

POTENCIAL DE CIANOBACTÉRIAS PROVENIENTES DE PESQUE-PAGUES PARA BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR ARSÊNIO.

Danielli Vazzoller Fittipaldi, Ludmila von Randow de Abreu Bastos Pandolpho, Rosângela Barbosa de Deus, Vera Lúcia de Miranda Guarda

Núcleo da Cátedra UNESCO: água, mulheres e desenvolvimento (NUCAT) - Laboratório de Qualidade de Águas (LAQUA) - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto. Rua Costa Sena, 171 – 35400-000 Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil - 31-35591630. Corresponding author: vera.guarda@gmail.com

Resumo

A poluição dos recursos hídricos tem trazido sérias consequências para o meio ambiente e conseqüentemente para a saúde coletiva. A mineração é uma grande responsável pela contaminação da água, principalmente por elementos como o arsênio (As), que recebe atenção especial de autoridades governamentais e de saúde pública, devido aos seus efeitos tóxicos em concentrações elevadas, causados pela exposição prolongada dos organismos vivos, e principalmente o homem. Estudos sobre remediação de áreas contaminadas utilizando microrganismos (biorremediação) vêm sendo realizados, e com isso esperam-se obter técnicas naturais com custo relativamente baixo e que não comprometam ainda mais o meio ambiente. As cianobactérias, organismos resistentes ao As, vem sendo utilizados em diversos estudos, com a vantagem sobre os demais devido a facilidade do descarte proporcionado pela sua baixa biomassa. Este estudo teve como finalidade verificar o potencial biorremediador de cianobactérias em diferentes concentrações de As, por meio de avaliação do seu crescimento e da sua capacidade de absorção. Os padrões de crescimento foram realizados comparando-se os teores de clorofila *a* (Chl *a*) em diferentes dosagens de As: 0; 50,0; 150,0; e 250,0 mg/L na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Após 10 (dez) dias de exposição, evidenciou-se que a produção de *chl a* se alterou em função da concentração de As, decrescendo com o aumento da concentração. A análise da absorção foi feita através da concentração de As no *pélet*, cujo resultado mostrou que a absorção de As aumenta com a concentração do metal no cultivo. Conclui-se que as cianobactérias responderam bem a concentrações de arsênio usadas podendo ser consideradas com bom potencial de biorremediador para o mesmo.

Palavras-chave: Biorremediação, cianobactérias, arsênio, clorofila a, água.

Abstract

The pollution of water resources has led serious consequences for the environment and for public health. Mining is responsible for a major water contamination, mainly by elements such as arsenic (As), which has received special attention from official governments and public health due to their toxic effects at high concentrations, caused by prolonged exposure of living organisms, especially humans. Studies on remediation of contaminated areas using microorganisms (bioremediation) have been performed, and therefore are expected to obtain natural techniques with relatively low cost and without compromising the environment even more. Cyanobacteria, organisms resistant to As, has been used in several studies, with the

advantage over other microorganisms due to their low biomass, which facilitates disposal. This study aimed to investigate the potential bioremediator for cyanobacteria in different concentrations of As, by evaluation of its growth and its absorption capacity. The growth patterns were conducted comparing the content of chlorophyll (Chl a) in different dosages: 0, 50.0, 150.0, and 250.0 mg/L in the form of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). After ten (10) days of exposure, it was demonstrated that the production of the chl a changed depending on the concentration of As, decreasing with increasing concentration. The analysis to determine the absorption of As was performed in the pellet, the results showed that the absorption of As increases with the concentration of it in the culture. It is concluded that the cyanobacteria responded well to such concentrations and may be considered with good potential bioremediator for arsenic.

Keywords: Bioremediation, cyanobacteria, arsenic, chlorophyll a, water.

Introdução

Metal pesado é o termo aplicado para os grupos de metais e metalóides como o cádmio (Cd), o Cobre (Cu), o mercúrio (Hg), o níquel (Ni), o chumbo (Pb) e o zinco (Zn), que apresentam densidade maior que 6g/cm^3 [1]. Porém, alguns metais como o Arsênio, que possuem densidade menor ($5,73\text{g/cm}^3$) é incluso neste grupo devido a sua toxicidade [2].

A contaminação das águas por metais representa um risco em potencial à biota, pois os mesmos são estáveis, persistentes e de caráter acumulativo [3].

A mobilidade e a toxicidade dos metais em geral dependem do seu estado de oxidação e da estrutura química da espécie metálica [4]. De acordo com Borba et al.(2002) [5], o Arsênio apresenta quatro estados de oxidação: As^{+5} , As^{+3} , As^0 e As^{-3} e sua toxicidade é diferenciada para formas orgânicas e inorgânicas. E entre as espécies inorgânicas, a toxicidade é maior para a forma de arsênio trivalente, que é considerada 60 vezes mais tóxica que a forma oxidada.

SANTOS, 2008 [2] descreve que dependendo da dose, da modalidade e do tempo de exposição, o arsênio pode causar várias doenças: câncer de pele, pulmão, bexiga, rins e fígado; queratose, doenças gastrointestinais, neurológicas e endocrinológicas e que é possível haver uma relação do consumo de arsênio com o aumento de casos de Diabetes mellitus, abortos espontâneos e doenças respiratórias.

A Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005, [6] alterada pela Resolução CONAM 430/11, estabelece limites entre $0,01\text{mg.L}^{-1}$ a $0,14\text{mg.L}^{-1}$ de As em água, dependendo do seu tipo de uso. Essa resolução também estabelece o limite máximo de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de As em efluentes. Apesar disso, existem muitas áreas contaminadas, especialmente pelos rejeitos de mineração, que causam sérios prejuízos ambientais [7], [8]. Muito embora ações antrópicas também contribuam para a contaminação de águas por arsênio.

O ser humano pode ser exposto ao arsênio através do ar, alimento ou água. No entanto, água com altas concentrações de arsênio é a principal fonte de contaminação [9]. Estudos de áreas que apresentam concentrações elevadas de arsênio têm sido documentados desde a década de 60, quando problemas de saúde foram relacionados a altas concentrações de arsênio em água de consumo humano em Taiwan, no Chile, na Argentina e em Blangadesh [10], devido ao consumo de águas subterrâneas provenientes de aquíferos com formação geológica arsenífera [3].

A preocupação com o arsênio no Brasil data da década de 90. A região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais é principalmente afetada, devido a uma anomalia natural desse elemento relacionada ao intemperismo das rochas, acelerada pela exploração sem controle durante o ciclo do ouro e o início da exploração de minérios de ferro e manganês na década de 80. Além do arsênio, a mineração pode carrear vários outros metais, tais como Cu, Zn e Pb que também são prejudiciais aos seres humanos. Vários estudos

comprovaram a contaminação por arsênio da água, do solo e dos sedimentos no quadrilátero ferrífero. [5], [11-14].

Na região de Ouro Preto/MG, as grandes áreas de mineração trazem como consequência o aumento da concentração de arsênio nas bacias hidrográficas do rio do Carmo, pertencente à bacia do rio Doce, e do rio das Velhas, principal afluente do Rio São Francisco. Assim encontra-se arsênio em captações de águas, em galerias de minas antigas, em bicas e chafarizes. A maior concentração de arsênio é no início do período chuvoso, pois neste período, a chuva carrega todo o arsênio das galerias, jogando-o nos rios e lagos [15].

A remoção de As pode ser feita através de resina de troca iônica, tratamento eletroquímico e precipitação, entretanto muitas vezes esses processos são inadequados, principalmente quando o metalóide está em baixa concentração; outro empecilho é o custo elevado da aplicação desses métodos [16].

Uma técnica de remoção que está se consolidando é o tratamento biológico, por se tratar de um processo natural, *in situ*, que promove um tratamento adequado no meio, com custo relativamente baixo, em comparação com alternativas convencionais de tratamento. A fitorremediação oferece várias vantagens: por ser uma tecnologia relativamente barata, permite seu emprego em grandes extensões de área. É aplicável a um grande número de poluentes orgânicos e inorgânicos, tornando-se ecológica e socialmente satisfatória, e seus procedimentos realizados *in situ* associam-se a tecnologias mais tradicionais [2].

Pesquisas sobre fitorremediação são recomendadas a algumas espécies de plantas terrestres e aquáticas, pelo potencial de tolerância e acumulação de poluentes como As. Nesta linha, a biorremediação tem sido estudada em microrganismos, como as bactérias, as microalgas, os fungos filamentosos e as leveduras, e tem-se verificado a eficiência dos mesmos, sendo capazes de remover o poluente. Em especial, as cianobactérias devem ser estudadas para serem

aplicadas em técnicas de biorremediação, porquanto são constantemente encontrados em ambientes contaminados por As [16].

A remediação de áreas contaminadas torna-se necessária e pode ser feita por meio desses microrganismos que absorvem metais, técnica conhecida como biorremediação. Esta é baseada em um processo natural, tem custos relativamente baixos, e vem sendo muito usada nos últimos tempos. Porém, há problemas na armazenagem, ou seja, no destino final das plantas utilizadas, porque a biomassa é seca e estocada, não podendo ser descartada em qualquer ambiente, pois os contaminantes estão adsorvidos ou absorvidos na mesma. [17].

As plantas que possuem maior eficiência, sendo mais resistentes aos contaminantes de maior impacto, como os metais, são as superiores de grande porte. O metal fica aderido no seu tecido vegetal, principalmente na lignina, apresentando, portanto, uma maior capacidade de acumulação – sendo chamadas de hiperacumuladoras. As plantas mais sensíveis, que não resistem as grandes concentrações de metais ou qualquer outro elemento são chamadas de biorremediadoras sensíveis ou não tolerantes [2].

Cianobactérias, cianofíceas ou algas azuis são microrganismos aeróbicos fotoautotróficos, sendo a fotossíntese a sua principal fonte de obtenção de energia. São classificadas como procariontes, portanto, muito semelhantes bioquímica e estruturalmente às bactérias [18]. O aumento da incidência de floração de microalgas e cianobactérias é resultado da eutrofização dos ambientes aquáticos devido ao enriquecimento artificial desses ecossistemas. A comunidade fitoplanctônica que vive na coluna d'água responde rapidamente ao processo eutrófico, culminando com um decréscimo na diversidade de espécies e predominância de espécies de cianobactérias [19].

Estas cianobactérias, após passarem por um teste de toxicidade para verificar seu potencial tóxico, podem ser utilizadas como biorremediadoras, ajudando a eliminar os metais da água,

com a vantagem sobre os demais, pois sua biomassa é pequena, o que facilita o descarte.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de cianobactérias do gênero *Microcystis* sp, não produtoras de toxinas, provenientes de lagos de pesque-pagues da Região dos Inconfidentes- MG, na biorremediação de água contaminadas por Arsênio.

Experimental

Produção de biomassa da cianobactéria *Microcystis* sp

A produção de biomassa foi feita com o cultivo de *Microcystis* sp, isolada de lagos de pesque-pague, através da repicagem em meio líquido ASM-1 em frascos Erlenmeyers, e conservada sob condições fotoautotróficas de crescimento: as culturas foram mantidas à temperatura de $21,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, iluminação média de $230 \mu\text{E}/\text{sm}^2$ proveniente de lâmpada fluorescente e fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro [16], [20].

Avaliação do crescimento da cianobactéria *Microcystis* sp em meio contendo arsênio por avaliação do teor de clorofila *a*.

Culturas de 10 frascos da cianobactéria *Microcystis* sp foram concentradas por centrifugação (Centrifugador Excelsa 3, modelo 204-SB, Fanem) a uma velocidade de 3.500 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão com água destilada e agitação por meio de vórtex (Certomat® MV – B. Braun Biotech International). Este processo foi repetido por mais duas vezes, obtendo-se um *pélet* composto exclusivamente por cianobactérias [16], [17].

200mL de meio ASM-1 foram distribuídos em 8 frascos Erlenmeyers. Ajuntou-se a seguir a solução de As preparada a partir de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nas seguintes concentrações: 0; 50,0; 150,0; e 250,0mg/L. Na

seqüência inocularam-se alíquotas de $1000 \mu\text{L}$ do *pélet*. Para cada concentração foram feitas 4 réplicas (Figura 1).



Figura 1: Experimento com diferentes concentrações de arsênio, para determinação de clorofila *a*.

Após 10 dias de exposição ao As, as culturas contidas em Erlenmeyers foram transferidas para tubos de centrifuga. Em seguida, foram centrifugadas a uma velocidade de 3.500rpm, durante 20 minutos, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuspensão em 1mL de meio ASM-1. Posteriormente, as células foram rompidas por movimentos contínuos com bastão de vidro e agitação em vórtex.

Os tubos foram envolvidos em papel-alumínio, para evitar danos fotooxidativos. Aos tubos foi acrescentado metanol (CH_3OH) 100% (Merck®) mantendo a proporção de 9:1 (9 mL de CH_3OH :1 mL de concentrado de células). Após 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente, os tubos foram novamente submetidos à vigorosa agitação em vórtex. Os extratos foram centrifugados a uma velocidade de 3.500rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e o extrato metonólico foi lido em espectrofotômetro UV Visível (Varian), no comprimento de onda de 665,2 nm ($A_{665,2}$), correspondendo a Chl *a*, sendo o metanol puro usado como branco.

O cálculo da concentração de clorofila *a* foi feito com base na fórmula:

$C = A \cdot a$, onde:

C = concentração de Clorofila *a* ($\mu\text{g/mL}$);

A = absorvância; e

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

Determinação do acúmulo de arsênio pela *Microcystis* sp.

Para realizar a avaliação do acúmulo de As pela cianobactéria *Microcystis* sp procedeu-se de forma análoga a determinação do teor de clorofila *a*, utilizando as mesmas concentrações de Arsênio, em duplicata.

Após 10 dias de exposição ao As, as culturas contidas nos Erlenmeyers foram concentradas por centrifugação a uma velocidade de 3.500rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com água destilada e agitação por meio de vórtex. Este processo por mais duas vezes, obtendo-se um *pélet* composto exclusivamente por cianobactérias.

O *pélet* foi seco em estufa a 60°C, depois foi resfriado a temperatura ambiente e em seguida foi feita a mineralização com solução nitroperclórica 3:1. Após a mineralização, o material foi encaminhado ao Laboratório de Geoquímica Ambiental do Departamento de Geologia da Escola de Minas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) para realizar a leitura no Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP OES (Spectro Ciros modelo CCD) da quantidade de arsênio acumulada nas cianobactérias.

Resultados e Discussão

A solução-estoque de As utilizada foi preparada com concentração de 50,0 mg As/L. Esta foi lida no ICP OES para determinar sua real concentração, sendo o resultado encontrado 56,5 mg As/L.

Os resultados da avaliação do crescimento da cianobactéria *Microcystis* sp em meio contendo

arsênio por determinação do teor de clorofila *a*, estão compilados na Tabela 1.

O aumento do teor de clorofila *a* em presença de Arsênio (As) (tabela 1) é justificado pelo fato do (As) estimular a produção de clorofila, participando ativamente do metabolismo das cianobactérias, e corrobora os relatos de as mesmas serem relativamente resistentes aos seus efeitos tóxicos, [21], [22].

Souza (2007) [16] pondera que a redução do crescimento é um indício de que as cianobactérias estão numa condição de estresse ambiental, e neste caso, o (As), por seu efeito tóxico nas células, causa efeitos deletérios ou inibitórios nesses organismos, uma vez atingida a concentração máxima tolerante pelas cianobactérias. Ainda em relação à condição de estresse, e embora haja poucos relatos sobre o efeito direto do (As) nos sistemas de pigmentos, Mathis e Kleo (1973) [23] afirmam que o teor de clorofila *a* pode ser alterado nessas condições, o que leva a alterações no crescimento de plantas ou de microrganismos sintetizantes, como as cianobactérias.

Determinação do acúmulo de arsênio pela *Microcystis* sp.

Os resultados da leitura das concentrações de Arsênio presente nas biomassas mineralizadas e secas realizada no ICP-OES podem ser visualizados na Figura 2, sendo média de duas determinações.

O teor de Arsênio no *pélet* aumenta com a concentração do metal no cultivo, (Figura 2). Este efeito também foi observado por Gomes (2005) [24], que utilizou a cianobactéria *Geitlerinema* e por Souza (2007) [16] com as espécies *Nostoc piscinale* e *Geitlerinema unigranulatum*. Os resultados mostram que a cianobactéria *Microcystis* sp respondeu bem às concentrações de Arsênio utilizadas apresentando um bom potencial para sua biorremediação.

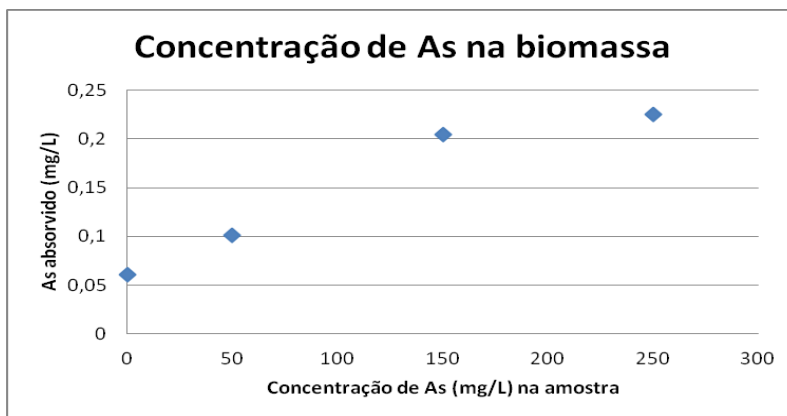


Figura 2: Teor de As(mg/L) na biomassa *Microcystis* sp

Souza (2007) [16] expõe que a acumulação do As é feita por mecanismos de bioabsorção (adsorção e absorção), via processos físicos, químicos e biológicos, tanto em células vivas quanto em mortas, e faz uma ressalva que estes mecanismos antecedem respostas dos organismos ao estresse – a absorção do (As) pode estar relacionado ao estágio fisiológico das células.

As cianobactérias absorvem o (As) até a saturação. Essa concentração é conhecida como a máxima tolerante. A partir daí, esta concentração se torna tóxica, podendo levar à sua excreção que pode ser ou não sob a forma metilada [16], [24]. Bottino et al. (1978) [25] identificaram a ocorrência da excreção de (As) acumulado em células de *Phormidium* sp., *Hymenomonas cartearae* e *Tetraselmis chuí*, após estes terem atingido os seus platôs de absorção.

A relação entre o teor de Clorofila *a* produzido e a quantidade de As acumulado, nas diferentes concentrações nas quais foi exposta a cianobactéria *Microcystis* sp está ilustrada na Figura 3.

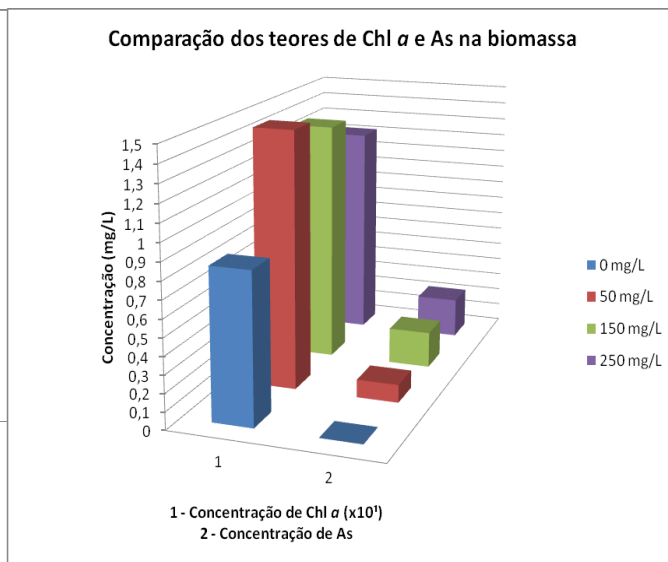


Figura 3: Comparação entre os teores de clorofila *a* e de As acumulado na biomassa.

A concentração de Clorofila *a* diminui com o aumento da absorção de As pela cianobactéria (Figura 3). Jacobson e Halmann (1982) [26] analisaram que a resistência das cianobactérias pode ser devida à capacidade de formar corpúsculos de polifosfato intracelular, que armazenam fosfato em condição de estresse. Souza (2007) [16] explica que o fosfato reduz os efeitos tóxicos do (As) sobre as células, por prevenir a entrada deste metaloide na mesma ou, já estando nas células, o arsênio causa poucos danos, quando o fosfato está presente, provavelmente devido à competição que ocorre pelas rotas metabólicas, como a fosforilação oxidativa e a síntese de membranas.

Além do crescimento e da absorção, Gomes (2005) [24] e Souza (2007) [16] salientam que a quantidade de biomassa utilizada é outro fator importante em estudos de biorremediação de arsênio por cianobactérias, expondo que não existe na literatura uma padronização do valor da biomassa a ser empregada na condução dos experimentos, a fim de obter uma resposta adequada à concentração do (As). Esta observação se faz necessária devido ao valor da biomassa produzida ser diretamente proporcional à quantidade de sítios de ligação disponíveis, e estes facilitam os processos de absorção do (As) pelas cianofíceas [24]. Diante desta falta de uniformidade, Gomes (2005) [24] sugere que seja

utilizado nos experimentos no mínimo 1,0 g de biomassa seca.

Tabela 1: Concentração de Clorofila *a* ($\mu\text{g/mL}$)

[As] mg/L	Leitura de absorvância (665 nm)			Teor de Clorofila <i>a</i> na biomassa		
	A	B	Média	A	B	Média
0,00	0,641	0,720	0,681 \pm 0,059	8,012	9,000	8,506 \pm 0,699
50,00	1,255	1,081	1,168 \pm 0,123	15,687	13,512	14,599 \pm 1,538
150,00	1,023	1,170	1,097 \pm 0,104	12,787	14,625	13,706 \pm 1,300
250,00	0,915	1,032	0,973 \pm 0,083	11,437	12,900	12,168 \pm 1,035

Conclusões

A cianobactéria *Microcystis* sp gerou biomassa em ambientes contaminados por (As). O teor de Clorofila *a* produzida foi maior onde o metaloide estava presente no meio de cultivo. Elas também foram capazes de absorver o Arsênio, diretamente proporcional a sua concentração no meio, mostrando-se com potencial de biorremediação para altas concentrações deste poluente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG e ao LGqA/DEGEO/EM/UFOP

Referências

[1] –B.J. ALLOOWAY. Heavy Metals in Soil. JohnWilwy e Sons Inc: New York. (1993), 553.

[2] E. C. SANTOS. Macrófitas aquáticas em tratamento de águas contaminadas por arsênio. Dissertação (mestrado) – ProAmb - Universidade Federal de Ouro Preto (2008), 84p.

[3] J.S. FARIAS, M.R. MILANI, L.F.H. NIENCHESKI, M.L. PAIVA, Química Nova. 35(7) (2012), 1401.

[4]D. Q. HUNG, O. NEKRASSOVA, R.G. COMPTON, Talanta. 64 (2004), 269.

[5] R.P. BORBA, Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera. Tese (doutorado). Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas. (2002), 111p.

[6]. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357/05. Acesso em 10/12/12, Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, (2005).

[7] J. O. GRIMALT, M. FERRER, E. MACPHERSO, The Science of the Total Environment 242 (1999), 3.

[8] E. DESCHAMPS, V. S. T. CIMINELLI, F. T. LANGE, J. MATSCHULLAT, B. RAUE, H. ESCHMIDT, Journal of Soils and Sediments. 2 (2002), 216.

[9] D. N.MAZUMDER, Indian. J. Med. Res. 128(4) (2008), 436.

- [10] P.L. SMEDLEY, D. G. KINNINBURGH, *Applied Geochemistry*. 17 (2002), 517.
- [11] L. EUTÉRIO, Diagnóstico da situação ambiental da cabeceira da bacia do Rio Doce, MG. No âmbito das contaminações por metais pesados, em sedimentos de fundo. Dissertação (Mestrado) - Departamento de geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto., (1997), 154p.
- [12] J.A.C. GONÇALVES, M. A. PEREIRA, J. C. LENA, J. F. PAIVA, *Workshop International de Geomedicina*. (2005).
- [13] H. PIMENTEL, J. C. LENA, H. A. JRNALINI, *Environmental Geology*, 43 (2003), 725.
- [14] R. H. P. SILVA, Geoquímica e impacto ambiental do arsênio no Vale do Ribeira (SP - PR). Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas). (1997), 100p.
- [15] R. P. BORBA, B.R. FIGUEIREDO, J. A. CAVALCANT, *Revista Escola de Minas*. 57(1) (2004), 45.
- [16] E.A. SOUZA, Potencial de cianobactérias para a biorremediação de águas e solos contaminados por arsênio. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa. (2007), 110p.
- [17] L. v. R. A. B. PANDOLPHO, Identificação de cianobactérias e estudo da toxicidade “*in vivo*” de cianotoxinas nos pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. Dissertação (Mestrado) - ProAmb - Universidade Federal de Ouro Preto. (2009), 57p.
- [18] W.W. CARMICHAEL, *Scientific American*. 270(1) (1994), 78.
- [19] S.M.F.O. AZEVEDO, W. R. EVANS, W. W. CARMICHAEL, M. NAMIKOSHI, *Journal of Applied Phycology*, 6 (1994), 261.
- [20] Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, *Teste para avaliação de toxicidade aguda de cianobactérias - método de ensaio*. São Paulo (1993).
- [21] S. MATSUTO, H. KASUGA, OKUMOTO, A. TAKAHASHI, *Comparative Biochemical Physiology*. 78 (1984), 377.
- [22] T. THIEL, *Journal of Bacteriology* 170(3) (1988), 1143.
- [23] P. MATHIS, J. KLEO, *Photochemistry Photobiologic*. 18 (1973), 343.
- [24] C. Q. Gomes, Caracterização de *Geitlerinema* UFV-E01 (cyanobacteria) e *Stigeoclonium* UFV-E02 (chlorophyta) cultivadas em presença de arsênio. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa (2005), 68p.
- [25] N. R. Bottino; R. D. Newman; E. R. Cox; R. Stoketon; M. Hobn; R. A. Zingaro; K.J. Irgolic, *Journal Experience Marine Biological Ecological*. 33 (1978), 153.
- [26] L. Jacobson; M. Halmann, *Journal of Plankton Research*. 4(3) (1982), 481