de informações para o início de um processo de pesquisas ecológicas, de educação, planejamento, e gerenciamento ambientais a longo prazo.** 1992. 381p. Dissertação. UFSCar, São carlos.

SCATCHARD, G.; COLEMAN, J.S.; SHEN, A.L. Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.79, p. 12-20, 1957.

SIGG, L.; KUHN, A.; XUE, H.; KISTLER, D. Cycles of trace elements (copper and zinc) in a eutrophic lake. Role of speciation and sedimentation, in aquatic chemistry: interfacial and interspecies processes. **Adv. Chem. Ser.**, v. 244, p. 213–247, 1995.

SIGG, L.; BEHRA, R. Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K.O. (eds) **Metals ions in biological systems**. Boca Rotan: Taylor e Francis Group, 2005. p. 47-73.

TESSIER, A.; TURNER, D. R. **IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems**. Chicester: Wiley e Sons, 1995.

TWISS, M.R.; CAMPBELL, P.G.C.; AUCLAIR, J.C. Regeneration, recycling, and trophic transfer of trace metals by microbial food-web organisms in the pelagic surface waters of lake Erie. **Limnology e Oceanography**, v. 41, n. 7, p. 1425-1437., 1996.

UNSWORTH, E. M.; KENT, W.W.; ZHANG, H.; DAVISON, W.; BLACK, F.; BUFFLE, J.; CAO, J.; CLEVEN, R.; GALCERAN, J.; GUNKELL, P.; KALIS, E.; KISTLER, D.; v a n LEEUWEN, H. P.; MARTIN, M.; NOEL, S.; NUR, Y.; ODZAK, N.; PUY, J.; vanRIEMSDIJK, W.; SIGG, L. ; TEMMINGHOFF, E.; WAEBER, M.L.T.; TOEPPERWIEN, S.; TOWN, R.M.; WENG, L.; XUE, H. Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by in situ techniques. **Environmental Science e Technology**, v. 40, p. 1943-1949, 2006.

WASTRAS, C.J.; BACK, R.C.; HALVORSEN, S.; HUDSON, R.J.M.; MORRISON, W.S.P. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. **The Science of the Total Environment**, v. 219, p. 183-208, 1998.

van HULLEBUSCH, E.; CHATENET, P.; DELUCHAT, V.; CHAZAL, P.M.; FROISSARD, D.; BOTINEAU, M.; GHESTEM, A.; BAUDU, M. Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (St. Germain Les Belles, France). **Water, Air, Soil Pollution**, v. 150, p. 3-9, 2003.

van LEEUWEN, H. P. , TOWN, R., BUFFLE, J., CLEVEN, R. M. J., DAVISON, W.; PUY, J., van RIEMSDIJK, W., SIGG L. Dynamic speciation analysis and

bioavailability of metals in aquatic systems. **Environmental Science e Technology**, v. 39, p. 22, 2005.

XUE, H.; OESTREICH, A.; KISTLER, D.; SIGG, L. Free cupric ion concentrations and Cu complexation in selected Swiss lakes and rivers. **Aquatic Sciences**, v. 58, p. 69-87, 2004.

Efeito da degradação bacteriana sobre a fluorescência da matéria orgânica dissolvida
natural

RESUMO

A matéria orgânica dissolvida (MOD) natural é importante em ambientes aquáticos. Seu fluxo nas cadeias tróficas é dependente das características físicas e químicas de suas moléculas constituintes. Sua concentração nos ecossistemas é dependente das taxas de entrada e de sua degradação por organismos heterotróficos, além da degradação fotoquímica. Esta pesquisa avaliou a degradação da MOD natural (substância húmica) por bactérias heterotróficas. A espectroscopia de fluorescência (espectros de emissão e excitação sincronizada) foi utilizada para a caracterização da MOD e acompanhamento do processo de degradação. Em experimentos contendo uma solução de 15 mg.L^{-1} de MOD natural, foi inoculada uma população natural de bactérias e, em intervalos de tempo regulares (0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h), as amostras foram retiradas para o acompanhamento do crescimento das bactérias, através de absorbância (540 nm), e caracterização fluorimétrica da MOD. Os resultados demonstraram que as bactérias cresceram durante o tempo de incubação e usaram a MOD como substrato, fato este comprovado através das mudanças na intensidade de fluorescência e deslocamento dos máximos de emissão.

INTRODUÇÃO

Nos ambientes aquáticos há dois tipos principais de matéria orgânica natural: biomassa e matéria abiótica (Wetzel, 2001). Dentre a matéria a biótica estão compreendidas a matéria orgânica particulada (MOP) e a matéria orgânica dissolvida (MOD) (Müster e Chróst, 1990), as quais servem como recurso alimentar e energia para os organismos dos ambientes aquáticos (Pomeroy, 1984). A MOD é a fração predominante da matéria orgânica total presente nesses ambientes (Müster e Chróst, 1990), podendo ter origem de recursos alóctones e/ou autóctones. É formada por uma mistura complexa de compostos orgânicos, cada qual com uma composição elementar, massa molecular e propriedades físicas e químicas únicas (Perdue e Ritchie, 2003). A MOD natural dos ecossistemas aquáticos inclui aminoácidos livres, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos carboxílicos, ácidos nucleicos e substâncias húmicas (Thomas, 1997).

O fluxo de matéria orgânica em lagos é dominado pela sua produção fotossintética e subsequente transformação e decomposição por organismos heterotróficos (Azam, 1983). De 10 a 50 % do carbono orgânico fotossintético é transformado em biomassa bacteriana (Larsson e Hagström, 1982, Sondergaard *et al.*, 1988), canalizado para a cadeia alimentar denominada alça microbiana e, posteriormente, transferido para níveis tróficos superiores. Assim, há evidências de que, em ambientes aquáticos, as bactérias podem ocupar o primeiro nível trófico (Overbeck, 1975; Azam, 1983).

Devido ao fato de a MOD ser um importante recurso para as bactérias heterotróficas, esses organismos são dependentes tanto da sua composição quanto de sua quantidade (Chróst *et al.*, 1989). Segundo Müster e Chróst (1990), há três teorias tróficas sobre a utilização da MOD por bactérias heterotróficas: (a) a primeira relata que

parte da MOD capturada é rapidamente utilizada e resulta em um aumento da taxa de crescimento e biomassa bacteriana (a MOD é usada como substrato para a produção secundária bacteriana); (b) a segunda propõe que a MOD é utilizada em taxas baixas e é suficiente somente para manter a sobrevivência das bactérias (isso decorre do baixo grau de assimilação das estruturas poliméricas pelas bactérias ou ainda pela baixa produção de substratos orgânicos pelas bactérias); (c) a terceira teoria propõe que alguns compostos orgânicos não podem ser utilizados sozinhos para a produção e manutenção das bactérias, necessitando de outros para serem metabolizados.

Uma vez que a ciclagem da MOD via bactérias é regulada por sua qualidade e quantidade (Kirchman *et al.*, 2001; Pullin *et al.*, 2004), a forma química da MOD influencia seu destino e a taxa na qual é consumida e transformada dentro de uma cadeia trófica (Carlson *et al.*, 1998). Os estudos das características bioquímicas da MOD são complexos devido às dificuldades em se concentrar a MOD para análises e facilidade de contaminação das amostras (Mopper *et al.*, 1996). No entanto, as propriedades ópticas da MOD, como sua fluorescência, podem fornecer informações significativas sobre sua composição em concentrações naturais. Sem a necessidade de concentração do material, há uma redução significativa dos riscos de contaminação da amostra. A espectroscopia de fluorescência na modalidade excitação sincronizada é particularmente sensível e pode ser usada em estudos de fracionamento ou degradação da MOD (Mayer *et al.*, 1999). Na espectroscopia de fluorescência, alterações do comprimento de onda de máxima emissão são devidas tanto à presença de diferentes constituintes, como também à diferentes origens. Assim, a fluorescência da MOD pode ser usada como um traçador entre ecossistemas diferentes, distinguindo MOD de origens distintas (Lombardi e Jardim, 1999; McKnight *et al.*, 2001; Sierra *et al.*, 2005).

Devido à grande importância ambiental da MOD nos ecossistemas aquáticos, estudos que visam o entendimento da interação MOD-organismo-ambiente fornecem informações importantes para o conhecimento e gerenciamento de ecossistemas aquáticos, principalmente no que se refere a dinâmica de metais traços.

OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi demonstrar a utilização da MOD por bactérias heterotróficas utilizando-se a fluorescência de emissão e excitação sincronizada antes e após o contato da MOD com as bactérias.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL

Os experimentos de laboratório foram conduzidos utilizando-se matéria orgânica dissolvida natural em uma concentração de 15 mg L^{-1} . O material orgânico (Suwannee River NOM – RO isolation) foi adquirido através da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). De acordo com a IHSS, a composição elementar da matéria orgânica dissolvida natural, assim como seus grupos funcionais ácidos, estão presentes nas seguintes proporções: 52,47% de carbono, 4,19% de hidrogênio, 42,69% de oxigênio, 1,10% de nitrogênio, 0,65% de enxofre e 0,02% de fósforo. Segundo Thurman (1985), em águas continentais, a concentração de MOD encontra-se em um limite entre $1 - 15 \text{ mg C.L}^{-1}$, sendo que concentrações de MOD na faixa de $10 - 15 \text{ mg.L}^{-1}$ são características de ambientes eutrofizados.

2. CRESCIMENTO POPULACIONAL BACTERIANO

Os experimentos foram efetuados utilizando-se água reconstituída (APHA, 1998), tendo como base água bi-destilada em vidro. A água foi autoclavada a 120 °C por 30 min. para esterilização e, posteriormente, foi adicionada a matéria orgânica dissolvida natural em uma concentração de 15 mg.L⁻¹.

Para o inóculo da bactéria, foi coletada água do ambiente natural (Reservatório do Monjolinho) em três réplicas de 500 mL. Esta foi primeiramente filtrada em filtro GF\C (Whatman) para retirada de predadores e, posteriormente, filtrada em filtros com poros de 0,2 µm (Gelman GA-8) para retenção das bactérias. O filtro com a população bacteriana foi inoculado em água reconstituída (500 mL) contendo a matéria orgânica natural (15 mg.L⁻¹). Durante o experimento, a comunidade bacterioplanctônica foi mantida em sala com temperatura controlada de 25 °C ± 2, no escuro e sob agitação constante (60 – 100 rpm) (Tranvik e Sieburth, 1989) em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109, Brasil).

O crescimento populacional bacteriano foi acompanhado através da determinação da turbidez da amostra em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 540 nm. Para tanto, em tempos distintos de incubação (0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h), foram retiradas alíquotas de 5 mL, homogeneizadas e analisadas no espectrofotômetro. Como a solução de MOD apresenta coloração ligeiramente amarelada, foi realizada uma varredura para a escolha do comprimento de onda na qual a interferência da MOD fosse minimizada durante as leituras de absorvância para a quantificação do crescimento populacional bacteriano. Além disso, uma solução de MOD (10 mg.L⁻¹) sem bactéria foi usada para calibrar o espectrofotômetro.

Durante o período de incubação, toda manipulação das amostras foi realizada em fluxo laminar (Pachane, Brasil) dotado de luz ultravioleta para minimizar contaminações.

3. UTILIZAÇÃO DA MOD PELA POPULAÇÃO BACTERIANA

Para acompanhar a degradação bacteriana da MOD, determinações através de espectroscopia de fluorescência foram realizadas durante o período experimental. Para tanto, utilizou-se um espectrofluorímetro (Jasco 6500) dotado de lâmpada de xenônio de 150 W para excitação da amostra. Monocromadores foram usados para seleção do comprimento de onda de emissão e de excitação, sendo que os comprimentos de 5 nm e 10 nm foram escolhidos para emissão e excitação, respectivamente.

O espectro de emissão é produzido através do registro da intensidade de luz emitida em função de seu comprimento de onda, com excitação realizada em um comprimento de onda fixo. Neste trabalho, os espectros de emissão foram registrados em uma amplitude de comprimento de onda entre 370 nm a 600 nm para excitação fixa em 350 nm, e amplitude de registro de emissão de 470 nm a 600 nm para excitação fixa em 450 nm.

O espectro de excitação sincronizada é uma combinação dos espectros de excitação e emissão, resultando em um espectro mais estruturado. A varredura simultânea da excitação e emissão foi realizada em uma amplitude de comprimento de onda de 300 a 600 nm. A diferença entre os comprimentos de onda de excitação e emissão ($\delta = 18$ nm) foi mantida constante. Todo o procedimento experimental utilizado para as determinações de fluorescência encontra-se descritos em Lombardi e Jardim (1997, 1999).

Os comprimentos de onda usados neste trabalho para caracterizar a matéria orgânica dissolvida natural durante o processo de degradação são típicos de estudos de fluorescência de substâncias húmicas (Lombardi e Jardim,1999; Belzile, 2006; Misic, 2006).

Alíquotas de 5 mL foram retiradas das culturas em períodos de tempo regulares (0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) e filtradas em membranas de 0,2 μm (Gelman GA-8). Uma vez que o pH influencia na fluorescência da MOD (Saadi *et al.*, 2006), este foi monitorado durante o experimento e permaneceu constante entre 6,7-7,0. De acordo com Pegau *et al.* (1997), a absorção de luz por soluções aquosas é dependente da temperatura, assim tomou-se o cuidado de aclimatar as amostras com a temperatura da sala (19 °C) onde a fluorescência foi detectada. O experimento foi realizado com três réplicas. A estabilidade e perfeito funcionamento do espectrofluorímetro foi verificada a cada dia de leitura através do pico Raman utilizando-se água deionizada.

A calibração do espectrofluorímetro foi realizada através da emissão de fluorescência dos espectros sincronizado (Fig. 01) e de emissão (Fig. 02), este com λ_{ex} fixo em 350 nm e λ_{em} 450 nm utilizando-se concentrações de carbono orgânico dissolvido referentes às concentrações de MOD de 5, 10, 15 e 20 mg.L^{-1} (Fig. 03). O carbono orgânico total dissolvido foi determinado nas amostras da calibração após terem sido filtradas em membranas de 0,2 μm de abertura de poro (Gelman GA-8) e guardadas em frascos de vidro lavados em ácido clorídrico a 20% e deixados em mufla por 2h a 550 °C para eliminar qualquer contaminação por matéria orgânica. As determinações foram realizadas utilizando-se um analisador de carbono (TOC-5000 Shimadzu - Japão).

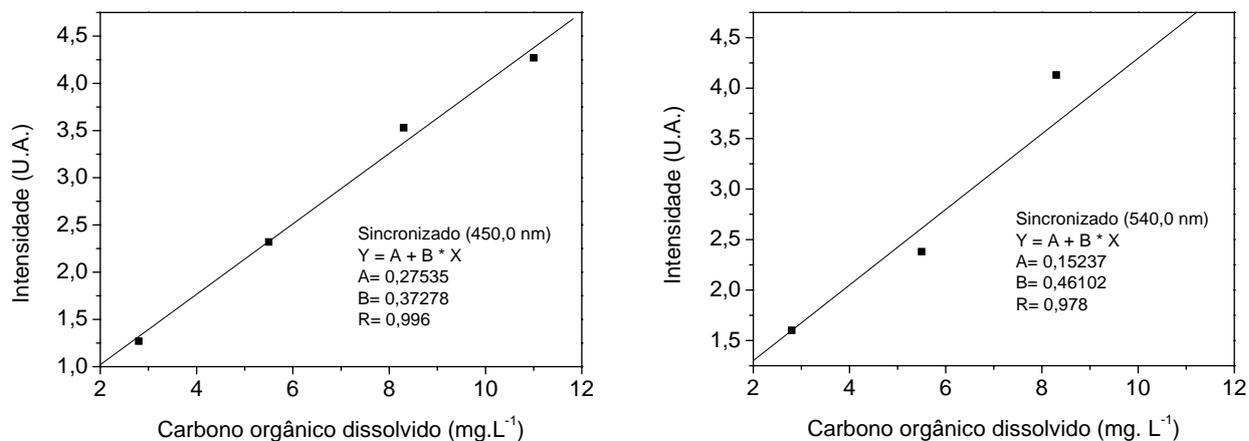


Figura 01- Calibração do espectrofluorímetro entre as concentrações do carbono orgânico dissolvido e a intensidade de fluorescência do espectro sincronizado para os picos detectados em 450,0 nm e 540,0 nm.

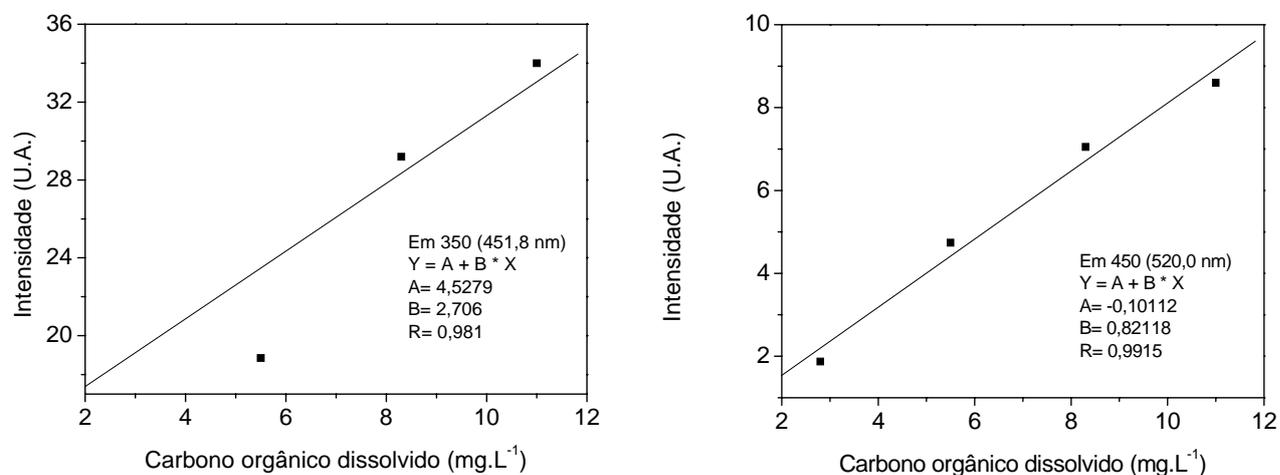


Figura 02- Calibração do espectrofluorímetro entre as concentrações do carbono orgânico dissolvido e a intensidade de fluorescência dos espectros de emissão excitados em 350 nm e 450 nm com máximos de emissão detectados em 451,8 nm e 520,0 nm, respectivamente.

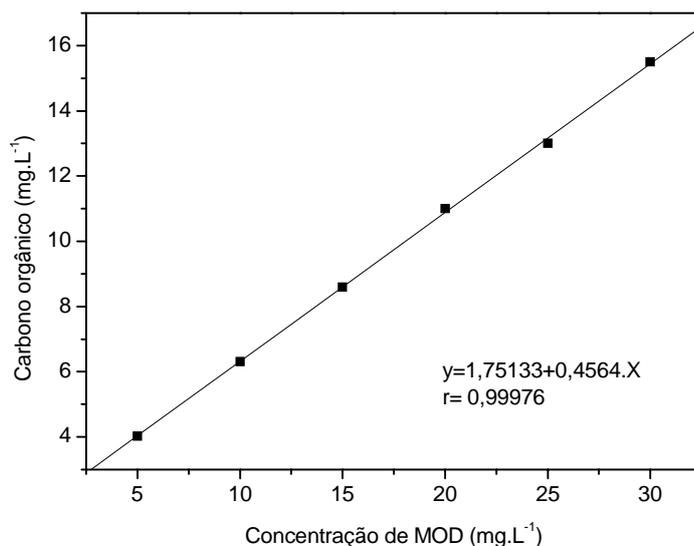


Figura 03- Reta proveniente da regressão linear onde o carbono orgânico (mg. L⁻¹) foi plotado em função da concentração nominal de MOD (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg. L⁻¹).

RESULTADOS

O aumento da população bacteriana pode ser visualizado na figura 04. Pode-se perceber que ocorreu um crescimento em 24 h de incubação, seguido de uma estabilização (24-72 h) e, após esse tempo, as bactérias voltaram a apresentar crescimento (72-168 h).

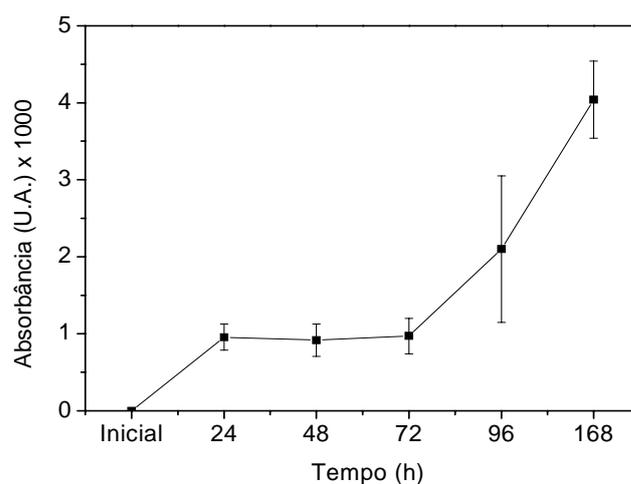


Figura 04- Aumento populacional bacteriano detectado através de absorvância (540 nm) em função do tempo.

A caracterização da degradação da MOD pode ser visualizada na figura 05 através dos espectros sincronizado e de emissão nos tempos inicial, 24 h e 168 h.

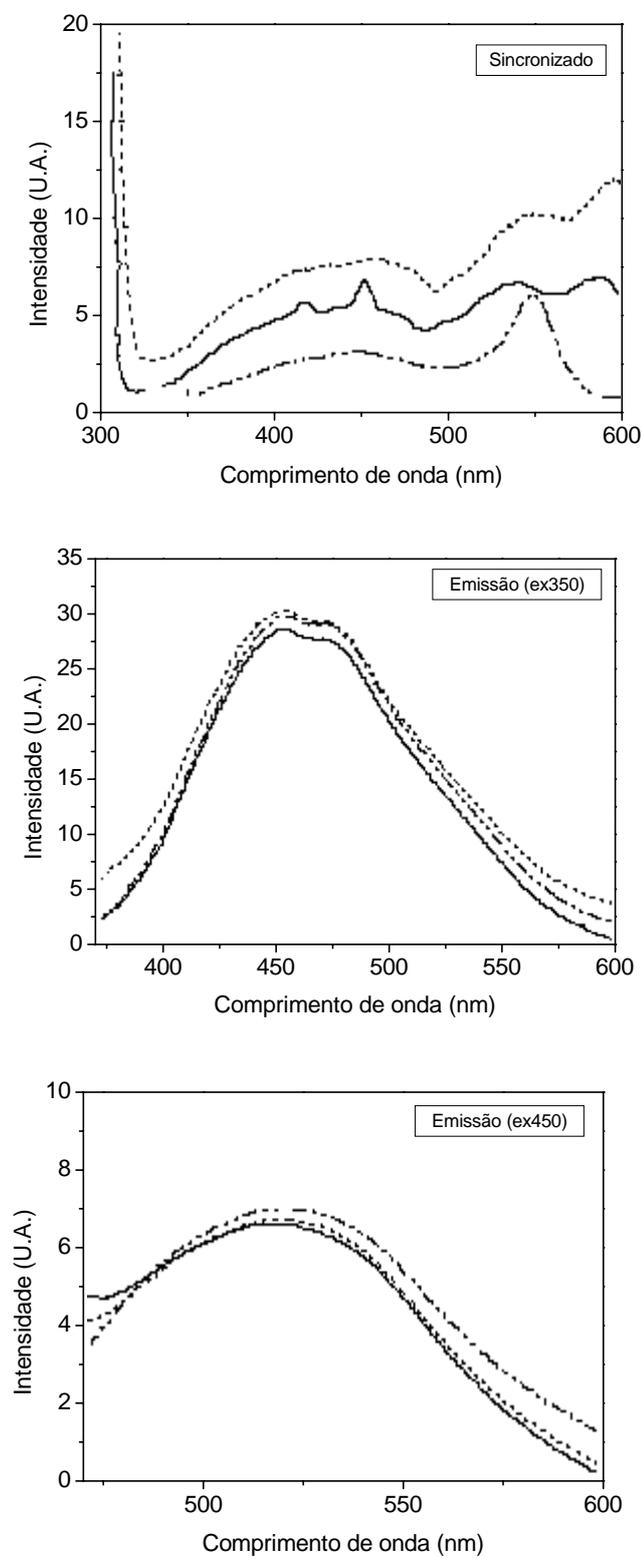


Figura 05- Espectros sincronizado e de emissão com excitação a 350 nm e 450 nm, detectados nos tempos (---) Inicial, (___) 24 h, e (.....) 168 h durante a degradação bacteriana sobre a MOD.

Na tabela 01 apresenta-se a localização de todos os picos com suas respectivas intensidades de fluorescência. Deve ser considerado um deslocamento de ± 10 nm no comprimento de onda de máxima emissão dos picos como erro de leitura para amostras de MOD.

Tabela 01- Valores de comprimento de onda (nm) e intensidade (I) de fluorescência (U.A) dos espectros sincronizado e emissão (λ_{ex} 350 e λ_{ex} 450) durante a degradação da MOD em cada tempo (t) experimental amostrado. Os valores representam a média e desvio padrão de três replicas. Os valores destacados em negrito representam os picos que apareceram durante a incubação. ^{a)} pico e intensidade encontrados somente na réplica A, ^{b)} pico e intensidade encontrados somente na réplica B, ^{c)} pico e intensidade encontrados somente na réplica C.

	t 0		t 24 h		t 48 h		t 72 h		t 96 h		t 168 h	
	nm	I (U.A)	nm	I (U.A)	nm	I (U.A)	nm	I (U.A)	nm	I (U.A)	nm	I (U.A)
Sincronizado			417,9^b	5,85^b			329,5^b	1,81^b	426,1^c	5,56^c		
	450,3	3,53	450,9	7,31	450,2	5,80	447,8	5,76	451,2^b	5,66^b	427,5^a	6,76^a
	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 2,3$	$\pm 0,7$	$\pm 1,7$	$\pm 0,5$	$\pm 5,9$	$\pm 0,4$				
	548,1	7,12	465,0^a	7,92^a	540,4	7,11	539,7	6,93	497,1^a	6,50^a	450,9	7,28
	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$			$\pm 1,0$	$\pm 0,9$	$\pm 1,0$	$\pm 0,6$			$\pm 0,9$	$\pm 0,3$
			496,4^a	7,16^a	587,8	7,82	587,7	7,35	532,1	6,52	541,3	8,55
					$\pm 1,8$	$\pm 1,6$	$\pm 0,1$	$\pm 0,8$	$\pm 11,6$	$\pm 0,5$	$\pm 6,3$	$\pm 1,6$
			541,1	7,85								
			$\pm 0,4$	$\pm 1,8$								
			587,5	8,50					587,5	6,97	582,2	10,0
			$\pm 0,6$	$\pm 1,0$					$\pm 0,4$	$\pm 1,0$	$\pm 4,8$	$\pm 3,2$
Em (λ_{ex} 350)	451,8	29,18	451,3	26,69	451,5	27,44	451,5	28,52	451,4	28,18	451,1	31,0
	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,7$	$\pm 0,1$	$\pm 0,7$	$\pm 0,3$	$\pm 1,1$	$\pm 0,1$	$\pm 1,2$
	473	28,37	473	25,78	473	26,42	473	27,46	473	27,10	473	28,97
	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,6$	$\pm 0,0$	$\pm 0,6$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$
											499,9 ^b	31,06 ^b
Em (λ_{ex} 450)	520,6 \pm	7,05	521,8 \pm	6,59	518,2 \pm	6,64	517,8 \pm	6,80	518,5	6,45	518,1 \pm	7,23 \pm 0,2
	0,0	$\pm 0,0$	7,5	$\pm 0,1$	0,5	$\pm 0,2$	3,8	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,3$	0,8	0,39 ^c

Em relação ao espectro sincronizado, pode-se observar a existência de dois picos localizados em 450,0 (Intensidade = 3,53 A.U.) e 548,0 nm (Intensidade = 7,12 U.A.). Esses picos se mantiveram durante todo o experimento. No entanto, um aumento na intensidade de fluorescência ao final da incubação foi observado nos dois picos, sendo mais pronunciada no pico localizado em 450,0 nm (Intensidade = 7,28). À partir de 24 h de incubação houve o aparecimento de um pico localizado em 587,5 nm (Intensidade = 8,5) em todas as réplicas experimentais, o qual permaneceu com intensidade praticamente constante durante 96 h de incubação. Em 168 h, esse pico teve sua intensidade aumentada (Intensidade = 10).

Durante o período experimental, alguns picos apareceram somente em uma das réplicas experimentais. Para a réplica A, esses picos se localizaram em 465,0 nm em 24 h, 496,0 nm em 24 h e 96 h, 427,5 nm em 168 h. Para réplica B, os picos foram encontrados em 417,9 nm em 24 h, 329,5 nm em 72 h. Na réplica C, o pico foi encontrado em 426,0 nm em 96 h.

Nos espectros de emissão excitados em 350 nm e 450 nm, os picos não apresentaram deslocamento em relação ao comprimento de onda durante a incubação. A intensidade de fluorescência teve uma diminuição ao início da incubação (24 h), após a qual permaneceu constante, até que em 168 h a intensidade de fluorescência atingiu valores pouco superiores em relação ao inicial. Exceção ocorreu na réplica C, onde a intensidade chegou próxima de zero em 168 h de incubação no espectro de emissão excitado em 450 nm. Na réplica B, houve o desaparecimento do pico localizado em 473 nm detectado no espectro de emissão com λ_{ex} fixo em 350 nm. Novo pico surgiu no mesmo espectro, em 499,9 nm.

DISCUSSÃO

O crescimento populacional bacteriano observado na figura 04 sugere que a população bacteriana utilizou a MOD como recurso de carbono, apesar desta ser considerada de difícil degradação. Estudos em ambientes aquáticos relacionados à dinâmica da MOD são unânimes em concluir que a MOD lábil é mais importante que a refratária para sustentar a produção bacteriana (Moran e Hodson, 1990; Ellis *et al.*, 2000). De acordo com Moran e Hodson (1990), a fração lábil da MOD suporta quatro vezes mais a produção secundária das bactérias do que as substâncias húmicas do mesmo ambiente. Ainda, Ellis *et al.* (2000) mostraram que o crescimento microbiano foi menor utilizando-se ácido húmico em relação a aminoácidos e carboidratos. No entanto, Tranvik e Sieburth (1989) demonstraram que as substâncias húmicas podem ser degradadas pela população bacteriana. Estudos recentes que combinam análises moleculares de comunidades microbianas com a caracterização da MOD chamaram a atenção para generalização dos pesquisadores em relação aos microorganismos que predominantemente metabolizam a fração lábil da MOD (Wehr *et al.*, 1999; Eiler *et al.*, 2003; Docherty *et al.*, 2006). De acordo com Eiler *et al.* (2003), o peso molecular da MOD pode ter menos relação com a produtividade do que a capacidade metabólica da comunidade bacteriana. Esses autores verificaram que o crescimento da população bacteriana em lagos húmicos foi limitado pela concentração da MOD e não por sua massa molecular. Adicionalmente, Wehr *et al.* (1999) ao estudarem o metabolismo bacteriano observaram que as comunidades microbianas se diferenciavam em relação às diferentes concentrações de carbono. Docherty *et al.* (2006) verificaram uma grande interação entre concentração e composição química da MOD e a composição e atividade da comunidade bacteriana. Esses autores, ao acompanharem a biodegradação de MOD de várias massas moleculares, concluíram que as comunidades microbianas crescem

sobre uma variedade de MOD possuindo versatilidade no ajuste ao novo recurso de carbono do ambiente. Além disso, esses autores demonstraram que as bactérias consomem MOD de alta massa molecular, geralmente consideradas refratárias. Assim, a MOD pode ser considerada como um importante recurso em ecossistemas aquáticos.

Devido à sua importância ambiental, cresce a necessidade de caracterização da MOD. Assim, muitas análises químicas e físicas (ex: absorção de luz, concentração de carbono orgânico, aromaticidade, fluorescência, fracionamento e massa molecular, dentre outros) estão sendo utilizadas para esse fim. Na MOD estão incluídas moléculas orgânicas com cromóforos (absorvem luz) e fluoróforos (emitem luz), de modo que a espectroscopia de fluorescência tem sido usada como recurso para investigar a composição química da MOD devido à sua habilidade em distinguir diferenças estruturais na MOD, ser uma técnica não destrutiva e limpa (não há necessidade de pré-concentração da amostra) (Lombardi, 1995). Essa técnica possui alta resolução óptica (Baker, 2001), onde a fluorescência em diferentes regiões espectrais está associada com diferentes tipos de grupos funcionais (Sharpless *et al.*, 1999).

Os resultados desta pesquisa concordam com outros da literatura (Lombardi, 1995; Hayakawa *et al.*, 2003) que mostram a existência de linearidade entre a intensidade de emissão de fluorescência e a concentração de carbono orgânico dissolvido. Destes resultados, conclui-se que há uma relação diretamente proporcional entre fluoróforos e carbono orgânico na MOD.

Os grupos de fluorescência contidos na MOD são representados pelos ácidos fúlvicos, húmicos e proteínas (Senesi *et al.*, 1991; Yamashita e Tanoue, 2003, Leenheer e Croué, 2003). De acordo com a classificação de Leenheer e Croué (2003), a fluorescência entre 420-480 nm/300-350 nm e 380-480/250-260 nm ($\lambda_{em}/\lambda_{ex}$) está associada com material húmico, enquanto que a fluorescência compreendida entre os

comprimentos de onda de 300-350 nm/ 270-280 nm ($\lambda_{em}/\lambda_{ex}$) está relacionada com a presença de proteínas na estrutura da MOD. Outros estudos também demonstram que os picos de fluorescência na faixa entre $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 340–350 nm/420–450 nm de lagos e rios são devidos às substâncias húmicas (Senesi *et al.* 1991; Coble 1996, Suzuki *et al.* 1998, Yoshioka *et al.*, 2002). Esses picos são similares aos encontrados neste trabalho, indicando a natureza húmica da MOD usada.

O surgimento de novos máximos de emissão de fluorescência durante a degradação microbiana da MOD, assim como as diferenças em suas intensidades são o resultado da modificação na estrutura e composição da matéria orgânica dissolvida pelas bactérias. Como na MOD há uma grande variedade de fluoróforos, cujos sinais fluorimétricos se sobrepõem, mediante o processo de degradação, fluoróforos distintos são degradados e assim, outros fluoróforos que já estavam presentes na MOD passam a ser detectados. Este processo é análogo àquele observado através da complexação diferencial com metais paramagnéticos (Lombardi e Jardim, 1997).

A variação na intensidade de fluorescência dos picos de emissão da MOD durante o processo de degradação observado neste estudo está de acordo com outros da literatura. De modo similar, Saadi *et al.* (2006), ao estudarem a biodegradação da MOD de um efluente, verificaram que a intensidade de fluorescência mudou durante a biodegradação, no entanto os picos permaneceram estáveis no mesmo comprimento de onda. Esses autores concluíram que a redução da fluorescência é uma indicação, ou da degradação do material fluorescente, ou do aparecimento de novas moléculas orgânicas. Estas seriam formadas através do processo de degradação e capazes de diminuir o sinal de fluorescência da MOD. Assim, a degradação bacteriana da MOD pode resultar em aumento da fluorescência, através da formação de novo material fluorescente ou ainda

através da degradação de grupos e/ou elementos químicos que ocasionavam redução do sinal fluorescente.

Outros autores também verificaram mudanças nos espectros de fluorescência da MOD devido à sua biodegradação (Mayer *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2001; Misic *et al.*, 2006). Mayer *et al.* (1999) comprovou a utilização da MOD por atividade heterotrófica através do sinal fluorescente, verificando a liberação de moléculas de proteínas durante a biodegradação. Ainda, de acordo com Misic *et al.* (2002), a lise de proteínas através da enzima bacteriana, leucina aminopeptidase, contribui para a liberação de aminoácidos da molécula orgânica. Similar aos nossos resultados, Misic *et al.* (2006) mostraram, através da variação na fluorescência da MOD, que bactérias da Antártica (Terra Nova), foram capazes de capturar e degradar a MOD. Esses autores demonstraram que a maior parte do desaparecimento da MOD fluorescente ocorreu devido ao ataque microbiano, e que somente 7% do desaparecimento da MOD foi devido à fotodegradação. Ogawa *et al.* (2001) reportaram sobre a produção de MOD refratária a partir de compostos lábeis, como glicose e glutamato, por bactérias marinhas. Os autores chamam a atenção ao fato de que um aumento parcial da fluorescência associada com a formação de nova MOD pode ser mascarado pela degradação de outros constituintes fluorescentes.

Assim, através dos resultados deste trabalho, pode-se concluir que as bactérias heterotróficas possuem habilidade em usar a matéria orgânica dissolvida natural de origem mais refratária como substrato alimentar, influenciando na dinâmica de carbono, micronutrientes e poluentes associados à este tipo de MOD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for the examination of water and waste water**, 2. ed., Washington: APHA ,1995. 1268pp.

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J.G.; GRAY, J.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257-263, 1983.

BAKER, A. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, n. 5, p. 948-953, 2001.

BELZILE, C.; ROESLER, C.; CHRISTENSEN, J.P.; SHAKHOVA, N.; SEMILETOV, I. Fluorescence measured using the WETStar DOM fluorometer as a proxy for dissolved matter absorption. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 67, p. 441-449, 2006.

CARLSON, C.A.; DUCKLOW, H.W.; HANSELL, D.A.; SMITH, W.O. Organic carbon partitioning during spring phytoplankton blooms in the Ross Sea polynya and the Sargasso Sea. **Limnology and Oceanography**, v. 43, p. 375-386, 1998.

CHRÓST, R.J.; MÜNSTER, U.; RAI, H.; ALBRECHT, D.; WITZEL, K.P.; OVERBECK, J. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of eutrophic lake. **Journal of Plankton Research**, v. 11, p. 95-112, 1989.

COBLE, P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation–emission matrix spectroscopy. **Mar. Chem.**, v. 51, p. 325–346, 1996.

DOCHERTY, K. M.; YOUNG, K. C.; MAURICE, P. A.; BRIDGHAM, S.D. Dissolved organic matter concentration and quality influences upon structure and function of freshwater microbial communities. **Microbial Ecology**, V. 52, p. 378–388, 2006.

EILER, A.; LANGENHEDER, S.; BERTILSSON, S.; TRANVIK, L.J. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. **Apply Environmental Microbiology** , v. 69, n. 7, p. 3701–3709, 2003

ELLIS, B.D.; BUTTERFIELD, P.; JONES, W.L.; MCFETERS, G.A.; CAMPER, A.K. Effects of carbon source, carbon concentration, and chlorination on growth related parameters of heterotrophic biofilm bacteria. **Microbial Ecology**, v. 38, p. 330–347, 2000.

HAYAKAWA, K.; SEKINO, T.; YOSHIOKA, T.; MARUO, M.; KUMAGAI, M. Dissolved organic carbon and fluorescence in Lake Hovsgol: factors reducing humic content of the lake water. **Limnology**, v. 4, p. 25–33, 2003.

KIRCHMAN, D.L.; MEON B.; DUCKLOW, H.W.; CARLSON, C.A.; HANSELL, D.A.; STEWARD, G. Glucose fluxes and concentrations of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in the Ross Sea and Polar Front Zone, Antarctica. **Deep-Sea Research Part II**, v. 48, p. 4179-4197, 2001.

LARSSON, U.; HAGSTRÖM, A. Fractionated phytoplankton primary production, exudates release, and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. **Marine Biology**, v. 67, p. 57-70, 1982.

LEENHEER, J.A.; CROUE', J.-P. Characterizing dissolved aquatic organic matter. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 19A–26A, 2003.

LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W.F. Synchronous-scan fluorescence and the complexation of copper (II) ion humic substances. **J. Braz. Soc.**, v. 8, p. 339-342, 1997.

LOMBARDI A.T.; JARDIM W.F. Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic materials. **Water Research**, v. 33, p. 512-520, 1999.

MAYER, L.M.; SCHICK, L.L; LODER, T.C. Dissolved protein fluorescence in two main estuaries. **Marine Chemistry**. V. 64, p. 171-179, 1999.

McKNIGHT, D.; BOYER, E.; WESTERHOFF, P.; DORAN, P.; KULBE, T.; ANDERSEN D. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. **Limnology and Oceanography**, v. 46, p. 38-48, 2001.

MISIC, C.; POVERO, P.; FABIANO, F. Ectoenzymatic ratios in relation to particulate organic matter distribution (Ross Sea, Antarctica). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 224-234, 2002.

MISIC, C.; CASTELLANO, M.; RUGGIERI, N.; POVERO, P. Dissolved organic matter characterisation and temporal trends in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 70, p. 405-414, 2006.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C.A. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. **Mar. Chem.**, v. 41, p. 229-238, 1993.

MOPPER, K.; FENG, Z.M.; BENTJEN, S.B.; CHEN, R.F. Effects of cross-flow filtration on the absorption and fluorescence properties of seawater. **Marine Chemistry**, v. 55, p. 53-74, 1996.

MORAN, M.A.; HODSON, R.E. Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon. **Limnol. Oceanogr.**, v. 35, n. 8, p. 1744–1756, 1990.

MÜNSTER, U.; CHRÓST, R.J. (Ed.) Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: **Aquatic microbial Ecology: biochemical and molecular approaches**. Ann Arbor, Michigan: Science Tech Publishers; Springer-Verlag Inc., 1990. p. 2-46.

OGAWA, H.; AMAGAI, Y.; KOIKE I.; KAISER, K.; BENNER, R. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. **Science**, v. 292, p. 917-920, 2001.

OVERBECK, J. Distribution pattern of uptake kinetic responses in a stratified eutrophic lake. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, Verhandlungen**, v. 19, p. 2600-2615, 1975.

PEGAU, W.S.; GRAY, D.; ZANEVELD, J.R.V. Absorption and attenuation of visible and near-infrared light in water: dependence on temperature and salinity. **Applied Optics**, v. 36, p. 6035-6046, 1997.

PERDUE, E.M.; RITCHIE, J.D. Dissolved organic matter in fresh waters. In: H.D. HOLLAND; K.K. TUREKIAN (ed.) **Surface and ground water, weathering, erosion and soils** Oxford: Elsevier-Pergamon, 2003, p. 273-318.

POMEROY, L.R.; WIEBE, W.J. Energies of microbial food webs. **Hydrobiologia**, v. 159, p. 7-19, 1989.

PULLIN, M.J.; BERTILSSON, S.; GOLDSTONE, J.V.; VOLKER, B.M. Effects of sunlight and hydroxyl radical on dissolved organic matter: bacterial growth efficiency and production of carboxylic acids and other substrates. **Limnology and Oceanography**, v. 49, p. 2011-2022, 2004.

SAADI, I.; BORISOVER, M.; ARMON, R.; LAOR, Y. Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. **Chemosphere**, v. 63, p. 530-539, 2006.

SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiating, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Sci.**, v. 152, p. 259-271, 1991.

SHARPLESS, C.M.; MCGOWN, L.B. Effects of aluminum-induced aggregation on the fluorescence of humic substances. **Environ. Sci. Technol.**, v. 33, n. 18, p. 3264-3270, 1999.

SIERRA, M.M.D.; GIOVANELA, M.; PARLANTI, E.; SORIANO-SIERRA, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. **Chemosphere**, v. 58, p. 715-733, 2005.

SONDERGAARD, M.; REIMANN, B.; MOLLER, J.L.; JORGENSEN, N.O.G.; BJORNSEN, P.K.; OLSEN, M.; LARSEN, J.B.; GEERTZ-HENSEN, O.; HANSEN, J. .K., JESPERSEN, A.M.; ANDERSON, F.; BOSSELMAN, S. Pelagic food web process in an oligotrophic lake. **Hydrobiologia**, v. 164, p. 271-286, 1988.

SUZUKI, Y.; NAKAGUCHI, Y.; HIRAKI, K.; NAGAO, S.; KUDO, M.; KIMURA, M. Characteristics of the fluorescent substances in the Yodo River system by three-dimensional excitation emission matrix spectroscopy (In Japanese). **Geochemistry**, v. 32, p. 21-30, 1998.

THOMAS, J.D. (1997) The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 38, p. 1-36.

THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural matter**. . Dordrecht, The Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 1985.

TRANVIK, L.A.; SIEBEURTH, J. Effects of flocculated humic matter on free and attached pelagic microorganisms. **Limnology and Oceanograph**, v. 34, n. 4, p. 688-699, 1989.

YAMASHITA, Y.; TANOUE, E. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. **Mar. Chem.**, v. 82, p. 255-271, 2003.

YOSHIOKA, T.; UEDA, S.; KHODZHER, T.; BASHENKHAIEVA, N.; KOROVYAKAVA, I.; SOROKOVIKOVA, L.; GORBUNOVA, L. Distribution of dissolved organic carbon in Lake Baikal and its watershed. **Limnology**, v. 3, p. 159–168, 2002.

WEHR, J.D.; PETERSEN, J.; FINDLAY, S. Influence of three contrasting detrital carbon sources on planktonic bacterial metabolism in a mesotrophic lake. **Microb. Ecol.**, v. 37, p. 23–35, 1999.

WETZEL, R.G. **Limnology:** lake and river Ecosystems, 3. ed. San Diego: Academic Press, 2001.

Influência de microheterótrofos na dinâmica do cobre complexado à matéria orgânica
dissolvida (MOD)

RESUMO

A introdução de metais traços no ambiente aquático pode produzir modificações nas comunidades microbianas e em suas atividades. Por sua vez, essas modificações irão influenciar a dinâmica e destino desses elementos na cadeia trófica aquática. Sabe-se que uma considerável diversidade de bactérias heterotróficas possui mecanismos fisiológicos capazes de conferir resistência aos metais potencialmente tóxicos. Conseqüentemente, tais organismos suportam concentrações relativamente elevadas de metal no meio. Este estudo investigou a resposta de uma população natural de bactérias à contaminação por cobre. Inicialmente a tolerância bacteriana ao metal foi testada utilizando-se três concentrações de cobre (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol.L⁻¹). Posteriormente os organismos foram expostos a uma concentração de cobre total dissolvido de 10^{-6} mol.L⁻¹, e foi realizado um estudo de especiação do metal no meio (cobre total dissolvido e íons cobre livre) e da compartimentalização do cobre nas bactérias (cobre total internalizado ou absorvido e cobre total adsorvido) durante o crescimento dos microorganismos. Os resultados mostraram que as bactérias foram resistentes ao cobre em uma concentração de 10^{-6} mol.L⁻¹. Ainda, uma oscilação sincronizada entre cobre absorvido, adsorvido e cobre total dissolvido ocorreu durante o período de experimentação, sugerindo a existência de um mecanismo pelo qual a população bacteriana libera cobre ao meio externo, conferindo-lhe resistência ao metal.

INTRODUÇÃO

A concentração de metais no ambiente é decorrente de processos naturais e antrópicos. No entanto, são as atividades antrópicas, principalmente as industriais, que mais contribuem para o desequilíbrio desses elementos nos ecossistemas (Nriagu, 1990). O cobre, por exemplo, é um metal essencial à sobrevivência dos organismos, no entanto em altas concentrações pode causar danos à célula (Edding e Tala, 1996), desestabilizando comunidades biológicas (Hassen *et al.*, 1998).

Em ecossistemas aquáticos, as bactérias heterotróficas são fundamentais aos processos de regeneração de nutrientes e transferência trófica de carbono (Münster e Chróst, 1990; Twiss *et al.*, 1996), podendo afetar o destino de diversos elementos. No caso dos metais, esta influência ocorre principalmente devido aos processos de captura, e/ou liberação (Ford e Mitchell, 1990), o que pode afetar a distribuição desses elementos no ecossistema e conseqüentemente sua relação com o restante da biota. A partir dos mecanismos de defesa desses organismos, os metais podem ser acumulados ou disponibilizados novamente para o meio através de processos como o efluxo. Assim, através desses organismos os metais podem ser biodisponibilizados e biomagnificados ao longo da cadeia trófica (Mansouri-Aliabadi e Sharp, 1985; Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999; Miranda e Rojas, 2006; Worms *et al.*, 2006).

As bactérias heterotróficas são afetadas pela descarga de metais no ambiente tanto através do contato com a fração ligada do metal, como também ao metal livre e/ou lábil (Silver, 1996; Miranda e Rojas, 2006). Esta dupla exposição ocorre principalmente pela degradação de materiais orgânicos dissolvidos, normalmente agentes complexantes de metais e utilizados como fonte energética pelas bactérias (Sherr e Sherr, 1988; Azam *et al.*, 1983; Pomeroy, 1974; Silver e Phung, 2005), ou pela adsorção desses complexos em sua parede celular (Campbell *et al.*, 1997). Os metais traços e seus complexos

podem difundir-se do meio externo para a superfície dos organismos e, dada a natureza dinâmica dos complexos, estes podem sofrer associações e dissociações quando na superfície celular (Worms *et al.*, 2006).

A matéria orgânica dissolvida (MOD) é a fração predominante da matéria orgânica total presente em águas naturais (Azam *et al.*, 1983), podendo seqüestrar e/ou liberar íons para o ambiente (Lombardi e Jardim, 1997; Lombardi *et al.*, 1997; de Oliveira *et al.*, 1995), atuando de maneira diversificada e dinâmica sobre a especiação e conseqüentemente sobre a biodisponibilidade dos metais nos ecossistemas aquáticos (Lombardi *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2007).

Como conseqüência da exposição aos metais, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência, dentre elas pode-se citar o acúmulo intracelular de metal através do seu seqüestro por moléculas quelantes, impedindo-os de atingir sítios vitais, associação com a parede celular, mecanismos de volatilização do metal (Ford e Mitchell, 1990; Bosecker, 1997; Gordon *et al.*, 2000; Markwiese e Colberg, 2000), e ainda o efluxo de metal (Rosen, 1996; White *et al.*, 1997; Mirimanoff e Wilkinson, 2000; Franke *et al.*, 2003; Resing e Grass, 2003; Bertinato e Abbé, 2004).

Um estudo sobre a resistência de metais pesados em *Ralstonia metallidurans* (linhagem CH34) efetuado por Nies (2003) mostrou que o efluxo é um dos mecanismos utilizados por estas bactérias para conferir-lhes uma maior resistência aos metais. Várias pesquisas em nível molecular vêm sendo realizadas para esclarecimento dos mecanismos celulares que participam desse processo. Sabe-se que três famílias de proteínas atuam no mecanismo (Rosen, 1996; Grass e Resing, 2001; Resing *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2001; Nies, 2003; Kittleson *et al.*, 2006). São elas, (i) proteínas da superfamília RND, responsáveis pela resistência, nodulação e divisão celular e envolvidas no transporte de metais e compostos hidrofóbicos, (ii) proteínas de fusão de

membrana (MFB), também designadas como proteínas de efluxo periplasmático, e finalmente (iii) proteínas da membrana externa (OMF). Esses três grupos de proteínas fazem parte do sistema Cus que juntamente com proteínas do “tipo P” da família das ATPases (CopA e CopB) podem exportar os metais do citoplasma, da membrana citoplasmática ou do periplasma através da membrana externa do interior para o exterior da célula. No entanto, os mecanismos envolvendo o transporte de fora para dentro das células bacterianas não estão totalmente elucidados. Sabe-se somente que os metais dissolvidos no meio ligam-se às proteínas da membrana e são transportados para o interior das células, onde então se unem a diversos ligantes (Rainbow, 2002).

De acordo com Outten *et al.* (2001), o complexo Cus é induzido pela presença de cobre, onde em condições aeróbicas o sistema CueR (CuCFBA) entra em atuação juntamente com as proteínas CopA e CueO. A CueO é uma proteína oxidase localizada no periplasma. A proteína CopA transporta Cu^+ do citoplasma para o periplasma e, neste local o cobre reage com algumas moléculas para formar Cu^{2+} . A molécula que doou elétron para o cobre fica então danificada. Neste momento, a proteína CueO entra em ação, reduzindo e reparando a molécula danificada. Este processo é ilustrado na figura 01.

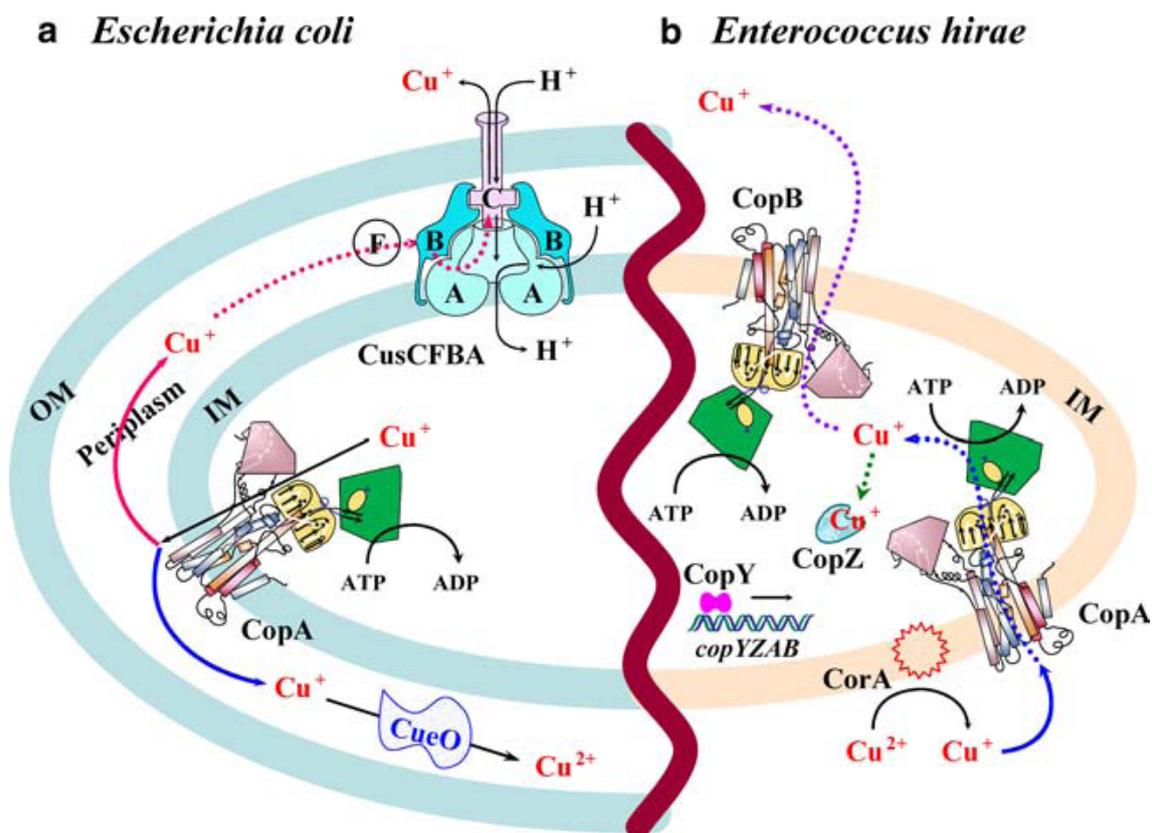


Figura 01 – Mecanismo de efluxo de cobre estudado em duas bactérias: *Escherichia coli* e *Enterococcus hirae*. Retirado de Silver e Phung (2005).

Os mecanismos envolvidos na resistência bacteriana apresentam grande importância ecológica e vários estudos em nível genético e de biologia celular têm sido desenvolvidos para elucidar os processos celulares envolvidos nessa resistência (Mirmanoff e Wilkinson 2000; Nies, 2003; Franke et al., 2003; Resing e Grass, 2003; Bertinato e Abbé, 2004, Silver e Phung, 2005). No entanto, estudos com enfoque sobre a dinâmica ambiental de metais resultante do metabolismo microbiano são raros (Mirmanoff e Wilkinson, 2000; Croot *et al.*, 2003).

Esta pesquisa se distingue por focar o metabolismo de uma população heterotrófica em relação ao ambiente externo, onde a única fonte de cobre é através do complexo MOD-Cu, mostrando a dinâmica desse elemento resultante da interação MOD-Cu-organismo.

OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a influência de uma população de bactérias sobre a dinâmica do cobre complexado à matéria orgânica dissolvida (MOD).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em água de cultivo preparada com água reconstituída (APHA, 1995) e autoclavada (120 °C, 30 min.). A esta água reconstituída foram acrescentados a matéria orgânica dissolvida (MOD - Suwannee River Natural Organic Matter) comercialmente disponível através da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas em uma concentração final de 10 mg.L⁻¹. A escolha da concentração de MOD baseou-se no fato de que de acordo com Thurman (1985), em águas continentais, a concentração de MOD encontra-se em um limite entre 1 - 15 mg C.L⁻¹, sendo que concentrações de MOD na faixa de 10 - 15 mg.L⁻¹ são características de ambientes eutrofizados. A solução de MOD empregada equivale a aproximadamente 7.0 mg.L⁻¹ de carbono orgânico total (TOC), determinada usando-se um analisador de carbono orgânico (TOC-5000 Analyzer, Shimadzu, Japan). Três réplicas experimentais foram realizadas e no presente trabalho, a água contendo a MOD será chamada de solução de trabalho.

A população bacteriana foi obtida através de filtração seqüencial de uma amostra de água coletada no Reservatório do Monjolinho. Para tanto, foram utilizados filtros previamente autoclavados (120 °C, 30 min.) e lavados em HNO₃ 1,0 mol.L⁻¹ por 24 h. Primeiramente a água foi filtrada em filtro GF\C com poros de 1,2 µm (Whatman) para remoção de predadores, e posteriormente filtrada em filtros com poro de 0,2 µm

(Gelman GA-8) para retenção das bactérias. Todo esse procedimento foi realizado em condições assépticas sob fluxo laminar, dotado de luz ultravioleta.

1. RESISTÊNCIA BACTERIANA AO COBRE

As concentrações de cobre nominais selecionadas (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol. L⁻¹) escolhidas para exposição das bactérias foram baseadas no teste de resistência bacteriana ao cobre por Thompson e Waltling (1983). Como efeito de toxicidade considerou-se a inibição do crescimento desses organismos (Mills, 2002) sob uma determinada concentração de cobre. O controle foi constituído da solução de trabalho sem adição de cobre. Todos os tratamentos foram realizados com três réplicas.

Análises de cobre total foram realizadas antes do inóculo de bactérias retirando-se 10 mL de amostra, a qual foi acidificada com HNO₃ (1 mol.L⁻¹) e posteriormente o cobre foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica em forno de grafite (VARIAN, Spectra A.A 220, Austrália).

Os filtros contendo a população bacteriana foram inoculados em frasco de policarbonato com capacidade de 1000 mL, contendo 200 mL da solução de trabalho e as concentrações variadas de cobre a partir de uma solução estoque de concentração 1 mg.mL⁻¹ (CuCl₂ Titrisol, Merck). Os frascos contendo a população bacterioplanctônica foram mantidos em sala com temperatura controlada de 25 °C ± 2, no escuro e sob agitação constante (60 – 100 rpm) (Tranvik e Sieburth, 1989) em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109, Brasil). O crescimento populacional bacteriano foi acompanhado diariamente através de leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) a 540 nm (Lores *et al.*, 1999).

Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar (Pachane, Brasil) dotado de luz ultravioleta para minimizar contaminações.

2. INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO BACTERIANA SOBRE A DINÂMICA DE COBRE

Após a filtração seqüencial, os filtros contendo a população bacteriana foram inoculados em frascos de polycarbonato com capacidade de 1000 mL contendo um volume de 700 mL de solução de trabalho e uma concentração total final de cobre de 10^{-6} mol.L⁻¹ (CuCl₂, Titrisol, Merck). Em seguida, os frascos experimentais foram colocados em mesa agitadora (60-100 rpm, Nova Ética, Brazil), em sala climatizada a uma temperatura de 25 °C ± 2 no escuro, seguindo o procedimento descrito em Tranvik e Sieburth (1989). Amostras foram retiradas em intervalos regulares de tempo: 0, 0,16 h, 0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h, para determinações da densidade bacteriana e das concentrações de cobre nas formas livre, cobre total dissolvido, cobre adsorvido na superfície da célula bacteriana e cobre total particulado.

O crescimento populacional bacteriano foi acompanhado através de leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) a 540 nm (Lores *et al.*, 1999). No entanto, para reportar as concentrações de cobre adsorvido e internalizado em número de células, estas foram contadas em microscópio de fluorescência seguindo a metodologia de Jones (1979). A preparação das lâminas foram feitas seguindo o protocolo sugerido por Porter e Feig (1980).

Para as determinações do cobre em suas várias formas, alíquotas de 50 mL foram filtradas em filtros de 0,2 µm (Gelman GA-8) previamente autoclavados (120 °C, 30 min.) e lavados com HNO₃ 1.0 mol.L⁻¹. Do filtrado foram separadas duas alíquotas: 10 mL foi acidificado com HNO₃ em concentração final de 2.0 mol.L⁻¹ para determinação de cobre total dissolvido e 40 mL teve sua força iônica ajustada para 0,1 mol.L⁻¹ com NaNO₃ e seguiu imediatamente para quantificação do cobre livre.

Para obtenção do cobre adsorvido na superfície celular, as células retidas durante o processo de filtração em cada tempo experimental foram ressuspendidas em 5 mL de solução quelante constituída de EDTA (etilenodiamina acida tetraacética) em concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0, por 30 s (Miramanoff e Wilkinson, 2000). Posteriormente o volume foi ajustado com água deionizada para 50 mL, onde a concentração final de EDTA foi de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. A amostra foi novamente filtrada em filtros de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro de poro (Gelman GA-8) previamente autoclavados ($120 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min.) e lavados com HNO_3 $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. O filtrado (solução quelante mais 45 mL de água deionizada) foi acidificado para uma concentração final de 2 mol.L^{-1} com HNO_3 . O filtro contendo as bactérias foi usado para determinação de cobre intracelular e submetido à digestão ácida adicionando-se sobre os mesmos 2 mL de HNO_3 concentrado, e posteriormente transferidos para uma estufa a 90°C , onde permaneceram por 48 h. Após a digestão, o volume da amostra foi ajustado para 50 mL com água deionizada. As concentrações de cobre total dissolvido e cobre intracelular foram determinadas através de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (AAS-GF) utilizando-se um equipamento Varian AA220, (Mulgrave, Vic., Australia).

O cobre livre foi determinado através da técnica de potenciometria, usando-se eletrodo seletivo ao íon cobre (ISE). O tempo de equilíbrio foi determinado de acordo com a resposta do eletrodo, que variou com a concentração do metal na amostra. Quanto menor a concentração de cobre, maior foi o tempo requerido para estabilização do eletrodo. O eletrodo seletivo ao íon cobre (ANALION) foi utilizado conjuntamente com um eletrodo de referência Ag/AgCl (ANALION) de dupla junção. A temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ foi mantida constante durante as leituras das amostras.

Para aumentar o limite de detecção do ISE, foi feito uso de tampões metálicos de modo que foi possível estender o limite de detecção do sistema para 10^{-12} mol.L⁻¹ de cobre livre. A metodologia seguiu procedimento descrito em Jardim *et al.* (1986) e modificado por Lombardi *et al.* (2007).

RESULTADOS

O teste de resistência bacterioplanctônica pode ser visualizado na figura 02, onde se observa que a concentração de $7,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de cobre total causou inibição do crescimento nas bactérias após 225h de incubação, e que o maior crescimento populacional bacteriano, detectado no final da incubação, ocorreu na concentração de $1,7 \times 10^{-6}$ mol. L⁻¹. No tratamento controle, não foi observado crescimento até 125 h de incubação, onde a partir de então a população bacteriana apresentou crescimento comparado ao do tratamento com adição de $1,8 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de cobre.

O crescimento populacional bacteriano no teste de dinâmica de cobre é apresentado na figura 03, mostrando que em 72 h ocorreu crescimento em todas as réplicas (A, B e C) experimentais. Sendo que na réplica C, em 4 h de incubação, percebe-se um aumento do crescimento seguido de decréscimo, onde a partir de então a população começa a apresentar novo crescimento.

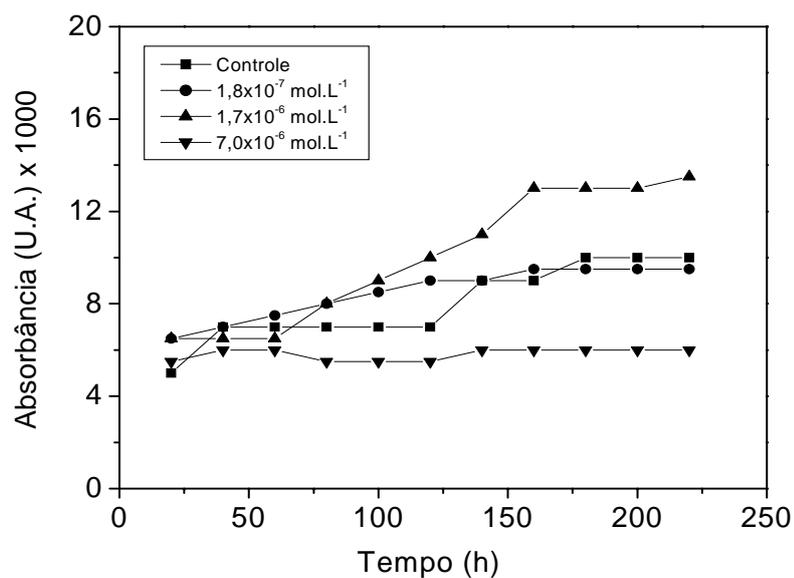


Figura 02- Absorbância da cultura bacteriana em 540 nm em função do tempo experimental. Teste de resistência bacterioplânctônica verificado através da curva de crescimento dos microorganismos. Os símbolos representam as várias concentrações de cobre testadas.

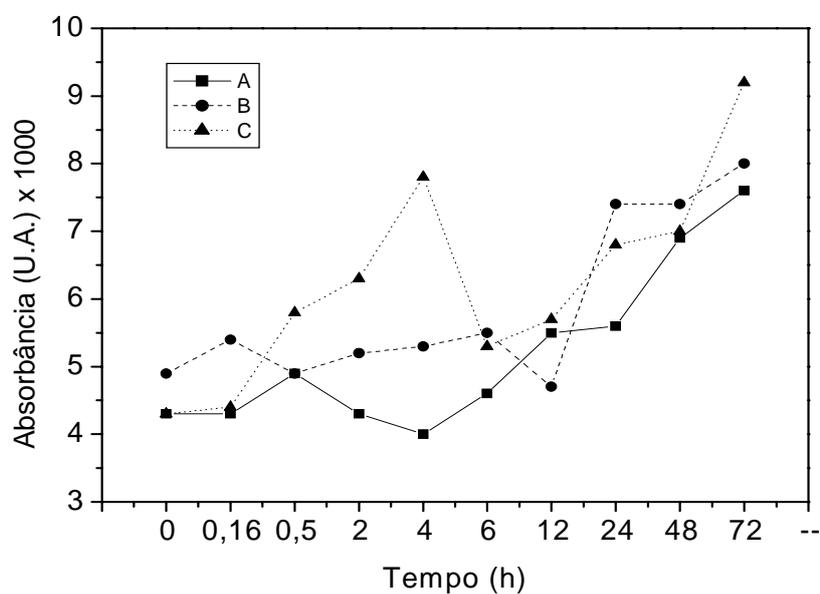


Figura 03- Crescimento populacional bacteriano no experimento com concentração de cobre de 1×10^{-6} mol.L⁻¹, detectado através de espectroscopia de absorção em 540 nm, onde a absorbância é plotada em função do tempo experimental, nas três réplicas experimentais (A, B, C).

A dinâmica do cobre durante o crescimento populacional bacteriano é mostrada nas figuras 04 (cobre adsorvido), figura 05 (cobre livre), figura 06 (cobre intracelular) e figura 07 (cobre total dissolvido).

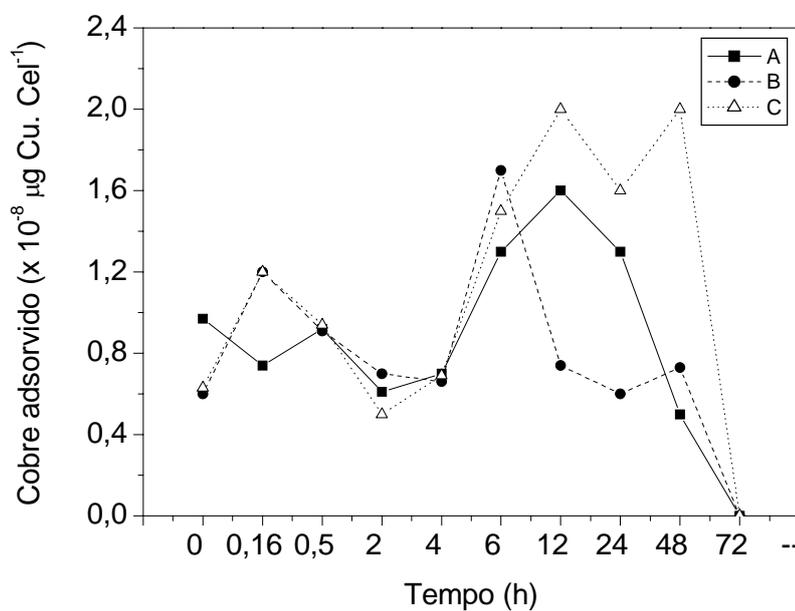


Figura 04- Concentração de cobre adsorvido em função do tempo experimental nas três réplicas experimentais (A, B, C).

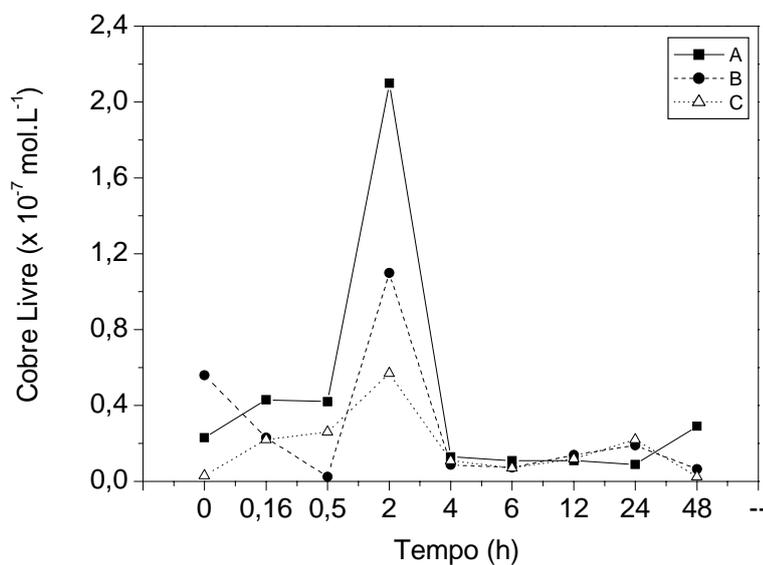


Figura 05- Concentração de cobre livre em função do tempo experimental nas três réplicas experimentais (A, B, C).

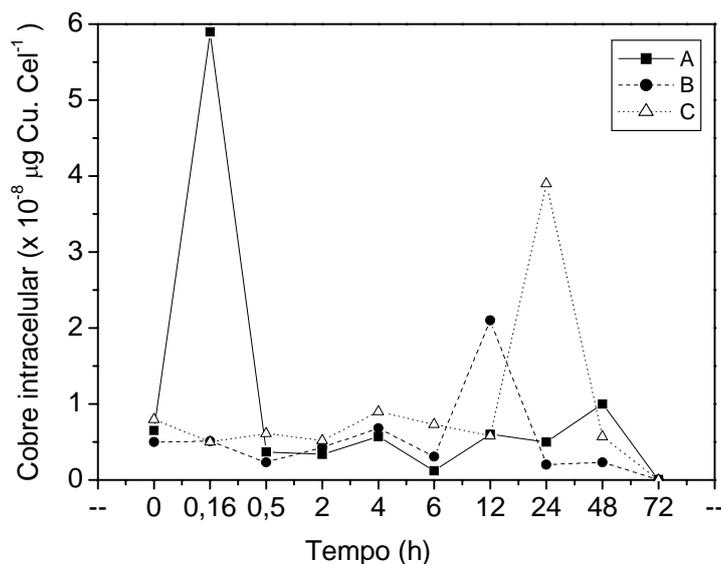


Figura 06- Concentração de cobre intracelular em função do tempo experimental nas três réplicas experimentais (A, B, C).

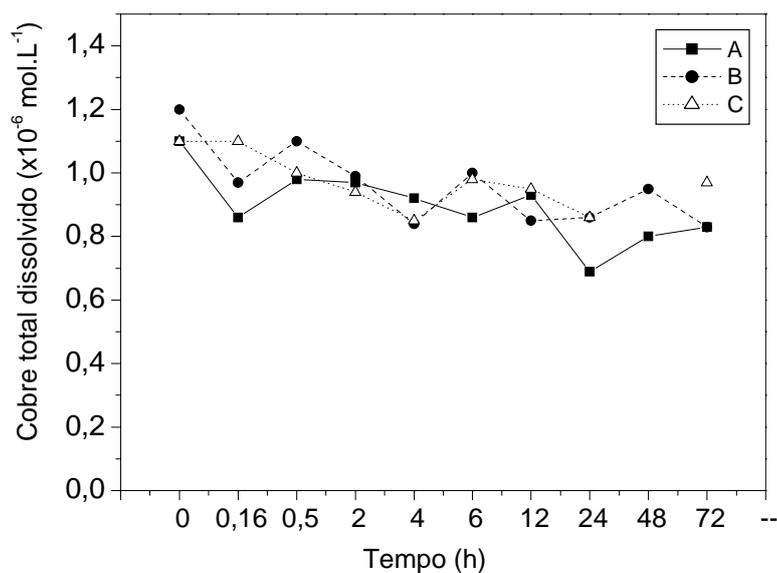


Figura 07- Concentração de cobre total dissolvido em função do tempo experimental nas três réplicas experimentais (A, B, C).

A figura 04 mostra que a adsorção do cobre na superfície celular deu-se ao início do experimento nas amostras B e C ($1,2 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$), como pode ser visualizado na figura 04. Na amostra A ocorreu uma diminuição da adsorção de cobre ($9,7 \times 10^{-9} \rightarrow 7,4 \times 10^{-9} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$) com aumento simultâneo do metal internalizado ($6,5 \times 10^{-9} \rightarrow$

$5,9 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$) (fig. 06). Na figura 05 observa-se que em 2h de incubação, em todas as réplicas experimentais (A, B, C), houve um aumento da concentração de cobre livre (A= $4,2 \times 10^{-8} \rightarrow 2,1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$; B= $2,4 \times 10^{-8} \rightarrow 1,1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$; C= $2,6 \times 10^{-8} \rightarrow 5,7 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$), precedido por uma redução do cobre adsorvido nas bactérias (A= $9,2 \times 10^{-9} \rightarrow 6,1 \times 10^{-9} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; B= $9,1 \times 10^{-9} \rightarrow 7,0 \times 10^{-9} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; C= $9,4 \times 10^{-9} \rightarrow 3,0 \times 10^{-9} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$). Posteriormente, em 6 horas experimentais, um novo aumento na concentração de cobre adsorvido (A= $1,3 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; B= $1,7 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; C= $1,5 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$) pode ser observado na figura 04, seguido de aumento da concentração de cobre intracelular (A= 12 h $\rightarrow 4,6 \times 10^{-9} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; B= 48 h $\rightarrow 1,0 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$; C= 24 h $\rightarrow 3,9 \times 10^{-8} \mu\text{gCu.Cel}^{-1}$) (figura 06) e diminuição do cobre livre em todas as réplicas experimentais. A concentração de cobre total dissolvido permaneceu praticamente constante durante todo o período experimental, como observado na figura 07.

DISCUSSÃO

O maior crescimento populacional bacteriano ocorrido nos tratamentos com concentração de cobre de $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ indica a tolerância desses organismos ao metal, fato que é confirmado por resultados da literatura (Hassen *et al.*, 1998; Mirimanoff e Wilkinson, 2000; Solioz *et al.*, 2003; Remonsellez *et al.*, 2006). Hassen *et al.* (1998) encontrou tolerância bacteriana ao cobre total em concentrações de até $8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Mirimanoff e Wilkinson (2000) verificou tolerância ao zinco e cádmio por bactérias gram-positivas. Esses autores verificaram que *Rhodococcus opacus* foi resistente ao zinco e cádmio nas concentrações de $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Solioz *et al.* (2003) ao estudarem a homeostase do cobre em *Enterococcus hirae*, observaram que esses organismos eram resistentes ao cobre em uma concentração total de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Remonsellez *et al.* (2006) registrou tolerância ao cobre em concentração de 2×10^{-6} mol.L⁻¹ de cobre total pela bactéria *Sulfolobus metallicus*.

Vários são os mecanismos adotados pelas bactérias para tolerar altas concentrações de metal no meio (Worms, 2006). No presente trabalho, a detecção do cobre em suas várias formas durante o crescimento populacional bacteriano, mostra que o efluxo de metal para o meio externo foi um mecanismo de resistência empregado pelas bactérias durante o tempo de incubação. Neste processo, observa-se um aumento do cobre adsorvido seguido de uma diminuição, ao mesmo tempo em que se observa aumento da concentração de cobre intracelular ou de cobre livre no meio. Isto indica que o metal aderido à parede celular das bactérias pode se tornar tanto intracelular como também liberado de volta ao meio. As concentrações de cobre total dissolvido no meio indicam que as bactérias estão excretando concentrações semelhantes de cobre capturado, permanecendo a nível intracelular somente o suficiente para o bom funcionamento celular.

O comportamento de efluxo pelas bactérias tem sido descrito na literatura (Croot *et al.*, 1999; Mirimanoff e Wilkinson, 2000; Gregor *et al.*, 2005; Adle *et al.*, 2007). Croot *et al.* (1999) verificaram o efluxo de cobre por uma cianobactéria marinha, *Synechococcus*. Mirimanoff e Wilkinson (2000) estudaram a regulação de zinco e cádmio por *Rhodococcus opacus* (bactéria gram-positiva) e também verificaram que esses organismos utilizam o efluxo como estratégia de regulação de metais. Adle *et al.* (2007) verificaram o efluxo de cádmio pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e Gregor *et al.* (2005) verificaram que *Cupriviadus metallidurans* possui mecanismos de efluxo de níquel quando este penetra no periplasma.

Existem duas maneiras de captura de metal complexado à MOD pelas bactérias: além da biodisponibilização do metal através da degradação bacteriana sobre a MOD

contaminada, há o processo de adsorção da MOD na parede celular das bactérias (Campbell *et al.*, 1997), o que pode levar ao aumento da captura de metais, aderidos à MOD, por esses organismos (Pempkowiak *et al.*, 1994, Penttinen *et al.* 1995; Worms, 2006).

No presente trabalho, após a captura do metal complexado a MOD, as bactérias liberaram íons cobre ao meio como resultado do processo de efluxo, sendo detectado um aumento da concentração dessa forma de metal em 2h de incubação em relação à concentração inicial.

A captura de metais pelos organismos está associada a sua labilidade (Köster e van Leeuwen, 2004), tornando assim, o tempo de difusão através da parede celular um processo importante nos sistemas ambientais. De acordo com van Leeuwen *et al.* (2005), o coeficiente de difusão efetiva do metal complexado a substâncias orgânicas é menor do que o do metal livre. Deste modo, o metal na forma iônica além de se difundir com maior velocidade através de membranas biológicas está apto para se interagir com macromoléculas no interior das células. Isso faz com que o metal livre seja a forma de maior toxicidade e biodisponibilidade (Nogueira *et al.*, 2005), pois os organismos que não utilizam a MOD como recurso alimentar não terão acesso ao metal complexado a ela.

Os metais traços essenciais são precisamente regulados pelos organismos, seja em ambientes com deficiência ou excesso do metal. Uma vez que os complexos de metais são as formas predominantes desses elementos nos ambientes aquáticos (> 90 %), assume grande importância ecológica a determinação quantitativa da contribuição desses complexos para os processos de captura biológica dos metais (Worms, 2006).

Neste estudo, os resultados demonstraram que o cobre complexado à MOD pode ser capturado e biodisponibilizado novamente para o meio na forma livre e de maior

toxicidade, pela população bacteriana, através do efluxo desses elementos para fora da célula. No entanto, existem outros organismos que possuem capacidade de excretar os metais na forma de complexos, tal como a microalga *Thalassiosira sp* estudada por Lee *et al.* (1996). Esses estudos, assim como o presente trabalho, demonstram que organismos unicelulares como bactérias e microalgas são capazes de modificar a especiação química dos metais através da excreção desses elementos complexados ou livres, interferindo assim na sua disponibilização para outros organismos aquáticos. Assim. Deste modo, os processos resultantes da interação entre bactérias e metais complexados são importantes para o entendimento da dinâmica desses elementos nos ambientes aquáticos e suas conseqüências para biota em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLE, D.J.; SINANI, D.; KIM, H.; LE, J. A Cadmium-transporting P1B-type ATPase in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 947–955, 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for the examination of water and waste water**, 2. ed., Washington: APHA, 1995.1268p.

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J.G.; GRAY, J.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257-263, 1983.

BERTINATO, J.; L'ABBE', M. R. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 316–322, 2004.

CAMPBELL, P.G.C.; TWISS, M.R.; WILKINSON, K.J. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v. 54, p. 2543-2554, 1997.

CHANGELA, A.; CHEN, K.; XUE, Y.; HOLSCHEN, J.; OUTTEN, C.E.; O'HALLORAN, T.V.; MONDRAGON A. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. **Science**, v. 301, p. 1383-1387, 2003.

CROOT, P.L. Uptake and efflux of ^{64}Cu by marine cyanobacterium *Synechococcus* (WH7803). **Limnol. Oceanogr.**, v.48, p. 179-188, 2003.

DE OLIVEIRA, C.R.; LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W.F. Copper complexation by naturally occurring organic matter: a multiligand model. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 7, p. 125 – 131, 1995.

EDDING, M.; TALA, F. Copper transfer and influence on a marine food chain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 617-624, 1996.

FORD, T.E.; MITCHEL, R. Microbial transport of toxic metals. In: R. MITCHEL (ed) **Environmental microbiology**. Nova York: Willy-liss, 1990. p.91-238.

FRANKE, S., G. GRASS, C. RENSING, AND D. H. NIES. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 3804–3812, 2003.

GORDON, A.S.; DONAT, J.R.; KANGO, R.A.; DYER, B.J.; STUART, L.M. Dissolved copper-complexing ligands in cultures of marine bacteria and estuarine water. **Mar. Chem.**, v. 70, p. 149–160, 2000.

GRASS, G.; RENSING, C. CueO is a multi-copper oxidase that transfers copper tolerance in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, p. 902-908, 2001.

GREGOR, G.; BEATE, F.; NIES, D.H. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. **Biometals**, v. 18, p. 437–448, 2005.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 64, 7-15p., 1998.

JARDIM, W.F.; GIMENEZ, S.M.N.; NERY, J.A.S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selectie electrodes. In: Anais do Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, V, 1986, São Paulo. p.226-230.

JONES, J.G. A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water. *Scient. Publis. Freshwat. Biol., Ass.*, n^o 25, 1979

KITTLESON, J.T.; LOFTIN, I.R.; HAUSRATH, A.C.; ENGELHARDT, K.P.; RENSING, C.; MCEVOY, M.M. Periplasmatic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both Cu^I and Ag^I. **Biochemistry**, v. 45, p. 11096-11102, 2006.

KÖSTER, W.; van LEEUWEN, H. P. Physicochemical kinetics and transport at the biointerface: setting the stage. In: Buffle, J., van Leeuwen, H. P. (eds) **IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems: Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces**; Wiley: Chichester, vol. 9, pp 1-14, 2004.

LEE, B.T.; ROGERS, S.; BERGEMANN, A.; CAMARKS, J.; ROUCH, D. Bacterial response to copper in the environment: *Escherichia coli* as a model system. In: S.I. GUCER, J.A.C. BROECKAERT (eds.) **Metal speciation in the environment**. New York: Springer-Verlag, 1990.

LEE, J.; AHNER, B.A.; MOREL, F.M. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Environ. Sci. Technol.**, v. 30, p. 1814–1821, 1996.

LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W.F. The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 9, p. 27 – 34, 1997.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.H.; SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.M.R.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI, A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74 – 78, 2007.

LORES, E.M.; PENNOCK, R.J. Bioavailability and trofic transfer of humic- bound copper from bacteria to zooplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 187, 67-85, 1999.

LORES, E.M.; SNYDER, R.A.; PENNOCK, J.R. The effect of humic acid on uptake-adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. **Chemosphere**, v. 28, p. 293-310, 1999.

MARKWIESE, J. T.; COLBERG, P. J. S. Bacterial Reduction of Copper-Contaminated Ferric Oxide: Copper Toxicity and the Interaction Between Fermentative and Iron-Reducing Bacteria. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 38, p. 139–146, 2000.

MANSOUR-ALLIABADI; SHARP, R.E. passage of selected heavy metals from *Sphaerotilus* (Bacteria: Chlamydoxiales) to *Paramecium caudatum* (Protozoa: ciliata). **Water Research**, v. 19, p. 697-699, 1985.

MIRANDA, C.D.; ROJAS, R. Copper accumulation by bacteria and transfer to scallop larvae. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 293-300, 2006.

MIRIMANOFF, N.; WILKINSON, J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). **Environmental Science e Technology**, v. 3, p. 612-622, 2000.

MÜNSTER, U.; CHRÓST, R.J. Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: J. Overbeck e R.J. Chróst (eds) **Aquatic microbial Ecology: biochemical and molecular approaches**. Ann Arbor, Michigan: Science Tech Publishers, Springer-Verlag Inc, 1990. p. 2-46.

NIES, D.H. Efflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, p. 313-339, 2003.

NIRAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, v. 50, p. 139-161, 1988.

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolisaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Research**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

OUTTEN, F.W.; HUFFMAN, D.L.; HALE, J.A.; O'HALLORAN, T.V. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. **Journal of biology and chemistry**, v. 276, p. 30670-30677, 2001.

PEMPKOWIAK, J.; KOZUCH, J.; SOUTHON, T. The influence of structural features of marine humic substances on the accumulation rates of cadmium by a blue mussel *Mytilus edulis*. **Env. Int.**, v. 20, p. 391-395, 1994.

PENTTINEN, S.; KUKKONEN, J. OIKARI, A. The kinetics of cadmium in *Daphnia magna* as affected by humic substances and water hardness. **Ecotoxicol. Environm. Safety**, v. 30, p. 72-76, 1995.

POMEROY L.R. The ocean's food web, a changing paradigm. **BioScience**, v. 24, n. 9, p. 499-504, 1974.

PORTER, K. G.; FEIG Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnol. Oceanogr.**, v. 25, p. 943-948, 1980.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RESING, C.; GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, p. 197-213, 2003.

REMONSELLEZ, F.; ORELL, A.; JEREZ, C.A. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. **Microbiology**, v. 152, p. 59–66, 2006.

ROSEN, B.P.; BHATTACHERJEE, H.; SHIF, W.P. Mechanism of metalloregulation of an translocating ATPase. **J. Bioenergy and Biomembrane**, v. 27, p. 85-91, 1995.

SHERR, E.B. Role of microbes in pelagic food web: A revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1225-1227, 1988.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32, p. 587-605, 2005.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 183-189, 2003.

THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural waters**. Dordrecht, The Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 1985.

TRANVIK, L.A.; SIEBEURTH, J. Effects of flocculated humic matter on free and attached pelagic microorganisms. **Limnology and Oceanography**, v. 34, n. 4, p. 688-699, 1989.

TWISS, R.M.; CAMPBELL, G.C.; AUCLAIR, J.C. regeneration, recycling, and trophic transfer of trace metals by microbial food-web organisms in the pelagic surface waters of Lake Erie. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 7, p. 1425-1437, 1997.

van LEEUWEN, H.P.; TOWN, R.; BUFFLE, J.; CLEVEN, R.M.J.; DAVISON, W.; PUY, J.; VAN RIEMSDIJK, W.H.; SIGG, L. Dynamic Speciation Analysis and Bioavailability of Metals in Aquatic Systems. **Environmental Science e Technology** , Vol. 39, n^o. 22, 2005.

WORMS, I.; SIMON, D.F.; HASSLER, C.S.; WILKINSON K.J. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. **Biochimie**, v. 88, p. 1721–1731, 2006.

WHITE, D.G.; GOLDMAN, J.D.; DEMPLE, B.; LEVY, S.B. Role of the *acrAB* locus in inorganic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, p. 6122-6126, 1997.

Influência da degradação da matéria orgânica dissolvida natural na biodisponibilização
do cobre em uma cadeia alimentar aquática

RESUMO

A introdução de metais em ambientes aquáticos através das atividades antrópicas pode levar à bioacumulação e magnificação desses elementos em cadeias tróficas e, conseqüentemente, à toxicidade para a biota. Tanto a biodisponibilidade quanto a toxicidade dos metais nos ambientes aquáticos sofrem influência da concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD), uma vez que estas possuem sítios quelantes de metais. Este trabalho visou elucidar a influência da atividade de microheterótrofos sobre o complexo MOD-Cu na dinâmica do cobre em uma cadeia alimentar aquática, levando-se em conta as implicações ecotoxicológicas de cada organismo estudado. Para tanto, a cadeia alimentar (bactéria → ciliado → Copepoda) foi exposta aos tratamentos “Cu”, “DOM”, “DOM+Cu” e controle (água reconstituída), cada qual com 3 réplicas. Os resultados demonstraram que a população bacteriana utilizou a MOD como substrato, e que o cobre complexado foi disponibilizado e biomagnificado dentro da cadeia alimentar, causando toxicidade aos ciliados. Ainda, os resultados demonstraram que íons cobre livres foram mais intensamente acumulados do que o cobre complexado.

INTRODUÇÃO

O aumento das descargas de metais em ambientes aquáticos, resultantes de ações antrópicas, tem como conseqüências alterações no fluxo e distribuição dos metais no ecossistema (Nriagu, 1990). O comportamento dos metais em ambientes aquáticos é controlado por características físicas e químicas do elemento, e pelas propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema (Leppard, 1983). A interação dessas propriedades irá determinar a forma predominante em que um metal pode ser encontrado no ambiente, o que, por sua vez, determinará seu efeito sobre a biota.

A concentração e tipo de matéria orgânica dissolvida (MOD) são características do ecossistema e são de grande importância em relação ao comportamento dos metais. A MOD é a fração predominante da matéria orgânica total presente em águas naturais (Azam *et al.*, 1983), e que pode seqüestrar ou liberar íons para o ambiente (Lombardi e Jardim, 1997), atuando de maneira dinâmica sobre a especiação e, conseqüentemente, sobre a acumulação e toxicidade dos metais nos ecossistemas aquáticos (Nogueira *et al.*, 2005).

A acumulação de metais por invertebrados é definida como a captura do metal menos sua eliminação pelo organismo. No entanto, existe uma fração de metais que pode ser passivamente adsorvida ao exoesqueleto. A captura dos metais dissolvidos no meio ocorre quando estes se ligam às proteínas de membrana e são transportados para o interior das células (Rainbow e Darllinger, 1993). Ainda, de acordo com Reinfelder *et al.* (1998), os metais podem ser capturados pelos organismos através da ingestão de alimento contaminado. Dentro das células, os metais se ligam a macromoléculas biologicamente importantes causando danos celulares (Laws, 2000).

Os microorganismos heterotróficos são competidores entre si e, sendo redutores dos recursos de carbono, afetam o metabolismo do ecossistema aquático como um todo

(Sherr, 1988; Azam *et al.*, 1983; Pomeroy, 1974). Através do processo de degradação da MOD, os microheterótrofos podem transferir tanto o carbono orgânico, quanto disponibilizar os micro e macronutrientes contidos na matéria orgânica para outros níveis tróficos (degradação da MOD pela bactéria → fitoplâncton e organismos predadores) (Overbeck e Chróst, 1990). Assim, através da degradação microbiana, alguns nutrientes retornam para os produtores primários (Pomeroy e Wiebe, 1988), o que tem sido denominado de *alça microbiana* (“microbial loop”), ou são disponibilizados para outros níveis tróficos, através do alimento ou meio circundante.

De acordo com dados da literatura, a interferência da matéria orgânica na especiação química de metais está relacionada com sua biodisponibilidade e toxicidade (Morel *et al.*, 1991; Rainbow e Dallinger, 1993; Laws, 2000; Nogueira *et al.*, 2005). No entanto, são raros os estudos (Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999) sobre a regeneração e biodisponibilização desses elementos a partir da interação do complexo MOD+Cu com microorganismos heterotróficos.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da MOD e de sua degradação por uma população bacteriana na dinâmica do cobre e sua biodisponibilização em uma cadeia alimentar aquática. Para tanto, foram usadas bactérias heterotróficas (população natural), ciliados (*Paramecium caudatum*) e copépodes (*Metacyclops mendocinus*). Foram verificadas a dinâmica do cobre e as implicações ecotoxicológicas sobre os três grupos de organismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. O METAL COBRE

O metal utilizado nos experimentos deste estudo foi o cobre em uma concentração de 1×10^{-6} mol.L⁻¹ (1 mg mL⁻¹ CuCl₂, Titrisol, Merck). Sua escolha baseou-se no fato de que, em concentrações naturais, atua como um micronutriente requerido ao crescimento saudável dos organismos, enquanto que em concentrações pouco mais elevadas este metal é tóxico (Lewis e Cave, 1982). Além disso, o cobre é um metal que tem considerável afinidade com a matéria orgânica natural, como tem sido demonstrado na literatura (Chau *et al.*, 1974; Lombardi e Jardim, 1997; Lombardi e Vieira, 1998; Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999).

2. A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NATURAL

Os experimentos de laboratório foram conduzidos utilizando-se matéria orgânica dissolvida natural (Suwannee River NOM – RO isolation) obtida pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) em uma concentração de 10 mg.L⁻¹. De acordo com Thurman (1985), em águas continentais, a concentração de MOD em ambientes eutrofizados encontra-se normalmente em um limite entre 10 – 15 mg C.L⁻¹. Os experimentos foram efetuados utilizando-se água reconstituída (APHA, 1998), que possui baixa concentração de matéria orgânica dissolvida e de metais. A água foi autoclavada a 120 °C por 30 min. para esterilização. A concentração de carbono orgânico na solução de 10 mg.L⁻¹ de MOD foi determinada usando-se um analisador de carbono (TOC-5000 Shimadzu - Japão).

3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO DA MOD COM O COBRE

Uma vez que se deseja que todo o cobre esteja quelado, a capacidade de complexação da MOD com o metal foi estimada através de titulações complexométricas para determinar qual a concentração inicial de cobre a ser usada nos experimentos, seguindo a metodologia descrita por Lombardi e Jardim (1997).

A capacidade de complexação da MOD com o metal refere-se à quantidade de sítios disponíveis no composto orgânico para a ligação com o mesmo. Dessa maneira, a quantidade de metal capturado por uma amostra é uma medida da quantidade de ligantes ativos disponíveis para a complexação (Chau *et al.*, 1974). No presente estudo, as propriedades complexantes da MOD com o cobre foram determinadas através da técnica de potenciometria, usando-se eletrodo seletivo ao íon cobre (ISE). Foram feitas titulações complexométricas através da adição crescente de metal mantendo-se constante o pH e a força iônica da amostra. A concentração total de ligantes (CL = quantidade de sítios disponíveis para o respectivo K') e a constante de estabilidade condicional (K' = força de associação entre MOD natural e cobre) foram obtidas analisando-se a curva de titulação através do Modelo de Scatchard (Scatchard *et al.*, 1957).

4. OS ORGANISMOS

4.1. BACTERIOPLÂNCTON

A água coletada do ambiente natural (três réplicas de 500 mL) foi primeiramente filtrada em filtro GF/C (Whatman) para retirada de predadores e, posteriormente, filtrada em filtros com 0,2 µm de diâmetro de poro (Gelman GA-8) para retenção das bactérias. O filtro que então continha a população bacteriana foi inoculado em água reconstituída (500 mL). Não houve cultura-estoque para a comunidade

bacterioplanctônica, uma vez que o cultivo em laboratório pode selecionar espécies, ignorando aquelas com maior eficiência na assimilação da MOD. As coletas foram realizadas na primavera. Durante o experimento, a comunidade bacterioplanctônica foi mantida em sala com temperatura controlada de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, no escuro e sob agitação constante (60 – 100 rpm) (Tranvik e Sieburth, 1989) em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109, Brasil). Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar (Pachane, Brasil) dotado de luz ultravioleta para minimizar contaminações.

4.2. CILIADO

O ciliado escolhido para o presente estudo foi o *Paramecium caudatum*. Esta espécie é de fácil adaptação às condições de cultivo em laboratório, é comumente encontrado no Reservatório do Monjolinho, e se alimenta basicamente de bactérias. A água foi coletada do ambiente natural e concentrada em rede de 20 μm de abertura de malha. No laboratório, os organismos foram triados por capilaridade com auxílio de uma pipeta Pasteur (técnica de microaspersão) sob microscópio óptico (Leica DMLS). O ciliado foi mantido no laboratório em água reconstituída enriquecida com pó de alfafa, grãos de arroz e levedura (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003), sob condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e foto-período de 12/12 h luz/escuro. A cada três dias, a água de cultivo era renovada.

4.3. COPEPODA

Entre os organismos zooplânctônicos, foi escolhida uma espécie de Copepoda Cyclopoida, *Metacyclops mendocinus*, que é um organismo predador e possui hábito alimentar variado. O zooplâncton foi coletado no ambiente com auxílio de rede de plâncton de 68 μm de abertura de malha, fazendo-se arrastos horizontais e verticais. Os

organismos foram acondicionados em galões de polietileno com água do próprio ambiente para o transporte. No laboratório, a espécie escolhida foi triada e aclimatada. O uso de populações monoclonais foi evitado, procurando-se sempre cultivar uma amostra representativa da população. Para os cultivos, foram seguidas as recomendações feitas por Vijverberg (1989).

Os organismos foram mantidos em aquários com capacidade de 60 L, com água do próprio ambiente filtrada em filtros GF\C (Whatman) e aeração constante, em sala aclimatada à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e foto-período 12/12 h luz/escuro. O alimento fornecido foi água reconstituída enriquecida com o protozoário *P. caudatum*, ração de peixe fermentada com levedura na proporção 1:1 (Rojas *et al.*, 2001) e alga cultivada no laboratório, à concentração de 10^5 cél.mL⁻¹. As algas (*Scenedesmus sp* e *Chlamydomonas sp*) utilizadas como fonte alimentar do zooplâncton estavam em fase exponencial de crescimento e foram cultivadas em meio W.C. (Guillard e Lorenzen, 1972).

5. DESENHO EXPERIMENTAL

A cadeia microbiana (bactéria → ciliado → copépode) foi exposta aos tratamentos “Cu”, “DOM”, “DOM+Cu” e controle (água reconstituída), cada qual realizado com 3 réplicas. Primeiramente foi realizado o experimento com a população bacteriana, onde, após crescimento da mesma, foi introduzido o *P. caudatum* e, posteriormente, o *M. mendocinus*, como mostrado a seguir.

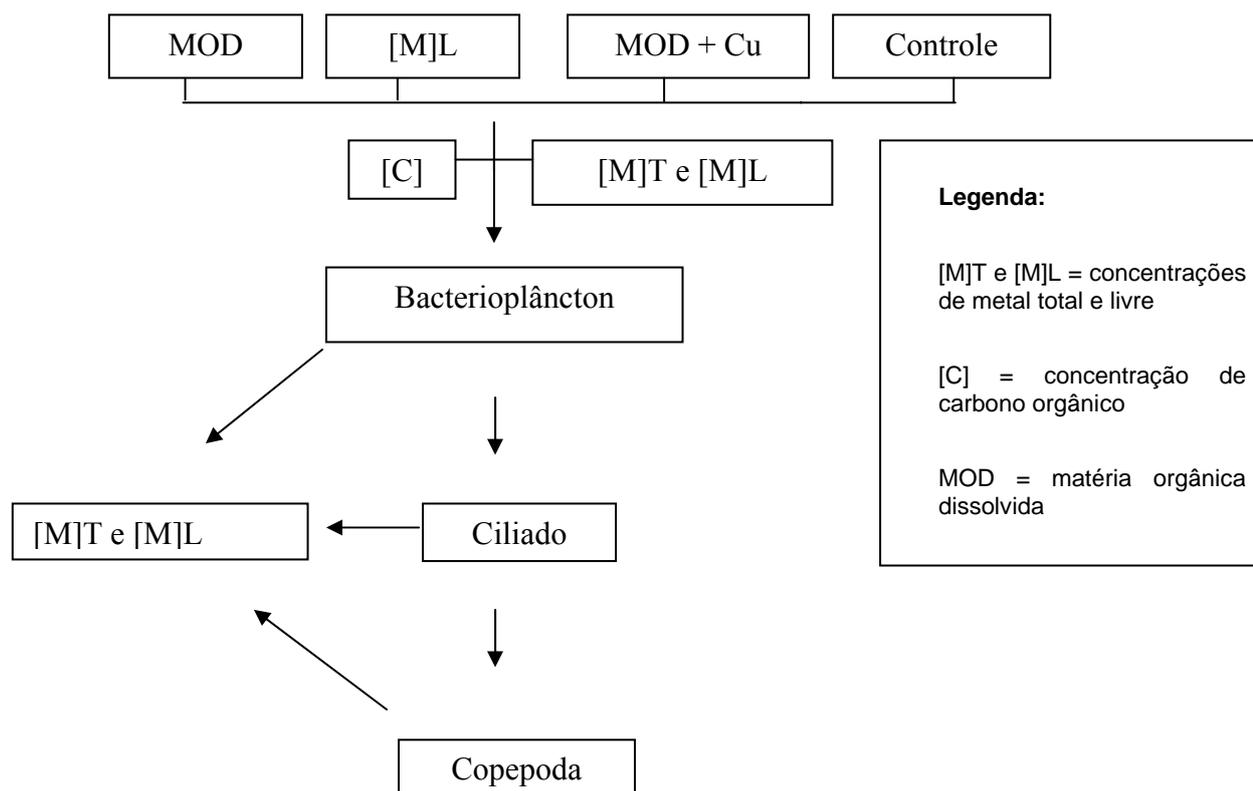


Figura 01 - Esquema representativo da metodologia utilizada no experimento de avaliação da biodisponibilidade do cobre na cadeia alimentar microbiana com ou sem MOD natural.

6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE

6.1. COBRE LIVRE

A determinação de íons Cu^{2+} foi feita através da técnica de potenciometria, usando-se eletrodo seletivo ao íon cobre (ISE). O eletrodo seletivo ao íon cobre (ANALION) foi utilizado conjuntamente com um eletrodo de referência de dupla junção Ag/AgCl (ANALION). A temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi mantida constante durante a determinação. A força iônica das amostras foi ajustada para $0,1\text{ M}$ com NaNO_3 . O tempo de equilíbrio foi determinado de acordo com a resposta do eletrodo. Para uma concentração na ordem de 10^{-8} M , foi requerido um tempo de 4 h , o qual foi diminuindo com o aumento das

concentrações de cobre. Para a calibração do sistema ISE, foram utilizados tampões metálicos como descrito em Jardim *et al.* (1986) com modificações de Lombardi *et al.* (2007).

6.2. COBRE TOTAL

Cobre total inclui todas as espécies de cobre. Neste trabalho, as determinações de cobre total na água de cultivo foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (VARIAN, Spectra A.A 220, Austrália), após terem sido fixadas com HNO₃ em uma concentração final de 2,0 M. Para a determinação do cobre total nos organismos (cobre total particulado), ao final dos experimentos, esses foram transferidos para filtros de acetato celulose previamente numerados e pesados em balança microanalítica (Sartorius MC21S, Alemanha). Posteriormente, os filtros contendo os organismos foram colocados em estufa a uma temperatura de 60 °C por 48 h. Após este procedimento, esses filtros foram pesados novamente para estimativa de peso seco e transferidos para frascos de polycarbonato onde foi feita a digestão ácida adicionando-se 2,0 mL de HNO₃ concentrado em cada amostra. As amostras contendo os organismos e HNO₃ foram transferidas para uma estufa a 90 °C onde permaneceram por 48 h (Lores *et al.*, 1999). Após digestão ácida, o volume da amostra foi completado para 50 mL com água deionizada, para posterior determinação em espectrofotômetro de absorção atômica com auxílio do forno de grafite.

7. EXPERIMENTOS DE PREDACÃO/BIOACUMULAÇÃO

No início dos experimentos foram tomados alguns cuidados:

a. Para a realização dos experimentos, foram utilizados exclusivamente frascos de polycarbonato, lavados previamente com HNO₃ 1.0 M;

b. Tudo o que foi adicionado aos frascos experimentais teve seu volume especificado para que a diluição do metal fosse considerada posteriormente;

7.1. INTERAÇÃO MOD- CU E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

Um inóculo da população natural de bactérias, coletada como descrito no item 4.1, foi submetido aos tratamentos Cu, MOD, Cu+MOD e controle, cada qual com três réplicas. O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente através de leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) em 540 nm. Após o crescimento, parte da cultura (100 mL) foi separada e filtrada em filtros com poros de 0,2 µm (Gelman GA-8) para retenção das bactérias. O filtrado foi submetido à análise de cobre livre (30 mL), cobre total (20 mL) e análise de carbono orgânico - TOC (50 mL). O filtro contendo as bactérias foi preparado para análise de cobre total particulado. Os 400 mL restantes foram distribuídos em placas de policarbonato multiescavadas, onde em cada orifício (10 mL) foram adicionados os ciliados como descrito a seguir.

7.2. INTERAÇÃO MOD- CU-BACTÉRIAS E CILIADOS

A água de cultivo (100 mL) estoque contendo os ciliados *P. caudatum* foi filtrada com auxílio de rede de 10 µm de abertura de malha e os organismos retidos foram re-suspendidos em água reconstituída. Uma alíquota da água de cultivo de 1,0 mL foi retirada e fixada com lugol para contagem dos organismos (Lores *et al.*, 1999). Um inóculo de 1,0 mL da cultura de *P. caudatum* foi adicionado a cada reservatório das placas multiescavadas contendo a cultura bacteriana de cada tratamento. Após 72 h, parte da cultura (100 mL de cada réplica experimental) foi filtrada em membrana durapore com 5 µm de diâmetro de poro (Millipore) para retenção dos protozoários. O filtrado foi separado para determinação de íons cobre livre (80 mL) e cobre total

dissolvido (20 mL), enquanto o filtro contendo os ciliados foi preparado para análise de cobre total particulado. Os 300 mL de água de cultivo restantes foram usados no experimento seguinte, onde os copépodes foram adicionados. O crescimento populacional dos ciliados foram avaliadas através de contagem em lâmina de Sedgewick-Rafter. Para tanto, alíquotas de 1mL das culturas foram retiradas diariamente e fixadas com lugol.

7.3. INTERAÇÃO MOD-CU-BACTÉRIAS-CILIADO E COPÉPODES

Em cada reservatório das placas de policarbonato (10 mL) contendo os organismos dos níveis tróficos inferiores, foram adicionados 2 copépodes adultos. Após 72 h, os copépodes foram retirados e os sobreviventes contados. Os organismos vivos foram preparados para análise de cobre particulado e as amostras, então sem os copépodes, foram filtradas em filtros de acetato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro. Parte do filtrado foi preparado para análise de íons cobre livre (30 mL) e a outra parte preparada para determinação de cobre total dissolvido (20 mL).

RESULTADOS

Um dos fatores que controlam a biodisponibilidade do cobre é sua capacidade de complexação com a matéria orgânica natural. A MOD (Suwannee River NOM – RO isolation) usada no presente estudo demonstrou ter dois tipos de ligantes capazes de complexar com o cobre. Um mais forte com $\log K'_1=7,52$, $CL_1=3,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, e outro ligante mais fraco com $\log K'_2=5,44$ and $\log CL_2=4,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Esses resultados são mostrados na figura 02.

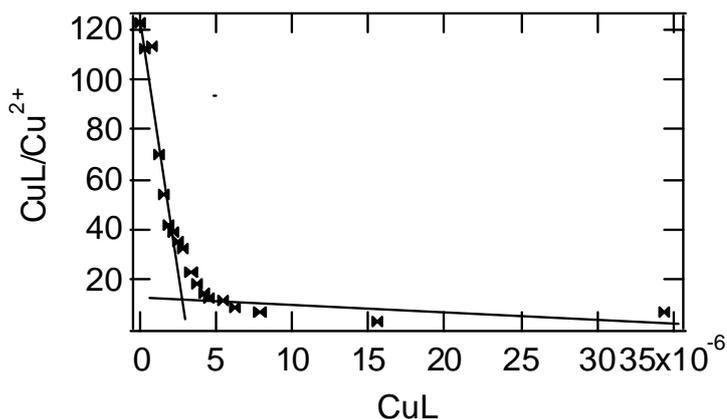


Figura 02 – Scatchard Plot para a titulação do complexo DOM-Cu. Força iônica= 2×10^{-2} (NaNO_3), pH=6.8. $\text{Log } K'1=7.52$; $\text{CL}1=3.6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{Log } K'2=5.44$; $\text{CL}2=4.7 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A curva de crescimento populacional das bactérias é mostrada na figura 03. Pode-se observar que o maior crescimento ocorreu no tratamento com a MOD contaminada com cobre, enquanto que os menores ocorreram nos tratamentos onde não houve adição da MOD. O consumo da MOD pelas bactérias foi verificado através de determinações de carbono (TOC) e mostrou que aproximadamente 4 mgC.L^{-1} foi consumido durante o crescimento (57% do total de carbono). Esses resultados demonstraram que tais microorganismos são capazes de degradar a MOD e que a presença do cobre não inibiu o crescimento da comunidade bacteriana.

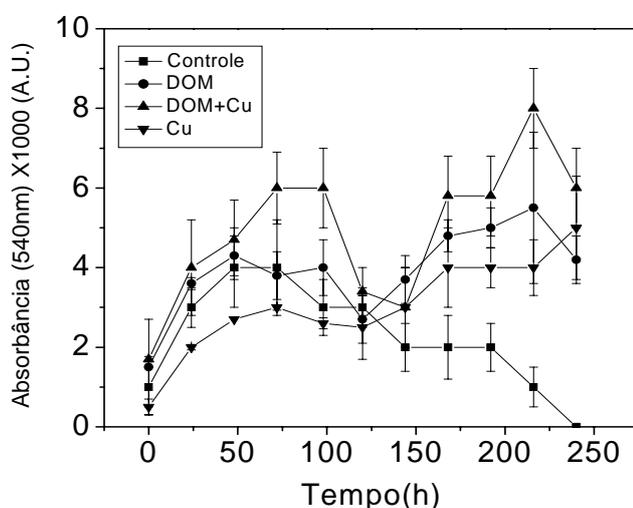


Figura 03 – Curva de crescimento populacional das bactérias quantificado pela densidade óptica a 540 nm. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

A dinâmica do cobre nos experimentos com bactéria é mostrada na figura 04. No tratamento “DOM+Cu” (Figura 4A), uma diferença significativa ocorreu entre a concentração de cobre livre inicial e final (teste t, $p < 0.05$). No entanto, as concentrações de cobre total inicial e final não tiveram diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$) (figura 4B). No tratamento “Cu”, a concentração de cobre total final foi significativamente menor do que a inicial (teste t, $p < 0.01$). A figura 4C mostra uma acumulação significativa de cobre (ANOVA, $p < 0.05$) pelas bactérias nos tratamentos onde foi adicionado o metal (DOM+Cu; Cu).

A dinâmica do cobre no experimento com ciliados está documentada na figura 05. Em relação ao cobre livre, as concentrações de cobre final foram estatisticamente (teste t, $p < 0.0001$) menores que as iniciais (Figura 5A) nos tratamentos em que o metal foi adicionado. No entanto, as concentrações de cobre total dissolvido iniciais e finais não apresentaram diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$) em nenhum dos tratamentos. Similarmente ao ocorrido com as bactérias, nos tratamentos onde foram adicionados o cobre (DOM+Cu; Cu) houve uma acumulação estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0.05$) do metal (Figura 5C).

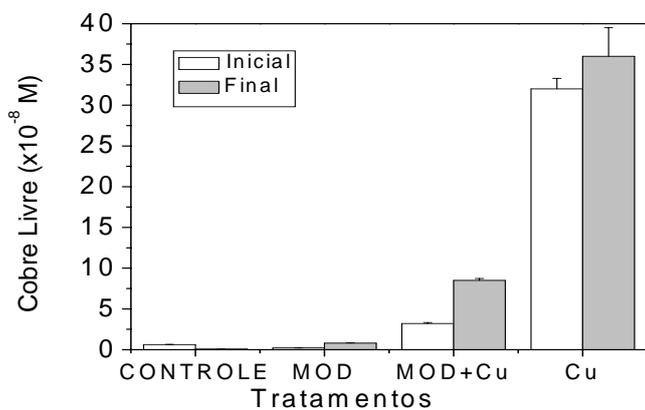
A curva de crescimento populacional dos ciliados nos diferentes tratamentos é mostrada na figura 06. Pode-se observar que o cobre afeta o crescimento dos organismos e que no tratamento “Cu” houve 100% de mortalidade dos indivíduos.

A figura 07 se refere à dinâmica do cobre nos experimentos com o copépode *Metacyclops mendocinus*. A concentração de cobre livre final foi significativamente (teste t, $p < 0.001$) maior do que a inicial, enquanto que não houve diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$) entre as concentrações de cobre total (Figura 7B), em todos os tratamentos. As concentrações de cobre particulado foram similares entre os

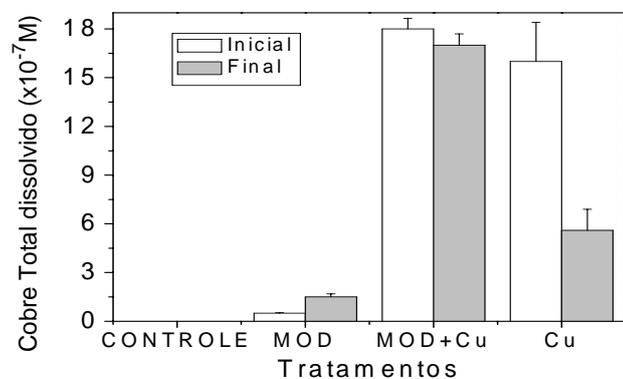
tratamentos (ANOVA, $p > 0.05$), o que sugere que os copépodes podem ser reguladores de cobre.

A figura 08 reporta a mortalidade dos copépodes, a qual foi inferior a 50% para todos os tratamentos.

A)



B)



C)

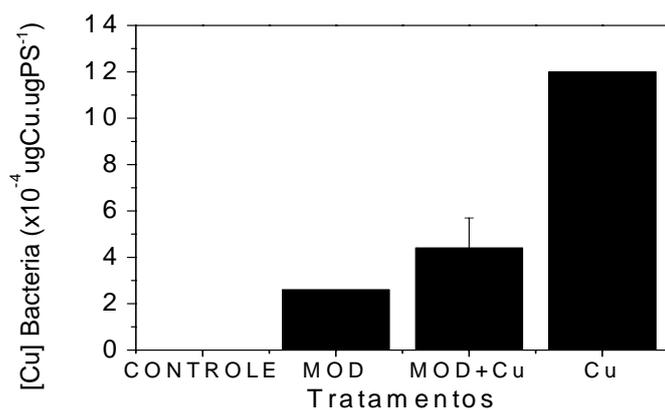
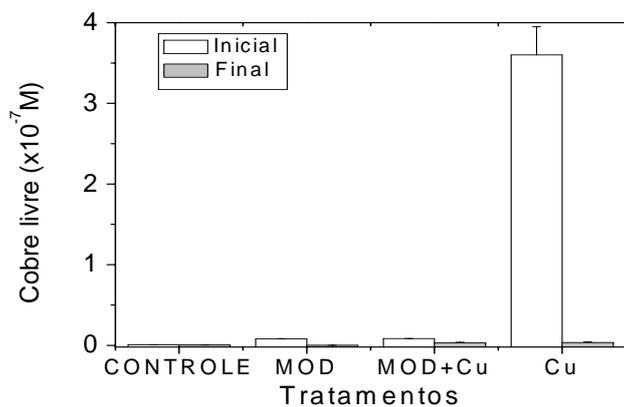
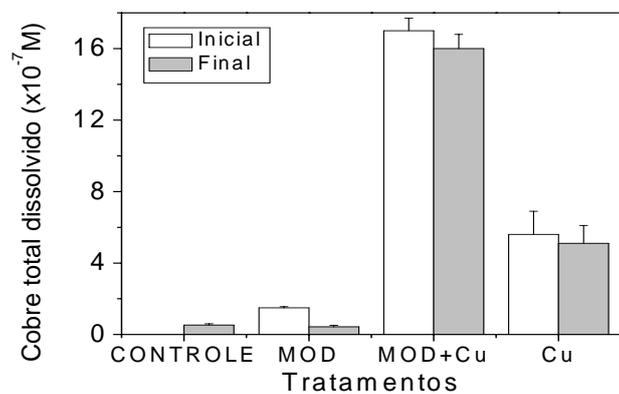


Figura 04 - Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com bactéria: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

A)



B)



C)

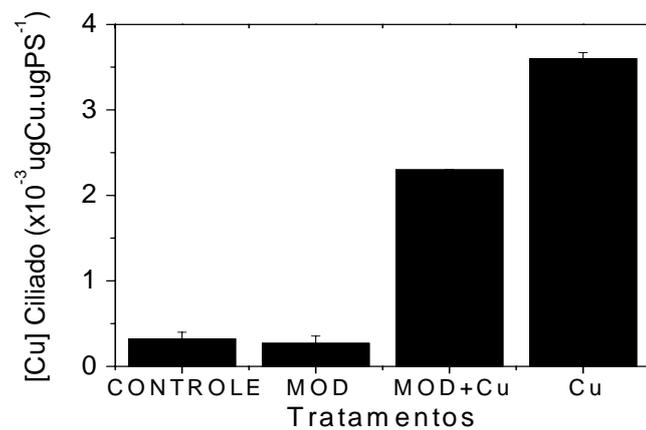


Figura 05 – Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com ciliados: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

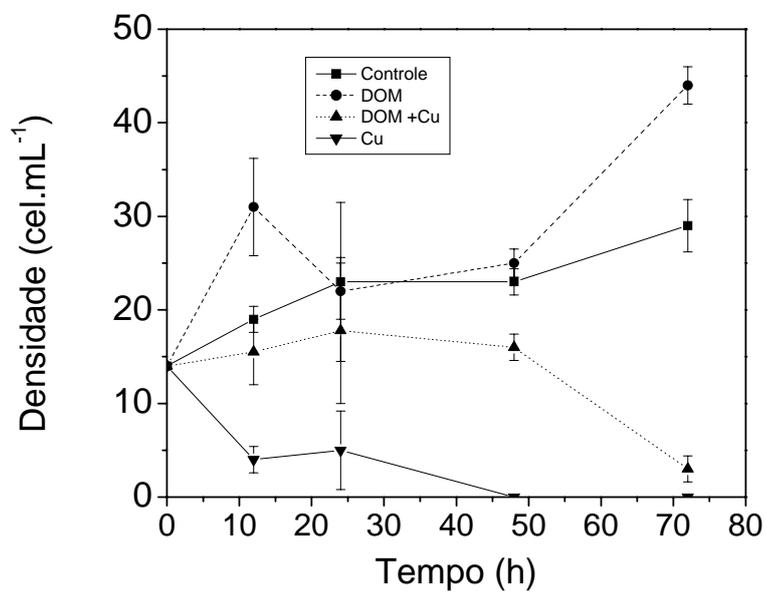
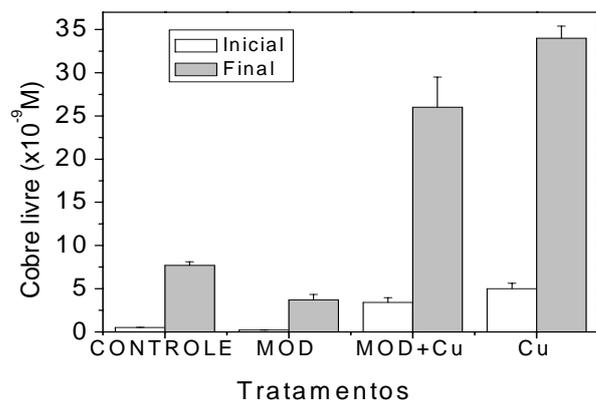
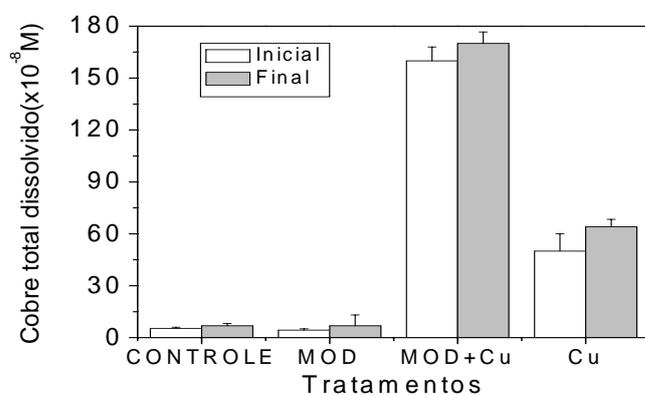


Figura 06 – Curva de crescimento dos ciliados nos diferentes tratamentos. Os valores são a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

A)



B)



C)

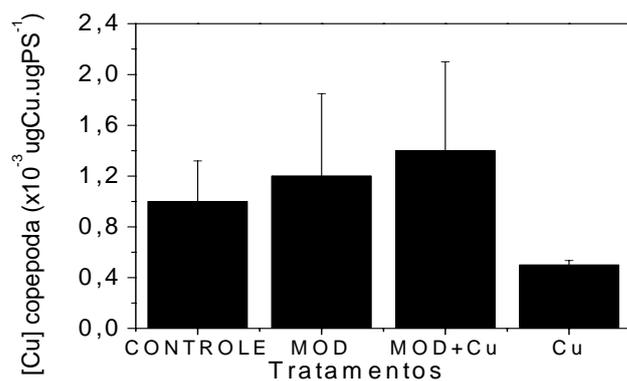


Figura 07 – Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com copépodes: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

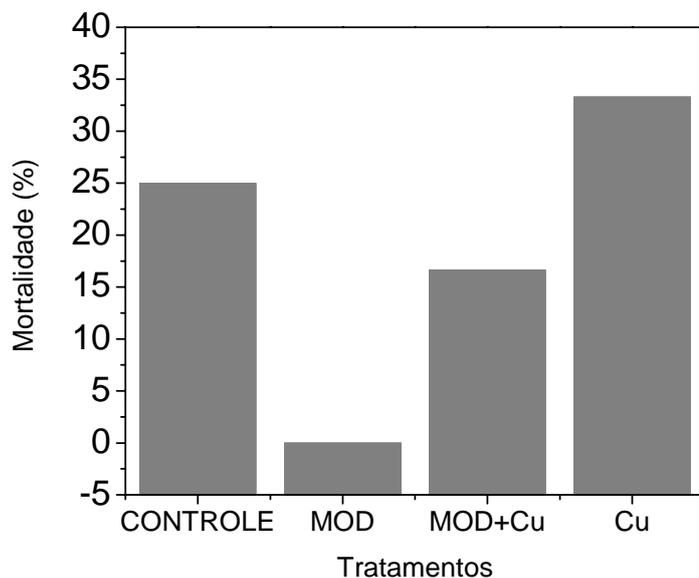


Figura 08 – Porcentagem de mortalidade de *M. mendocinus* adultos como uma função das concentrações de cobre livre e total após 72h de exposição nos diferentes tratamentos.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que o crescimento populacional das bactérias ao final do tempo de incubação (230 h) foi três vezes maior nos tratamentos em que houve adição de MOD em relação à sua ausência. De fato, Capone E Bauer (1992) mostraram que, em ecossistemas aquáticos, as bactérias heterotróficas utilizam a MOD natural como fonte de energia. Tranvik e Sieburth (1989) demonstraram que a MOD, como por exemplo as substâncias húmicas, podem ser degradadas pela população bacteriana. Similarmente ao demonstrado nos nossos resultados, esses

autores encontraram maior densidade bacteriana nas amostras com adição de material orgânico do que na sua ausência.

Os resultados deste estudo demonstraram que a captura de cobre, quantificada como cobre particulado (acumulado e adsorvido) nas bactérias foi maior quando o metal estava presente na forma livre em relação à complexada com a MOD. Esses resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura, onde a menor concentração de cobre livre (Cu^{2+}) detectada em culturas com presença de MOD, sugere uma menor biodisponibilidade do metal (Nogueira et al., 2005; Lombardi et al, 2002; Lores e Pennock, 1999; Lores et al., 1999; Parent et al., 1996).

O maior crescimento bacteriano ocorrido nos tratamentos com cobre pode ser considerado uma indicação de tolerância desses organismos ao metal. Esses dados são similares aos encontrados na literatura (Rosen,1996; Hassen *et al.*, 1998; Mirimanoff e Wilkinson, 2000; Nies, 2003), onde é descrita a tolerância aos metais por bactérias. Hassen *et al* (1998) encontrou tolerância bacteriana ao cobre em concentrações de até $8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, e Mirimanoff e Wilkinson (2000) verificaram tolerância ao zinco por bactérias gram-positivas. De acordo com Nies (2003), a tolerância de metais pesados pela comunidade bacteriana é resultado da ação de vários mecanismos de resistência. Rosen (1996) relatou através de seus estudos que tanto a homeostase do cobre quanto do zinco é mantida por um par de sistemas de transportes, no qual um catalisa a captura do metal, enquanto o outro fica responsável pela sua excreção.

Os resultados aqui obtidos sugerem que o efluxo de cobre foi o mecanismo adotado pelas bactérias como estratégia de tolerância a este metal, pois uma maior concentração de Cu^{2+} final no tratamento DOM+Cu foi encontrada após consumo da DOM. Dados da literatura (Lee et al., 1990; Silver e Phung, 1996; Nies, 2003;

Albergoni *et al.*, 1980; Rosen, 1996) reportam o processo de efluxo como um dos mecanismos mais comum de tolerância utilizados pelas bactérias.

Similarmente ao ocorrido com as bactérias, os resultados deste estudo demonstraram que o cobre acumulado pelos ciliados foi menor no tratamento “DOM+Cu” em relação ao tratamento “Cu”. Uma acumulação duas vezes maior foi quantificada no tratamento “Cu”. Provavelmente, neste caso, uma maior concentração de Cu^{2+} no meio, aliada às bactérias contaminadas com metal e provavelmente consumidas pelos ciliados, contribuíram para uma maior concentração do cobre acumulado por esses organismos. A transferência de metais a partir das bactérias para *P. caudatum* foi descrita por Mansoure-Aliabadi e Sharp (1985), que demonstraram a acumulação de Zn, Ni e Pb por *P. caudatum* após a ingestão de bactérias contaminadas por esses metais.

No presente estudo, os ciliados foram os organismos que apresentaram sensibilidade ao cobre. Uma concentração de $3,6 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ foi capaz de causar 100% de mortalidade nos organismos após 48 h do início do experimento. Os dados da literatura demonstram que a sensibilidade dos ciliados ao cobre é variável e dependente do organismo e das condições experimentais. Mandoni *et al.* (1996) observaram que uma concentração total de cobre de $9,6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ causou 89% de mortalidade na população de protozoários e que 7 das 16 espécies estudadas desapareceram. Coppelloti (1998) reportou que *Euplotes vannus* tolerou uma concentração de cobre total de $3,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e que a acumulação do metal ocorreu após os organismos terem sido expostos a uma concentração total de cobre de $6,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

A permanência dos níveis de cobre acumulado ($10^{-3} \text{ } \mu\text{gCu} \cdot \mu\text{g.peso seco}^{-1}$) em *M. mendocinus* e o aumento de cobre livre no meio após a exposição, sugerem que esses animais podem ser reguladores de cobre. Os níveis de cobre nos organismos

mantiveram-se independentes das concentrações externas do metal. Esses resultados sugerem que, similarmente aos organismos reguladores de metal, *M. mendocinus* possui mecanismos de excreção de metal. Sabe-se que alguns organismos regulam a concentração interna de metal, permanecendo estas dentro de um nível definido (Albergoni, *et al.*, 1980). De acordo com Albergoni *et al.* (1980), dois mecanismos participam da regulação interna de metal: a) decréscimo da internalização através da diminuição da permeabilidade e/ou adsorção na superfície dos organismos e, b) a expulsão do metal de dentro do organismo através de sistemas excretores. Rainbow e Darllinger (1993) demonstraram que tanto os organismos reguladores quanto os excretores possuem moléculas capazes de regular a concentração interna de metais. No entanto, esses autores relatam que, apesar desses processos não serem raros em invertebrados, eles são restritos a certos metais essenciais como o cobre e o zinco.

Através dos resultados deste estudo, pode-se concluir que parte do Cu^{2+} foi regenerado para o meio através do efluxo bacteriano e biodisponibilizado para os outros organismos. O Cu^{2+} foi biomagnificado dentro da cadeia em uma intensidade maior que o cobre complexado na MOD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGONI, V, PICCINI, E, COPPELLOTTI, O Response to heavy metals in organisms- I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metals in *Euglena gracilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 67C, p. 121-127,1980

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for the examination of water and waste water**, 2. ed., Washington: APHA ,1995. 1268pp.

AZAM, F. FENCHEL; J.G.; GRAY; L.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v.10, p. 257-263, 1983.

CAPONE, D.G.; BAUER, J.E Microbial processes in coastal pollution. In: R. Mitchel (ed.) **Environmental Microbiology**. Nova York: Willy-liss, 1992. p.91-238.

CHAU, Y.; GÄCHTER, R.; LUM-SHUE-CHAN, K. Determination of the apparent complexing capacity of lake waters. **J. Fish. Board Can.**, v. 31, p. 1515-1519, 1974.

COPPELLOTTI, O. Sensitivity to copper in a ciliate as a possible component of biological monitoring in the Lagoon of Venice. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 417-425, 1998.

GUILLARD, R. R. L.; LOREZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF M.; BOUDABOUS A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 7-15, 1998.

JARDIM, W.F.; GIMENEZ, S.M.N.; NERY, J.A.S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selective electrodes. In: Anais do Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, V, 1986, São Paulo. p.226-230.

LAWS, A.E. Metals. In : Laws, A.E. **Aquatic pollution** : an introductory text. 3. ed. University of Hawaii: An interscience publishers, 2000. p.351-415.

LEE, B.T.; ROGERS, S.; BERGEMANN, A.; CAMARKS, J.; ROUCH, D. Bacterial response to copper in the environment: Escherichia coli as a model system. In: S.I. GUCER, J.A.C. BROECKAERT (eds) **Metal speciation in the environment**. New York: Springer-Verlag, 1990.

LEPPARD, G.G. (E.d.) Trace element speciation in surface waters and its ecological implications. New York: Plenum Press, 1983, 319p.

LEWIS A.C.; CAVE W.R. The biological importance of copper in oceans and estuaries. **Oceanography and marine Biology annual Review**, v. 20, p. 471-696, 1982

LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W.F. The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 9, p. 1-2, 1997.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). **Phycologia**, v. 37, p. 34-3, 1998.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.H.; SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.M.R.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74 – 78, 2007.

LORES, E.M.; SNYDER R.A.; PENNOCK, J.R. The effect of humic acid on uptake-adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. **Chemosphere**, v. 28, p. 293-310, 1999

LORES, E.M.; PENNOCK, R.J. Bioavailability and trofic transfer of humic- bound copper from bacteria to zooplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 187, 67-85, 1999.

MANDONI, P.; DAVOLI, D.; GORBI, G.; VESCOVI, L. Toxicity effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Research**, v. 30, 135-141, 1996.

MANSOUR-ALLIABADI; SHARP, R.E. passage of selected heavy metals from *Sphaerotilus* (Bacteria: Chlamydo bacterialles) to *Paramecium caudatum* (Protozoa: ciliata). **Water Research**, v. 19, p. 697-699, 1985.

MIRIMANOFF, N.; WILKINSON, J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). **Environmental Science e Technology**, v. 3, 612-622, 2000.

MOREL, F.M.M.; HUDSON, R.J.M.; PRICE, N.M. limitation of productivity by trace metals in the sea. **Limnology and oceanography**, v. 36, p. 1742-1755, 1991.

NIES, D.H. Efflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, 313-339, 2003

NIRAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, v. 50, p. 139-161, 1988.

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolisaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Research**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

OVERBECK, J. e CHRÓST, R.J. editors. **Aquatic microbial Ecology: biochemical and molecular approaches**. Springer-Verlag Inc.: Ann Arbor, Michigan. Science Tech Publishers, 1990.

PARENT, L.; TWISS, M.R.; CAMPBELL, P.G.C. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella* : a test of the free-ion model of trace metal toxicity. **Environmental Science e Technology**, v. 30, p. 1713-1720, 1996.

POMEROY L.R. The ocean's food web, a changing paradigm. **BioScience**, v. 24, n. 9, p. 499-504, 1974.

POMEROY, L.R.; WIEBE, W.J. Energies of microbial food webs. **Hydrobiologia**, v. 159, p. 7-19, 1989.

RAINBOW, P.S.; DALLINGER R. (Eds.) Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrate. In: **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton, FL: Lewis publishers, 1993. p.119-131.

REINFELDER,J.R; FISHER, NS; LUOMA,SN; NICHOLS, JW; WANG,WX Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science Total Environment**, v.219, p.117:135, 1998

ROJAS, N. E. T.; MARINS, M. A.; ROCHA, O. The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* Kurz, 1874 (Crustacea Cladocera) ephippial eggs. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 3, p. 371-376, 2001.

ROSEN, B.P.; BHATTACHERJEE, H.; SHIF, W.P. Mechanism of metalloregulation of an translocating ATPase. **J. Bioenergy and Biomembrane**, v. 27, p. 85-91, 1995.

SCATCHARD, G.; COLEMAN, J.S.; SHEN, A.L. Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.79, p. 12-20, 1957.

SHERR, E.B. Role of microbes in pelagic food web: A revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1225-1227, 1988.

SILVER, S., PHUNG, L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 753-789, 1996.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: RIMA, 2003, 96p.

SNYDER, R.A.; HOCH, M.P. Consequences of orotist-stimulated bacterial production for estimating protist growth efficiencies. **Hydrobiologia**, v. 341, p. 113-123, 1996.

STEINBERG, C.E.; STRUM, A.; KELBEL, J.; LEE, S.K.; HERTKORN N.; FREITAG D.; STOECKER D.K.; SUNDA W.G.; DAVIES L.H. Effects of copper and zinc on two planktonic ciliates. **Marine Biology**, v. 92, p. 21-29, 1986.

SUFFET, I.H.; MACCARTHY, P. **Aquatic humic substances**: influence on fate and treatment of pollutants. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 838.

THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural waters**. Dordrecht, The Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 1985.

TRANVIK, L.A.; SIEBEURTH, J. Effects of flocculated humic matter on free and attached pelagic microorganisms. **Limnology and Oceanography**, v. 34(4), p. 688-699, 1989.

TWISS, R.M.; CAMPBELL, G.C.; AUCLAIR, J.C. Regeneration, recycling, and trophic transfer of trace metals by microbial food-web organisms in the pelagic surface waters of Lake Erie. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 7, p. 1425-1437, 1997.

TWISS, M.R.; RATTAN, K.J.; SHERREL, M.R.; MCKAY, R.M.L. Sensitivity of phytoplankton to copper in lake Superior. **Journal of Great Lakes Research**, v. 30, p. 25-255, 2004.

VIJVER, M.G.; van GESTEL, C.A.M.; LANNO R.P.; van STRAALEN N.M.; PEIJNENBURG, W.J.G.M. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. **Environmental Science e Technology**, V. 38, n. 18, p. 4705-4712, 2004.

VIJVERBERG, J. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. **Freshwater Biology**, v.. 21, p. 317-373,1989.

XU, Y.; WANG, W.X.; HSIEH, D.P.H. Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, V. 20, n. 5, p. 1067-1077, 2001.

Influência de exopolissacarídeos de *Anabaena Spiroides* na biodisponibilidade do cobre
em uma cadeia alimentar aquática

RESUMO

A poluição aquática por metais decorrente principalmente de atividades antrópicas é um problema global. A bioacumulação e a magnificação de metais em cadeias tróficas podem levar à toxicidade para a biota com conseqüências para saúde pública. Tanto a toxicidade quanto a biodisponibilidade dos metais nos ambientes aquáticos sofrem influência da concentração dos materiais orgânicos dissolvidos, dentre eles os exopolissacarídeos originados de microalgas e cianobactérias. Esses compostos formam complexos com os metais e podem ser encontrados em concentrações significantes nos ambientes dulcícolas. Este estudo teve como objetivo principal verificar o efeito de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* na dinâmica do cobre em uma cadeia microbiana. Para tanto, a cadeia alimentar (bactéria → ciliado → copepoda) foi exposta a tratamentos com cobre e exopolissacarídeos em várias combinações. Os resultados demonstraram que a população bacteriana usou o exopolissacarídeo como substrato, mas o cobre complexado não foi disponibilizado dentro da cadeia. O cobre livre foi acumulado pelas bactérias e ciliados. No entanto, efeito tóxico foi observado somente nos ciliados.

INTRODUÇÃO

O aumento das descargas de metais em ambientes aquáticos, resultantes de ações antrópicas, especialmente industriais, tem como consequência alterações no fluxo e distribuição dos metais (Niragu, 1990). O comportamento dos metais em ambientes aquáticos é controlado por características físicas e químicas do elemento, e pelas propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema (Leppard, 1983). A interação destas propriedades irá determinar a forma predominante em que um metal pode ser encontrado no ambiente, o que, por sua vez, determinará seu efeito sobre a biota.

A concentração e tipo de matéria orgânica dissolvida (MOD) são aspectos ambientais importantes em relação ao comportamento dos metais (Lombardi, 1995). Em ambientes dulcícolas, um dos contribuintes da MOD são os polissacarídeos excretados pelo fitoplâncton, os quais podem contribuir de 1 a 30% para a concentração de carbono orgânico dissolvido no ecossistema (Vieira e Myklestad, 1986; Paulsen e Vieira, 1994). Os polissacarídeos apresentam importante significado ecológico, pois, além de seu uso como fonte alimentar para microheterótrofos (Choueri *et al.*, 2007), são constituintes de cápsulas mucilaginosas que envolvem as células de algumas microalgas (Brook, 1981) que, por sua vez, servem de proteção contra predadores (Stutzman, 1995). Além disso, podem atuar como agentes complexantes de metais (Lombardi e Vieira, 1998, 1999, 2000) e constituírem as matrizes para a formação de agregados gelatinosos orgânicos (TEP), os quais podem ser utilizados como substrato por vários organismos (CHO e AZAM, 1988; SIGG *et al.*, 1987).

A acumulação de metais por invertebrados é definida como a captura do metal menos sua eliminação pelo organismo. No entanto, há uma fração de metais que pode ser passivamente adsorvida ao exoesqueleto. A captura dos metais dissolvidos no meio ocorre quando estes se ligam às proteínas de membrana e são transportados para o

interior das células. A ligação do metal traço com a proteína de transporte na membrana ocorre com o metal na forma iônica, que é a espécie química de maior biodisponibilidade (Rainbow e Darllinger, 1993a). Ainda, de acordo com Reinfelder *et al.* (1998), os metais podem ser capturados pelos organismos através da ingestão de alimento contaminado. Dentro das células, os metais podem se ligar à macromoléculas biologicamente importantes causando assim danos celulares (Laws, 2000).

Os microorganismos heterotróficos são competidores entre si e, sendo redutores dos recursos de carbono, afetam o metabolismo do ecossistema aquático como um todo (Sherr e Sherr, 1988; Azam *et al.*, 1983; Pomeroy, 1974). Através do processo de degradação da MOD, os microheterótrofos podem transferir tanto o carbono orgânico, quanto disponibilizar os micro e macroelementos associados ao carbono para outros níveis tróficos (Overbeck e Chróst, 1990). Assim, a degradação microbiana tem por conseqüência a disponibilização de nutrientes para outros níveis tróficos ou seu retorno aos produtores primários (Pomeroy e Wiebe, 1988), fato conhecido como alça microbiana (“microbial loop”).

Dentre outras, a importância ambiental da relação MOD – metais reside principalmente na alteração da especiação do elemento químico e, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade e toxicidade à biota (Morel *et al.*, 1991; Rainbow e Dallinger, 1993; Laws, 2000; Nogueira *et al.*, 2005;). Os polissacarídeos algais apresentam natureza predominantemente hidrofílica e comportam-se similarmente à MOD em relação aos elementos metálicos, alterando sua biodisponibilidade (Lombardi *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 2007).

Estudos sobre a biodisponibilização de metais à partir da interação do complexo MOD – metal e atividade de microorganismos heterotróficos mostram que, dependendo

do organismo e tipo de MOD, essa interação pode tanto reduzir quanto aumentar a biodisponibilidade desses elementos (Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999).

Em ambientes eutrofizados, os polissacarídeos algais e de cianobactérias podem constituir fração significativa da MOD. Considerando que os ambientes eutrofizados são comuns nos dias atuais, o estudo da interação polissacarídeos – metais apresenta considerável significado ecológico e vem contribuir com informações sobre a dinâmica de metais em ecossistemas eutróficos.

OBJETIVO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da degradação bacteriana sobre os polissacarídeos excretados pela cianobactéria *Anabaena spiroides* na biodisponibilização e destino do cobre dentro de uma cadeia alimentar aquática (bactérias heterotróficas → ciliados → copépode) e suas implicações ecotoxicológicas sobre os três grupos de organismos especificados. Assim, foi determinado o fluxo de cobre a partir dos polissacarídeos através de experimentos de predação e especiação de cobre em cada elo da cadeia.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. COBRE

Cobre foi o metal utilizado nos experimentos desta proposta numa concentração de 1×10^{-6} mol.L⁻¹ (1 mg mL⁻¹ CuCl₂, Titrisol, Merck). Sua escolha baseou-se no fato de que em concentrações naturais atua como um micronutriente requerido ao crescimento saudável dos organismos, enquanto que em concentrações pouco mais elevadas este metal é tóxico (Lewis e Cave, 1982). Além do fato de que, o cobre é um metal que tem considerável afinidade com MOD em geral, inclusive polissacarídeos de origem algal,

como tem sido demonstrado na literatura (Chau *et al.*, 1974; Lombardi e Jardim, 1996; Lombardi e Vieira, 1998, 1999, 2000; Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999; Lombardi *et al.*, 2002, 2007).

2. ORGANISMOS

2.1. CULTIVO DE *ANABAENA SPIROIDES* E EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os experimentos de laboratório foram conduzidos utilizando-se polissacarídeos excretados por *Anabaena spiroides* em uma concentração de 40 mg L⁻¹, o que corresponde à concentração de 15mg. L⁻¹ de carbono orgânico. De acordo com Thurman (1985), em águas continentais, a concentração de MOD encontra-se em um limite entre 1 - 15 mg C.L⁻¹. Sendo que concentrações de MOD na faixa de 10-15 mgL⁻¹ são características de ambientes eutrofizados. Os experimentos foram efetuados usando-se água reconstituída (APHA, 1998). A água foi autoclavada a 120 °C por 30 min para esterilização. A concentração de carbono orgânico dissolvido foi determinada utilizando-se um analisador de carbono (TOC-5000 Shimadzu - Japão).

O cultivo de *Anabaena spiroides* foi feito em garrações com capacidade para 10 L. Foram preparados 7 L de meio ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964) tamponado com 500 mg L⁻¹ de tampão TRIS em pH 7,0. O meio foi autoclavado por 30 min a 120 °C. Após resfriado, foi inoculado com 15 mL de cultura da cianobactéria em fase exponencial de crescimento. A cultura foi mantida em sala com temperatura controlada (23 °C ± 1) e fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro. As culturas foram gentilmente aeradas utilizando-se ar filtrado. Condições assépticas foram mantidas em todas as fases experimentais.

Os polissacarídeos extracelulares provenientes de *Anabaena spiroides* são aqueles excretados e encontrados dissolvidos no meio de cultura. As culturas tiveram suas células separadas no início da fase estacionária através de filtração tangencial em

cartuchos de fibras ocas com poros de 0,65 μm . O filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C e dialisado em membranas com poro de 14 Kd durante quatro dias em água destilada, para a remoção dos sais. A fração assim obtida conteve materiais orgânicos de alta massa molecular, os exopolissacarídeos, os quais foram liofilizados e armazenados em freezer e no escuro até o momento do uso, não excedendo o tempo de 10 dias.

2.2. BACTERIOPLÂNCTON

A população bacteriana foi obtida do ambiente natural, Reservatório do Monjolinho na UFSCar. A água coletada do ambiente natural (tréplicas de 500 mL) foi filtrada em filtro GF/C (Whatman) para retirada de predadores e, posteriormente, filtrada em filtros com poros de 0,2 μm (Gelman GA-8) para retenção das bactérias. O filtro com a população bacteriana foi inoculado em água reconstituída (APHA, 1995) (500 mL). Não houve cultura-estoque para a comunidade bacterioplanctônica, uma vez que o cultivo em laboratório poderia selecionar espécies ignorando aquelas com maior eficiência na assimilação de polissacarídeos. As coletas foram realizadas na época da experimentação, procurando-se trabalhar sempre na mesma estação do ano para evitar variação na população de bactérias. Durante o experimento, a comunidade bacterioplanctônica foi mantida em sala com temperatura controlada de 25 °C \pm 2, no escuro e sob agitação constante (60 – 100 rpm) (Tranvik e Sieburth, 1989) em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109, Brasil). Toda a manipulação dos frascos experimentais foi realizada em fluxo laminar (Pachane, Brasil) dotado de luz ultravioleta para minimizar contaminações.

2.3. CILIADO

O ciliado escolhido para ser estudado no presente trabalho foi o *Paramecium caudatum*. Esta espécie é de fácil adaptação às condições de cultivo em laboratório, é comumente encontrado no Reservatório do Monjolinho e sua alimentação é basicamente constituída de bactérias. Eles possuem grande capacidade reprodutiva e são o elo de ligação trófica entre bactérias e metazooplâncton, atuando assim no fluxo de carbono e outros elementos minerais dentro da cadeia alimentar.

Para obtenção dos organismos, a água foi coletada do ambiente natural e concentrada em rede de 20 µm de abertura de malha. No laboratório, os organismos foram triados por capilaridade com auxílio de uma pipeta Pasteur (técnica de microaspersão) sob microscópio óptico (Leica DMLS). Os ciliados foram mantidos no laboratório em água reconstituída enriquecida com pó de alface, grãos de arroz e levedura, sob condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e foto-período de 12/12 h luz/escuro (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003). A cada três dias a água de cultivo era renovada.

2.4. COPEPODA

Como organismo topo da cadeia alimentar neste estudo, o Copepoda Cyclopoida, *Metacyclops mendocinus* foi o animal escolhido. Esses organismos são predadores, possuem hábitos alimentares variados e servem como fonte alimentar para muitos animais (Vijverberg, 1989). Além disso, os copépodes são importantes na regeneração de nutrientes como nitrogênio, fósforo, carbono, dentre outros microelementos (O'Doherty, 1985).

O zooplâncton foi coletado do ambiente natural com o auxílio de rede de plâncton de 68 µm de abertura de malha, fazendo-se arrastos horizontais e verticais. Os organismos

foram acondicionados em galões de polietileno com água do próprio ambiente para o transporte. No laboratório, a espécie escolhida foi triada e aclimatada. O uso de populações monoclonais foi evitado, procurando-se sempre cultivar uma amostra representativa da população. Para os cultivos, foram seguidas as recomendações feitas por Vijverberg (1989).

Os organismos foram mantidos em aquários com capacidade de 60 L, com água do próprio ambiente filtrada em filtros GF/C (Whatman), com aeração constante em sala climatizada à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e foto-período 12/12 h luz/escuro. O copépode foi alimentado com uma solução feita de água reconstituída enriquecida com o protozoário *P. caudatum*, ração de peixe fermentada com levedura na proporção 1:1 (Rojas *et al.*, 2001), e alga cultivada no laboratório, à concentração de 10^5 cél.mL^{-1} (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003). As algas usadas como fonte alimentar ao zooplâncton foram *Scenedesmus sp* e *Chlamydomonas sp* cultivadas em meio W.C. (Guillard e Lorenzen, 1972) e fornecidas aos animais quando em fase exponencial de crescimento.

3. DESENHO EXPERIMENTAL

A cadeia microbiana (bactéria → ciliado → copépode) foi exposta aos tratamentos adição de cobre (“Cu”), adição de polissacarídeo (“MOD”), adição de polissacarídeos e cobre (“MOD+Cu”) e o controle constituído água reconstituída sem adição de matéria orgânica dissolvida e sem adição de cobre. Cada tratamento foi realizado com 3 réplicas. Primeiramente, foi realizado o experimento com a população bacteriana, onde após crescimento da mesma, *P. caudatum* foi introduzido e, posteriormente, o *M. mendicinus*, como mostrado a seguir.

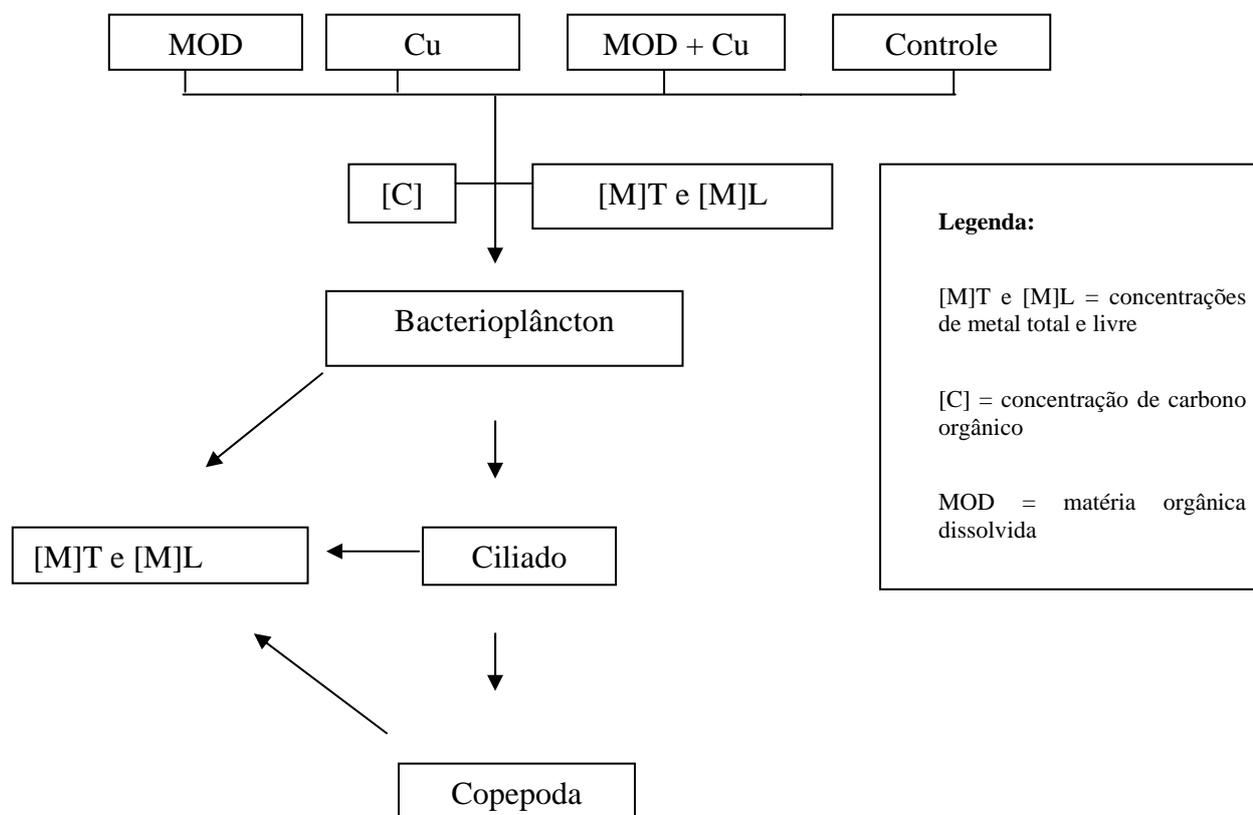


Figura 01 – Fluxograma ilustrando o desenho experimental utilizado no experimento de avaliação da biodisponibilidade ao longo da cadeia alimentar microbiana.

4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE

4.1. COBRE LIVRE

O cobre livre, conhecido também como cobre hidratado ou iônico foi determinado através da técnica de potenciometria, usando-se eletrodo seletivo ao íon cobre (ANALION, SP - Brasil). O eletrodo seletivo ao íon cobre foi utilizado conjuntamente com um eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção (ANALION, SP - Brasil). A temperatura de 25 °C foi mantida constante durante a determinação. A força iônica das amostras foi ajustada para 0,1 M com NaNO₃. O tempo de equilíbrio para as determinações de cobre livre variou de acordo com a resposta do eletrodo, entre 4 h para

uma concentração de 10^{-8} M e 20 min. para concentrações da ordem de 10^{-6} M de íons cobre livre nas amostras. A calibração do sistema foi realizada utilizando-se tampões metálicos de acordo com os procedimentos descritos em Jardim *et al.* (1986) e Lombardi *et al.* (2007).

4.2. COBRE TOTAL

Cobre total dissolvido inclui todas as espécies de cobre presentes em uma amostra. Neste trabalho, as determinações de cobre total dissolvido na água de cultivo foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica (VARIAN, Spectra A.A 220, Austrália), após terem sido fixadas com HNO_3 em uma concentração final de 2,0 M.

Para a determinação do cobre total nos organismos (cobre total particulado), ao final dos experimentos, esses foram transferidos para filtros de acetato celulose previamente numerados e pesados em balança microanalítica (Sartorius MC21S, Alemanha). Posteriormente, os filtros contendo os organismos foram colocados em estufa a uma temperatura de 60°C por 48 h. Após este procedimento, esses filtros foram pesados novamente para estimativa de peso seco e transferidos para frascos de policarbonato onde foi feita digestão ácida adicionando-se 2,0 mL de HNO_3 concentrado em cada amostra. As amostras contendo os organismos e HNO_3 foram então transferidas para uma estufa de secagem a 90°C , onde permaneceram por mais 48 h (Lores *et al.*, 1999). Após digestão, o volume da amostra foi completado para 50 mL com água deionizada, para posterior determinação em espectrofotômetro de absorção atômica com auxílio de forno de grafite.

5. EXPERIMENTOS DE DINÂMICA DO COBRE ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS ORGANISMOS, E O COMPLEXO MOD-CU

No início dos experimentos foram tomados alguns cuidados:

- a. Para a realização dos experimentos foram utilizados exclusivamente frascos de policarbonato, lavados previamente com HNO₃ 1.0 M;
- b. Tudo o que foi adicionado aos frascos experimentais teve seu volume especificado, para que a diluição do metal fosse considerada posteriormente;

5.1. INTERAÇÃO POLISSACARÍDEO- CU E BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

Um inóculo da população natural de bactérias coletada como descrito no item 2.2, foi submetido aos tratamentos (Cu, MOD, Cu+MOD e controle) em três réplicas. O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente através de leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 640 nm. Após o crescimento, parte da cultura (100 mL) foi separada, filtrada em filtros com poros de 0,2 µm (Gelman GA-8) para retenção das bactérias e o filtrado foi submetido à determinação de íons cobre livre (30 mL), cobre total dissolvido (20 mL) e carbono orgânico total - TOC (50 mL), enquanto que o filtro contendo as bactérias foi preparado para análise de metal total particulado. Os 400 mL restantes foram distribuídos em placas de policarbonato multiescavadas, onde em cada orifício (10 mL) foram adicionados os ciliados como descrito a seguir.

5.2. INTERAÇÃO POLISSACARÍDEO- CU-BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E CILIADOS

A água de cultivo (100 mL) estoque contendo os ciliados *P. caudatum* foi filtrada com auxílio de rede de 10 µm de abertura de malha e os organismos retidos foram re-suspendidos em água reconstituída. Uma alíquota da água de cultivo de 1,0 mL foi retirada e fixada com lugol para contagem dos organismos (Lores *et al.*, 1999). Um inóculo de 1,0 mL da cultura de *P. caudatum* foi adicionado à cada reservatório das

placas multiescavadas contendo a cultura bacteriana de cada tratamento. Após 72 h, parte da cultura (100 mL de cada réplica experimental) foi filtrada em membrana durapore com 5 µm de diâmetro de poro (Millipore) para retenção dos protozoários. O filtrado foi separado para determinação de íons cobre livre (80 mL) e cobre total dissolvido (20 mL), enquanto o filtro contendo os ciliados foi preparado para análise de cobre total particulado. Os 300 mL de água de cultivo restantes foram usados no experimento seguinte, onde os copépodes foram adicionados. As taxas de crescimento dos ciliados foram avaliadas através de contagem em lâmina de Sedgewick-Rafter. Para tanto, alíquotas de 1mL das culturas foram retiradas diariamente e fixadas com lugol.

5.3. INTERAÇÃO POLISSACARÍDEO-CU-BACTÉRIAS-CILIADO E COPÉPODES

Em cada reservatório das placas de policarbonato (10 mL) contendo os organismos dos níveis tróficos inferiores, foram adicionados 2 copépodes adultos. Após 72 h, os copépodes foram retirados e os sobreviventes contados. Os organismos vivos foram preparados para análise de cobre particulado e as amostras, então sem os copépodes, foram filtradas em filtros de acetato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro. Parte do filtrado foi preparado para análise de íons cobre livre (30 mL) e a outra parte preparada para determinação de cobre total dissolvido (20 mL).

RESULTADOS

A densidade bacteriana em função do tempo experimental é mostrada na figura 02. Observa-se que, em todos os tratamentos, foi detectado crescimento bacteriano, no entanto na presença dos exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* quer na ausência ou presença de cobre, o crescimento foi ligeiramente superior. Como mostrado na Tabela 01, as bactérias consumiram cerca de 7 mg C.L⁻¹, totalizando uma média de consumo de

aproximadamente 39% do total de carbono durante o crescimento. Esses resultados demonstram que as bactérias foram capazes de degradar os polissacarídeos produzidos por *Anabaena spiroides* e que a presença de cobre não inibiu o crescimento da comunidade bacteriana.

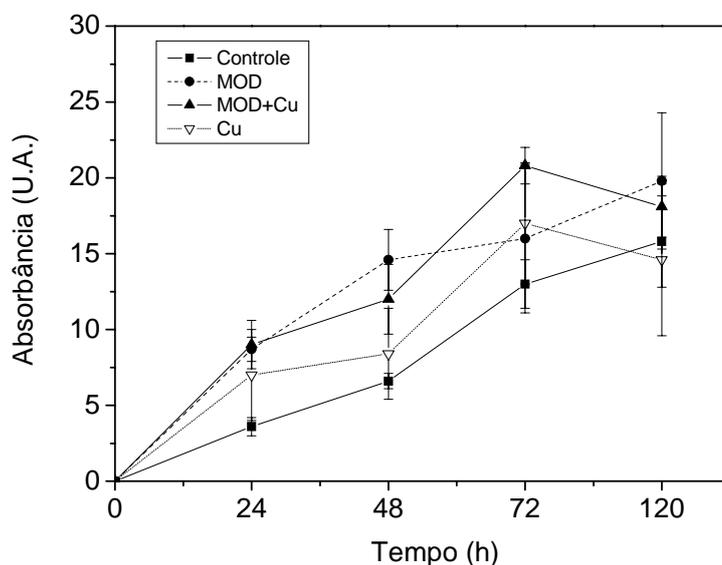


Figura 02- Curva de crescimento da população bacteriana quantificada através de densidade óptica em 640 nm (x 1000). Os valores representam média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

Tabela 01- Concentrações de carbono orgânico (mg.L^{-1}) antes e após o crescimento bacteriano nos tratamentos com adição de polissacarídeos (MOD, MOD+Cu).

Amostra	MOD			MOD+Cu		
	Inicial	Final	Consumido	Inicial	Final	Consumido
A	22,64	19,77	11,18	14,43	11,18	2,87
B	15,84	7,7	9,5	22,53	9,5	8,14
C	15,16	9,3	8,2	16,86	8,2	5,86
Média \pm DV	17,9 \pm 4,1	12,3 \pm 6,6	9,6 \pm 1,5	17,9 \pm 4,2	9,6 \pm 1,5	5,6 \pm 2,6

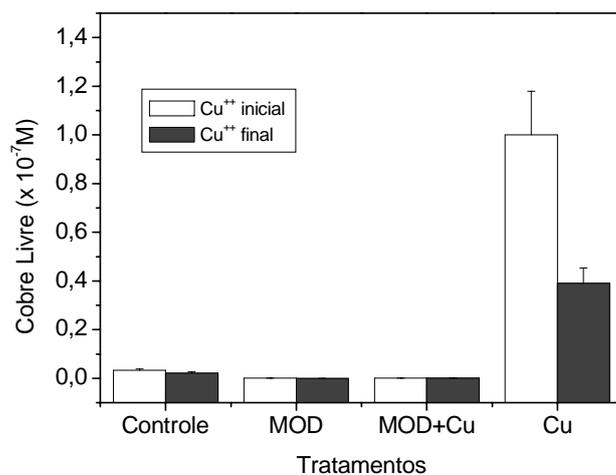
A dinâmica do cobre nos experimentos com as bactérias é mostrada na figura 03. No tratamento “Cu”, a concentração de íons cobre livre (Figura 3A) e cobre total dissolvido (Figura 3B) ao início dos experimentos foram estatisticamente superiores à concentração detectada ao final (teste t, $p < 0.05$). No entanto, considerando os outros tratamentos não foram detectadas diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$) para as concentrações de cobre, quer íons livre ou total. A figura 3C mostra uma acumulação significativa de cobre (ANOVA, $p < 0.05$) nas bactérias no tratamento onde foi adicionado o metal sem a presença dos exopolissacarídeos.

A dinâmica de cobre no experimento com ciliados está documentada na figura 04. Em relação ao metal livre, no tratamento “Cu”, a concentração de cobre final foi estatisticamente (teste t, $p < 0.05$) menor que a inicial (Figura 4A), enquanto que nos outros tratamentos não houve diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$). Em relação ao cobre total dissolvido, nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas entre as concentrações iniciais e finais (teste t, $p > 0.05$) de cobre. Similarmente ao ocorrido com as bactérias, no tratamento onde foi adicionado cobre sem exopolissacarídeo (“Cu”) houve uma acumulação estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0.05$) do metal (Figura 5C), com 100% de mortalidade dos indivíduos.

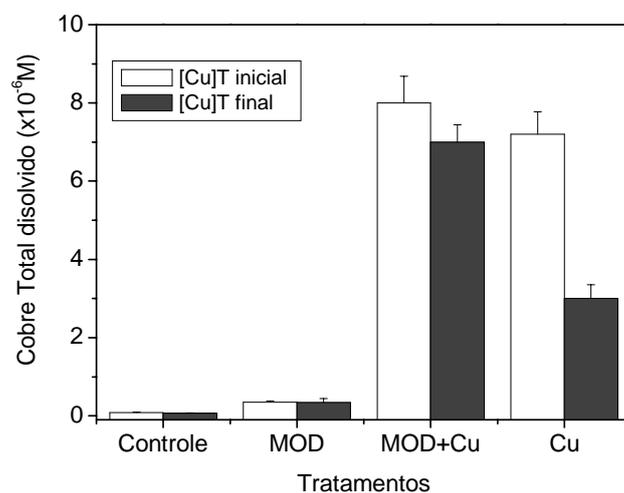
A curva de crescimento dos ciliados nos diferentes tratamentos é mostrada na figura 05 e mostra que o cobre interferiu no crescimento dos organismos.

A figura 06 refere-se à dinâmica do cobre nos experimentos com o copépode *Metacyclops mendocinus* e mostra que a concentração final de íons cobre livre foi significativamente (teste t, $p < 0.001$) menor do que a inicial. Por outro lado, não houve diferenças significativas (teste t, $p > 0.05$) entre as concentrações de cobre total dissolvido em nenhum dos tratamentos (Figura 6B). As concentrações de cobre particulado foram similares entre os tratamentos (ANOVA, $p > 0.05$).

A)



B)



C)

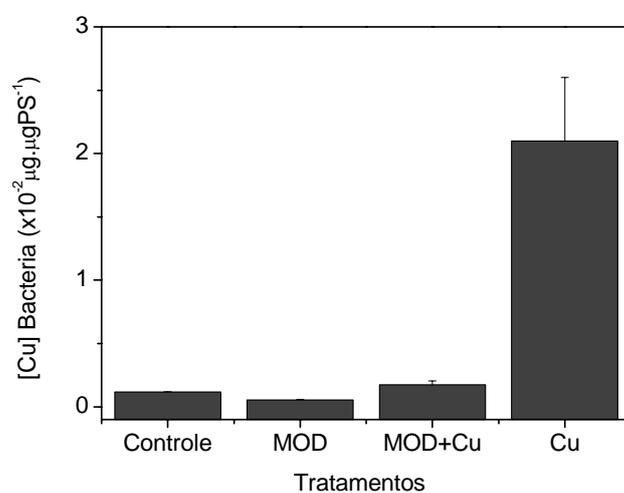
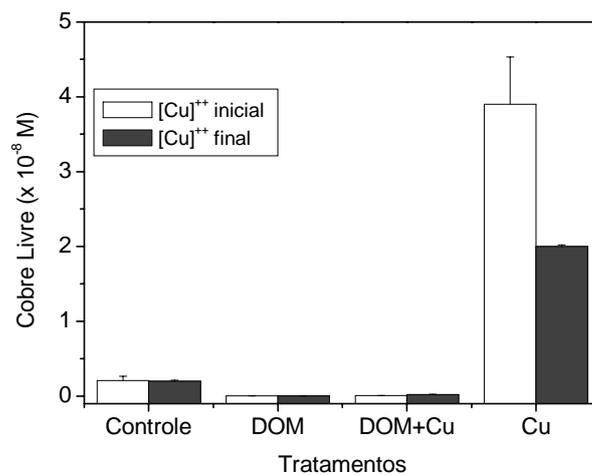
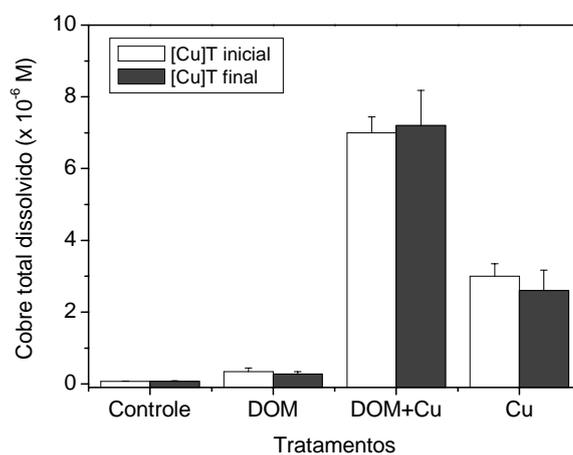


Figura 03- Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com bactéria: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm SD de três replicas experimentais.

A)



B)



C)

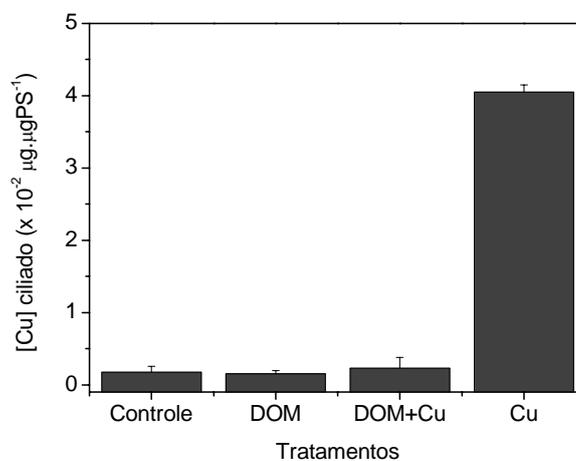


Figura 04- Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com ciliados: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm SD de três replicas experimentais.

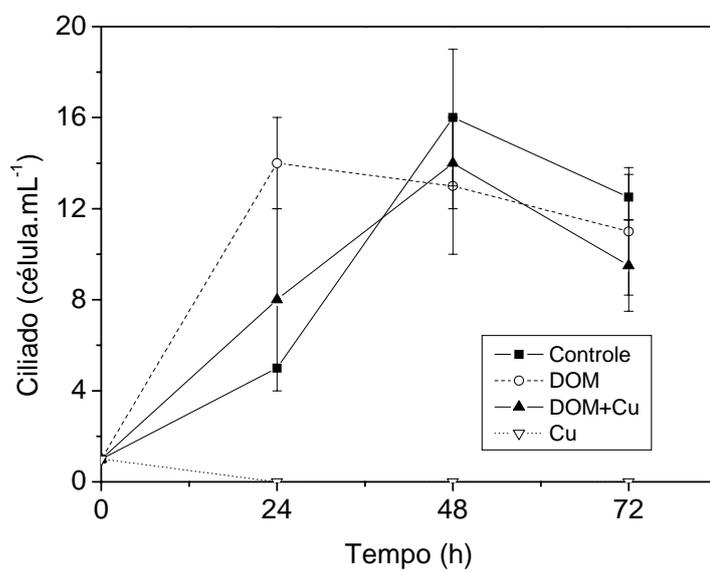
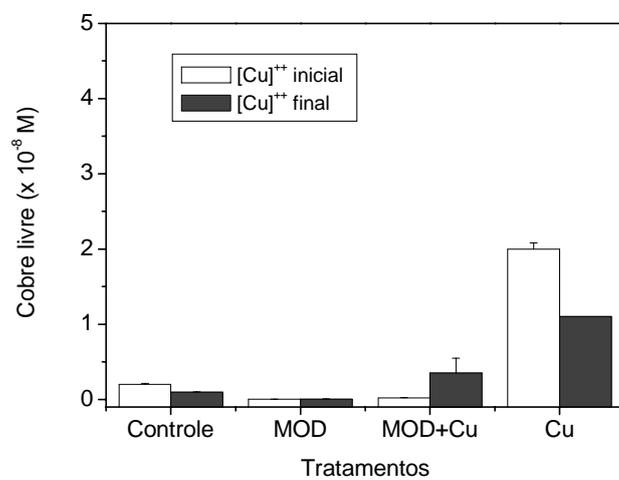
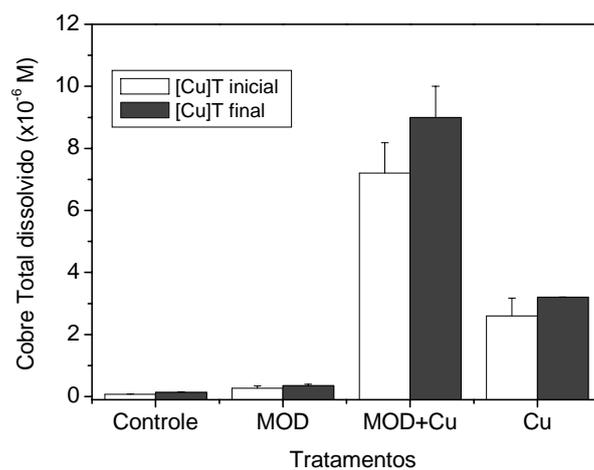


Figura 05- Curva de crescimento dos ciliados nos diferentes tratamentos. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

A)



B)



C)

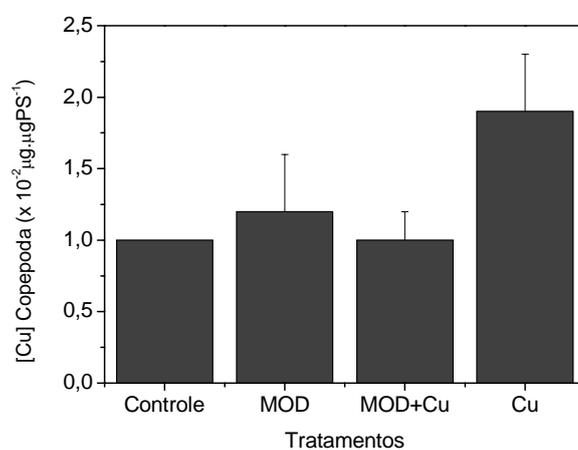


Figura 06- Concentrações de cobre particulado e dissolvido nos experimentos com copépodes: (A) Cobre livre; (B) Cobre total dissolvido; (C) Cobre particulado. Os valores são a média \pm desvio padrão de três replicas experimentais.

DISCUSSÃO

A dinâmica do cobre nos experimentos mostrou que na presença do exopolissacarídeo, houve uma redução significativa de íons cobre livre, diferentemente daquele obtido nos experimentos sem o material orgânico, o que demonstra o seqüestro do cobre pelo exopolissacarídeo. Estudos encontrados na literatura estão de acordo com estes resultados e confirmam que exopolissacarídeos e materiais orgânicos de baixa massa molecular produzidos por microalgas são capazes de associar-se ao cobre e outros metais (Lombardi e Vieira, 1999; Lombardi e Vieira, 2000; Gouvêa *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2005), exercendo desse modo significativo papel ambiental em relação à especiação e disponibilização de metais.

O crescimento bacteriano obtido neste estudo, foi maior nos tratamentos em que houve adição de exopolissacarídeo em relação à sua ausência. O consumo de polissacarídeos excretados por *Anabaena spiroides* por bactérias heterotróficas já foi comprovado por Colombo *et al.* (2004). Capone e Bauer (1992) mostraram que em, ecossistemas aquáticos, as bactérias heterotróficas utilizam a MOD natural como fonte de energia. Tranvik e Sieburth (1989) demonstraram que a matéria orgânica, como por exemplo, as substâncias húmicas, podem ser degradadas pela população bacteriana. Similarmente ao demonstrado nos nossos resultados, esses autores encontraram maior densidade bacteriana em amostras com adição de material orgânico do que em sua ausência.

Nesta pesquisa, a captura de cobre pelas bactérias, quantificada como cobre particulado (acumulado e adsorvido), ocorreu em maior quantidade quando o metal estava presente na forma livre. Na forma complexada, não houve acúmulo significativo do metal nos organismos. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados

na literatura, os quais mostram que íons cobre livre (Cu^{2+}) é uma das formas químicas do metal que se encontra biodisponível, tanto para adsorção na superfície celular dos organismos como também para absorção pelos mesmos (Lores e Pennock, 1999; Lores *et al.*, 1999; Parent *et al.*, 1996 Lombardi *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2005).

Provavelmente, o cobre complexado no exopolissacarídeo não foi capturado pelas bactérias devido ao pouco tempo de incubação, onde somente 39% do material foi degradado. De acordo com Colombo *et al.* (2004), a composição monomérica dos polissacarídeos de *Anabaena spiroides* é 29,3% de glicose, 24,2% de manose, 21,9% de raminose, 7,8% de xilose, 6,6% de ácido glicurônico, 5,6% de fucose, 2,0% de galactose, 1,8% de ácido galacturônico e 0,8% de arabinose. De acordo com esses autores, o consumo dos polissacarídeos pelas bactérias heterotróficas é caracterizado por duas fases. A primeira, de degradação mais rápida, acontece nos 5 dias iniciais de incubação, onde a maior atividade enzimática ocorre para a glicose, que são monossacarídeos de pouca capacidade complexométrica com o cobre. Ao término desta fase ocorre sucessão bacteriana, onde inicia-se uma segunda fase de degradação do polissacarídeo, mais lenta que a primeira. Nos estudos de Colombo *et al.* (2004), 29 dias de incubação foram necessários para que todo o polissacarídeo fosse degradado pelas bactérias.

O crescimento bacteriano ocorrido no tratamento com concentração de cobre livre de $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ pode ser considerado uma indicação de tolerância desses organismos ao metal. A tolerância bacteriana aos metais tem sido mostrada na literatura (Rosen, 1996; Hassen *et al.*, 1998; Mirimanoff e Wilkinson, 2000; Nies, 2003). Hassen *et al.* (1998) encontrou tolerância bacteriana ao cobre total dissolvido em concentrações de até $8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Mirimanoff e Wilkinson (2000) verificou tolerância ao zinco por bactérias gram-positivas. De acordo com Nies (2003) a tolerância aos metais pesados

pela comunidade bacteriana é resultado da ação de vários mecanismos de resistência, dentre elas pode-se citar o acúmulo intracelular de metal através do seu sequestro por moléculas quelantes, impedindo-os de atingir sítios vitais, associação com a parede celular, mecanismos de volatilização do metal, e efluxo. Rosen (1996) relatou, através de seus estudos, que tanto a homeostase do cobre quanto a do zinco são mantidas através de dois sistemas de transportes, no qual um é responsável pela captura do metal, enquanto o outro pela sua excreção ou efluxo.

Similar ao ocorrido com as bactérias, os resultados deste estudo demonstraram que o cobre acumulado pelos ciliados ocorreu no tratamento em que o cobre foi adicionado sem a presença do exopolissacarídeo. Uma acumulação doze vezes maior foi quantificada no tratamento “Cu” em relação ao tratamento “DOM+Cu”. Neste caso, uma concentração de Cu^{2+} de $3,9 \times 10^{-8} \text{ mol. L}^{-1}$ que permaneceu no meio após o crescimento bacteriano, aliada às bactérias contaminadas ($2,1 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{g Cu} \cdot \mu\text{g PS}^{-1}$) e utilizadas como fonte alimentar pelos ciliados, foram os fatores que ocasionaram a toxicidade nesses organismos. A transferência de metais de bactérias para *P. caudatum* foi descrita na por Mansoure-Aliabadi e Sharp (1985), que mostraram a acumulação de Zn, Ni e Pb após a ingestão de bactérias contaminadas por esses metais.

Os dados da literatura demonstram que a sensibilidade dos ciliados ao cobre é variável e dependente do organismo, das condições experimentais e da forma do metal ao qual o organismo é exposto. Mandoni *et al.* (1996) observou que uma concentração de cobre total de $9,6 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ causou 89% de mortalidade na população de protozoários e que 7 das 16 espécies estudadas desapareceram. Coppelloti (1998) reportou que *Euplotes vannus* tolerou uma concentração de cobre de $3,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e que a acumulação do metal ocorreu após os organismos terem sido expostos a uma concentração de $6,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Stoecker *et al* (1986) demonstrou que uma

concentração de 10^{-10} mol.L⁻¹ Cu²⁺ causou mortalidade em *Favella sp* e *Balanion sp* em 5 h de exposição, enquanto que 1.6×10^{-13} mol.L⁻¹ Cu²⁺ foi suficiente para diminuir a taxa de crescimento em exposições mais longas. Shakoory *et al.* (2004) demonstrou resistência em *Vorticella microstoma* em uma concentração de 3.4×10^{-3} mol.L⁻¹ Cu²⁺.

Os resultados deste estudo sugerem que o cobre associado ao exopolissacarídeo pode não ter sido disponibilizado através da degradação bacteriana, e o cobre livre detectado no experimento referente ao final da cadeia trófica (2×10^{-8} mol.L⁻¹ Cu²⁺) não foi acumulado por *M. mendocinus*. Este fato pode ser decorrente de uma capacidade reguladora de metal exibida por *M. mendocinus*. Sabe-se que alguns organismos regulam a concentração interna de metal, permanecendo estas dentro de um nível definido (Albergoni, *et al.*, 1980). De acordo com Albergoni *et al.* (1980), dois mecanismos participam da regulação interna de metal, o decréscimo da internalização através da diminuição da permeabilidade e/ou absorção na superfície dos organismos e, a expulsão do metal de dentro do organismo através de sistemas excretores. Rainbow e Darllinger (1993) demonstraram os organismos reguladores possuem moléculas capazes de regular a concentração interna de metais. No entanto, esses autores relatam que apesar desses processos não serem raros em invertebrados, eles são restritos a certos metais essenciais como o cobre e zinco.

Os resultados deste estudo demonstraram que o cobre associado ao exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* não é acumulado pelos organismos e que íons cobre livre foi acumulado em maior quantidade pela população bacteriana e pelo ciliado. O organismo zooplancônico *M. mendocinus* não acumulou íons cobre livre, nem tampouco o cobre associado ao exopolissacarídeo, sugerindo ser regulador do metal. Estes resultados apresentam importante significado ecológico, pois tanto o ciliado quanto o copépode são organismos bastante comuns em ambientes eutrofizados,

ricos em materiais orgânicos dissolvidos e que exercem grande influência na especiação do cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGONI V., PICCINI E., COPPELLOTTI O. Response to heavy metals in organisms- I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metals in *Euglena gracilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 67C, p. 121-127, 1980.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and waste water**, 2nd ed., Washington:APHA, 1268pp.,1995.

AZAM F, FENCHEL J.G.; GRAY, L.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, v. **10**, p. 257-263, 1983.

BROOK, A.J. The biology of Desmids. **Botanical Monographs**, v.16, Blackwell Scientific, Oxford, pp276, 1981.

CAPONE, D.G. AND BAUER J.E Microbial processes in coastal pollution. In: **Environmental Microbiology**. (ed. R. Mitchel), Nova York: Willy-liss, pp.91-238, 1992.

CHAU, Y.K.; GACHTER,R.; LUM-SHUE-CHAN,K. Determination of the apparent complexing capacity of lake waters. **Journal of the Fisheries Research Board Canada**, v.31, p.1515-1519, 1974.

CHO, B.C.; AZAM, F. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature*, v.332, p.441-443,1988.

CHOERI, R.B.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Effects of cyanobacteria of polysaccharidae on life history of *Ceriodaphnia cornuta* SARS. **J. of plankton research**, no prelo.

COLOMBO, V.; VIEIRA, A.A.H.; MMORAES, G. Activity of Glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on the degradation of extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 110-116, 2004.

COPPELLOTTI, O. Sensitivity to copper in a ciliate as a possible component of biological monitoring in the Lagoon of Venice. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 417-425,1998.

DARLLINGER, R., AND KAUTZKY, H. The importance of contaminated food for the uptake of heavy-metals by Rainbow-Trout (*salmo-gairdneri*)- a field-study. **Oecologia**, v. 67(1), p. 82-89,1985.

GORHAM, P.R., McLANGLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae*. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v.15, p.769-780, 1964.

GUILLARD R. R. L. e LOREZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HASSEN, A., SAIDI, N., CHERIF, M., BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, v. **64**, p. 7-15, 1998.

JARDIM, W.F., GIMENEZ, S.M.N. AND NERY, J.A.S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selectie electrodes. In: **Anais do V Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**. São Paulo, pp.226-230, 1986.

LAWS, A.E.. Metals. In : Laws, A.E editor. **Aquatic pollution** : an introductory text. 3° ed. University of Hawaii. An interscience publishers, p.351-415, 2000.

LEPPARD, G.G. **Trace element speciation in surface waters and its ecological implications**. (ed. G.G. Leppard). New York: Plenum Press, 319pp., 1983.

LOMBARDI, A.T. e JARDIM.W.F. The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 9, p. 1-2, 1997.

LOMBARDI, A.T. e VIEIRA, A.A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). **Phycologia**, v. 37, p. 34-3,1998.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA A.H. AND SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI A.T., HIDALGO T.M.R., VIEIRA A.A.H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**, v. 60, p. 452 – 459, 2005.

LOMBARDI A.T., HIDALGO T.M.R., VIEIRA A.A.H., SARTORI A.L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74 – 78, 2007.

LEWIS, A.C.; CAVE, W.R. The biological importance of copper in oceans and estuaries. **Oceanography and marine Biology annual Review**, v. 20, p. 471-696, 1982.

LORES, E.M., SNYDER, R.A., AND PENNOCK, J.R. The effect of humic acid on uptake-adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. **Chemosphere**, v. 28, p. 293-310, 1999.

LORES, E.M. e PENNOCK, R.J. Bioavailability and trofic transfer of humic- bound copper from bacteria to zooplankton. **Marine Ecology Progress Sereries**, v. 187, p. 67-85, 1999.

MANDONI, P., DAVOLI D, GORBI G., VESCOVI L. Toxicity effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Research**, v. 30, p. 135-141, 1996.

MANSOUR-ALLIABADI, AND SHARP, R.E. passage of selected heavy metals from *Sphaerotilus* (Bacteria: Chlamydo bacterialles) to *Paramecium caudatum* (Protozoa: ciliata). **Water Research**, v. 19, 697-699, 1985.

MIRIMANOFF, N., AND WILKINSON, J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). **Environmental Science e Technology**, v. 3, p. 612-622, 2000.

MOREL, F.M.M.; HUDSON, R.J.M.; PRICE N.M. Lmitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnology and oceanography*, v.36, p. 1742-1755, 1991

NIES, D.H. Efflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, p. 313-339, 2003.

NIRAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, v. 50, p. 139-161, 1988.

NOGUEIRA, P.F.M., MELÃO, M.G.G., LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolisaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Research**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

O' DOHERTY, E. C. Stream-dwelling copepods: Their life history and ecological significance. **Limnol. Oceanogr.**, v. 30(3), p. 554-564, 1985.

PARENT L., TWISS M.R., CAMPBELL P.G.C. Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella* : a test of the free-ion model of trace metal toxicity. **Environmental Science e Technology**, v. 30, p. 1713-1720, 1996.

PAULSEN, B.S.; VIEIRA, A.A.H. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polyssacharides produced by *Spondylosium panduriforme*. **Journal of Phycology**., v.30, n.4, p.638-641, 1994.

POMEROY, L.R. The ocean's food web, a changing paradigm. **BioScience**, v. 24(9), p. 499-504, 1974.

POMEROY, L.R. e WIEBE, W.J. Energics of microbial food webs. **Hydrobiologia**, v. 159, p. 7-19, 1989.

RAINBOW, P.S.; DALLINGER R. Metal uptake, regulation and exretion in freshwater invertebrate. In: **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. (eds R. Dallinger; P.S. Rainbow) Boca Raton, FL: Lewis publishers, pp119-131, 1993.

REINFELDER, J.R; FISHER, N.S.; LUOMA, S.N.; NICHOLS, J.W.; WANG, W.X. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science Total Environment**, v.219, p.117:135, 1998.

ROJAS, N. E. T.; MARINS, M. A. AND ROCHA, O. The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* Kurz, 1874 (Crustacea Cladocera) ephippial eggs.

Brazilian Journal of Biology, v. 61 (3), p. 371-376, 2001.

ROSEN, B.P., BHATTACHERJEE, H., SHIF, W.P. Mechanism of metalloregulation of an translocating ATPase. **J. Bioenergy and Biomembrane**, v. 27, p. 85-91, 1995.

SHAKOORI, A.R., RHEMAN, A., RIAZ-UL-HAQ Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 106-1051, 2004.

SHERR, E.B. Role of microbes in pelagic food web: A revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33(5), p. 1225-1227, 1988.

SIGG, L., STURM, M.; KISTLER, D. Vertical transport of heavy metal by settling particles. **Limnol. Oceanogr.**, v.32, n.1, p.112-130,1987.

SIPAÚBA-TAVARES L.H. eROCHA O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.São Carlos, RIMA, 96pp., 2003.

STUTZMAN, P. Food quality of gelatinous colonial chlorophytes to the freshwater zooplankters *Daphnia pulicaria* and *Diaptomus oregonensis*. **Freshwater Biology**, v.34, p.149-153, 1995.

THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural**. Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 1985.

TRANVIK, L.A. e SIEBEURTH, J. Effects of flocculated humic matter on free and attached pelagic microorganisms. **Limnology and Oceanograph**, v. 34(4), p. 688-699, 1989.

VIEIRA, A.A.H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrates from *Ankistrodesmus densus*. **Journal Plankton Research**, v.8, n.5, p.985-994, 1986.

VIJVERBERG, J. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. **Freshwater Biology**, v. 21, p. 317-373, 1989.

4. CONCLUSÃO GERAL

A interação entre a matéria orgânica dissolvida, o metal traço cobre e os organismos microheterotróficos, assim como os efeitos dessa interação sobre a dinâmica e a biodisponibilidade do cobre, foram avaliadas no presente trabalho. Através dos resultados apresentados, demonstrou-se que as águas do Reservatório do Monjolinho possuem dois sítios de complexação para o cobre, o que leva à uma baixa concentração de íons cobre livre nesse ambiente. Conclui-se, ainda, que as bactérias heterotróficas possuem habilidade em usar a matéria orgânica dissolvida natural como substrato alimentar, e que o cobre complexado à essa matéria pode ser capturado e biodisponibilizado pela população bacteriana. Deste modo, as bactérias heterotróficas podem influenciar na dinâmica do cobre, assim como na sua disponibilidade para a biota aquática.

A matéria orgânica dissolvida mostrou diminuir a toxicidade e a acumulação do cobre nos organismos em relação ao metal iônico livre. No entanto, a influência do complexo MOD-Cu sobre a disponibilidade de metal depende do tipo de matéria orgânica e do tempo de exposição a esses complexos como demonstrado através dos resultados experimentais onde utilizou-se material húmico e exopolissacarídeo.

Assim, os processos resultantes da interação entre as bactérias heterotróficas e os metais complexados à MOD são importantes para o entendimento da dinâmica desses elementos nos ambientes aquáticos e suas conseqüências para biota em geral. Ainda, para a correta interpretação do destino e impacto ambiental dos metais e seus complexos é necessário considerar a especiação dos metais, assim como as trocas dos metais entre os complexos, o ambiente e a biota.