

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Comunidades microbianas e genes funcionais associados com a ciclagem de
arsênio em lagoas salino-alcálinas

Juliana dos Santos Costa

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Juliana dos Santos Costa
Bacharel em Ciências Biológicas

Comunidades microbianas e genes funcionais associados com a ciclagem de arsênio em lagoas salino-alcálinas

Orientadora:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Costa, Juliana dos Santos

Comunidades microbianas e genes funcionais associados com a ciclagem de arsênio em lagoas salino-alcálinas / Juliana dos Santos Costa.
- - Piracicaba, 2020.

106 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Sequenciamento metagenômico 2. Perfil funcional 3. Cianobactérias
4. Toxicidade I. Título

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais,
Maria e Joaquim (in memorium) por todo amor, apoio, suporte
e por serem exemplo de força.**

**Aos meu avós,
Ambrosina e Antônio por me ensinarem a ter fé e me servirem de inspiração.**

**Aos meus primos,
em especial,
Taisa e Taciane por todo amor.**

**A minha família em geral,
por toda paz e tranquilidade que transmitem .**

A TODOS,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Marli de Fátima Fiore, por ter me acolhido em um momento difícil, pela confiança, ensinamentos, orientação e oportunidade de fazer parte do time Cyanos.

A Prof^a. Dr^a. Anne Hélène Fostier pela coorientação, por seus ensinamentos e suporte durante a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Serviço de Pós-Graduação, em especial a Maria Solizete Granziol Silva, por todo auxílio fornecido.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo fornecimento de toda a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

Ao Projeto Projeto Temático “Mudanças Climáticas e Impactos Ambientais em Áreas Úmidas (Wetlands) do Pantanal (Brasil): Quantificação, Fatores de Controle e Previsão de Longo Prazo” (FAPESP 16/14227-5).

A Fazenda São Roque pela parceria na pesquisa e por disponibilizar a área para estudarmos, aos funcionários, dona Ana e Genivaldo, por deixar nossos dias em campo mais leves e por todo suporte que nos ofereceram durante toda coleta.

Aos Prof. Ary Rezende, Laurent Barbiéro e Plínio Camargo por todo ensinamento, suporte e apoio na realização das coletas.

A todos que ajudaram durante a realização das coletas, em especial, ao técnico Luiz Aparecido Joaquim, da UFSCAR, sem você e sua prática em campo, a coleta teria sido muito mais difícil.

Aos Prof. Dr^a. Célia Regina Montes e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote e a técnica Denise pela disponibilidade do laboratório para realização de análises.

Aos membros do Laboratório de Química Ambiental da Unicamp, e em especial Amauy Hechavarria pelos ensinamentos durante a realização de análises de arsênio.

Ao Dr. José Rubens Moraes Júnior pelos ensinamentos, ajuda e suporte na realização dos testes de toxicidade.

As técnicas Ana Paula Dini Andreote e Renata Cruz por todo suporte, apoio, conselhos, ensinamentos e por toda energia positiva que vocês transmitem.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP por toda ajuda que me deram e pelos ensinamentos, Simone Cotta, Lara Losovoi, Maria Luiza Campanari, Andrews Delbaje, Rafael Popin, Rafael Dextro, Júlia Formaggio, Stella Camargo.

Em especial aos amigos Bruno Evangelista de Souza, Thierry Pellegrinetti, Taiane Barradas, Gladys Castillo, Carolinne Rosa, Paul Lineker, Renata Cruz, Wallace de Souza e

Jorge Morais por toda ajuda, ensinamentos, companheirismo e por tornarem a caminhada mais leve. Muita grata a cada um de vocês!

A Daniel Lobo, meu melhor amigo, pela amizade, ajuda, companhia e apoio inestimável durante esses 4 anos.

Aos amigos de Limeira e Lavras, em especial Ariane, Lidiane, Gláucia, Jéssica, Kaliane e Nathália por todo apoio, torcida e incentivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Uma tese não é resultado do esforço perseverante de uma só pessoa, mas do grupo de trabalho e parcerias. Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE TABELAS..... | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.1. O Pantanal e a Região da Nhecolândia..... | 17 |
| 2.2. Arsênio..... | 18 |
| 2.3. Mecanismos de biotransformação do arsênio por bactérias..... | 20 |
| 2.4. Diversidade microbiana em ambientes extremos..... | 24 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1. Área de estudo..... | 29 |
| 4.2. Análises químicas das lagoas salino-alcálinas..... | 30 |
| 4.3. Análise de Arsênio total..... | 31 |
| 4.4. Análise da comunidade microbiana das lagoas salino-alcálinas..... | 32 |
| 4.5. Análises genômicas..... | 35 |
| 4.6. Toxicidade do arsênio para <i>Anabaenopsis</i> sp. CENA651 e <i>Limnospira</i> sp. CENA650..... | 39 |
| 4.7. Especificação química do arsenato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) no meio de cultura Z8 modificado..... | 40 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 43 |
| 5.1. Análises químicas..... | 43 |
| 5.2. Análises de Arsênio total..... | 45 |
| 5.3. Análise da comunidade microbiana das lagoas salino-alcálinas..... | 49 |
| 5.4. Análises Genômicas..... | 79 |
| 5.5. Toxicidade do arsênio para <i>Anabaenopsis</i> sp. CENA651 e <i>Limnospira</i> sp. CENA650..... | 85 |
| 5.6. Especificação química do arsênio em meio Z8 modificado..... | 89 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 93 |
| REFERÊNCIAS..... | 95 |

RESUMO

Comunidades microbianas e genes funcionais associados com a ciclagem de arsênio em lagoas salino-alcálinas

O arsênio (As) é um dos principais contaminantes de água potável, sendo um problema devido sua toxicidade e potencial carcinogênico mesmo em baixas concentrações. No Pantanal brasileiro, cerca de 600 lagoas salino-alcálinas apresentam altas concentrações deste elemento. Apesar das condições extremas, as lagoas são habitadas por comunidades microbianas capazes de tolerar ou metabolizar As, desempenhando um papel essencial no ciclo biogeoquímico de As, influenciando sua biodisponibilidade e especiação. Estudos de comunidade microbiana associada com a biotransformação do As nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal são inexistentes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade bacteriana associada à ciclagem do As, por meio da análise de dados metagenômicos de quatro diferentes lagoas salino-alcálinas, em períodos de seca e cheia, com presença ou ausência de floração de cianobactérias. Além disso, foram determinadas as concentrações de As em amostras de água, sedimento e fitoplâncton, cujos resultados serviram de base para testes de resistência de isolados de cianobactérias a diferentes concentrações de arsenato de sódio. As análises químicas mostraram que todas as lagoas no período de seca apresentaram elevadas concentrações de As total na água, as quais variaram de 53,17 a 1721,68 $\mu\text{g L}^{-1}$, e no período de cheia foram menores, entre 9,24 e 102,86 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, as concentrações de As total nos sedimentos não apresentaram grandes variações entre os períodos de seca e cheia, variando entre 3,3 a 20,1 mg kg^{-1} . As concentrações de As total no fitoplâncton no período de seca e cheia variaram entre 22,7 e 39,9 mg kg^{-1} e 3,67 e 12,2 mg kg^{-1} , respectivamente. As análises metagenômicas das amostras de água das lagoas recuperaram genes relacionados à redução do arsenato (*arsC*), transporte de arsenito (*arsA*, *arsB* e *acr3*) e oxidação do arsenito (*aioA* e *arxA*). Lagoas com florações de cianobactérias apresentaram menor diversidade microbiana ligadas aos processos de redução e transporte de arsenito, sendo essas funções predominantes em membros das famílias cianobacterianas Aphanizomenonaceae e Microcoleaceae. As principais famílias bacterianas associadas com o processo de oxidação aeróbica do As (III) nas lagoas foram Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Rhodobacteraceae, Rhodocyclaceae e Vibrionaceae. Enquanto no processo de oxidação anaeróbica do As (III), as famílias dominantes foram Comamonadaceae, Ectothiorhodospiraceae e Rhodobacteraceae. O gene *arsM* e/ou operon *ars* envolvidos na resistência e detoxificação do As foram anotados nos genomas das linhagens cianobacterianas *Geminocystis* sp. CENA649, *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650, sendo as duas últimas as produtoras de florações no Pantanal. Essas duas linhagens formadoras de florações cresceram em meio de cultivo com concentração de 4000 mg L^{-1} de arsenato de sódio mostrando-se resistentes ao As (V). Esse estudo contribui para o conhecimento da estrutura e a capacidade funcional das comunidades microbianas associadas com a ciclagem de As em lagoas salino-alcálinas, assim como do potencial das linhagens CENA650 e CENA651 na biotransformação do As.

Palavras-chave: Sequenciamento metagenômico, Perfil funcional, Cianobactérias, Toxicidade

ABSTRACT

Microbial communities and functional genes associated with arsenic cycling in saline-alkaline lakes

Arsenic (As) is one of the main contaminants in drinking water, being a problem due to its toxicity and carcinogenic potential even at low concentrations. In the Brazilian Pantanal, around 600 saline-alkaline lakes have high concentrations of this element. Despite the extreme conditions, the lakes are inhabited by microbial communities capable of tolerating or metabolizing As, playing an essential role in the As biogeochemical cycle, influencing its bioavailability and speciation. Studies of microbial community associated with the As biotransformation in the Pantanal saline-alkaline lakes are inexistent. Thus, the objective of this work was to evaluate the bacterial diversity associated with As cycling through the analysis of metagenomic data from four different saline-alkaline lakes, in the dry and wet periods, with the presence or absence of cyanobacterial blooms. In addition, As concentrations were determined in water samples, sediment and phytoplankton, whose results served as the basis for resistance tests of cyanobacteria isolates to different concentrations of sodium arsenate. Chemical analyses showed that the lakes in the dry period had high total As concentrations in the water, which ranged from 53.17 to 1721.68 $\mu\text{g L}^{-1}$, and during the wet period they were lower, between 9.24 and 102.86 $\mu\text{g L}^{-1}$. In contrast, the total As concentrations in the sediments did not show great variations between the dry and wet periods, varying between 3.3 to 20.1 mg kg^{-1} . Total As concentrations in the phytoplankton in the dry and wet periods varied between 22.7 and 39.9 mg kg^{-1} and 3.67 and 12.2 mg kg^{-1} , respectively. Metagenomic analyses of the lakes water samples recovered genes related to arsenate reduction (*arsC*), arsenite transport (*arsA*, *arsB* and *acr3*) and arsenite oxidation (*aioA* and *arxA*). Lakes with cyanobacterial blooms showed low microbial diversity linked to arsenite reduction and transport processes, being these functions predominant in members of the cyanobacterial families Aphanizomenonaceae and Microcoleaceae. The main bacterial families associated with the As (III) aerobic oxidation process were Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Rhodobacteraceae, Rhodocyclaceae and Vibrionaceae. While in the As (III) anaerobic oxidation process, the dominant families were Comamonadaceae, Ectothiorhodospiraceae and Rhodobacteraceae. The *arsM* gene and/or operon *ars* involved in the As resistance and detoxification were annotated in the genomes of cyanobacterial strains *Geminocystis* sp. CENA649, *Anabaenopsis* sp. CENA651 and *Limnospira* sp. CENA650, the last two being the producer of blooms in the Pantanal. These two bloom-forming strains grew in culture medium with concentration of 4000 mg L^{-1} of sodium arsenate, showing resistance to As (V). This study contributes to the knowledge of the structure and functional capacity of the microbial communities associated with As cycling in saline-alkaline lakes, as well as the potential of the strains CENA650 and CENA651 in the As biotransformation.

Keywords: Metagenomic sequencing, Functional profile, Cyanobacteria, Toxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática dos diversos processos microbianos envolvidos nas transformações do arsênio. (1) Entrada do arsênio na célula; (2) redução do arsenato e expulsão do arsenito; (3) complexação do arsenito; (4) oxidação do arsenito; (5) redução dissimilatória; (6) metilação. MMA: metilarsina; DMAA: ácido dimetilarsínico; DMA: dimetilarsina; TMAO: óxido de trimetilarsina; TMA: trimetilarsina (Adaptado de Páez-Espino et al., 2009). 24
- Figura 2. Distribuição geográfica das quatro lagoas salino-alcálinas amostradas no Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. 30
- Figura 3. Regressão linear simples entre o crescimento monitorado por densidade óptica (680nm) e contagem celular ao microscópio para as culturas de *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650 na ausência de arsênio. 39
- Figura 4. Concentração de arsênio total nas amostras de água coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas). 45
- Figura 5. Concentração de arsênio total nas amostras de sedimentos coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas). 46
- Figura 6. (A) Concentração de arsênio total nas amostras de fitoplâncton (B) Fator de bioacumulação no fitoplâncton nas amostras coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas). 48
- Figura 7. Abundância relativa média (n=3) em nível de domínio nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (s) e cheia (c). 50
- Figura 8. Abundância relativa média (n=3) em nível de filo nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (s) e cheia (c). 51
- Figura 9. Análise de redundância (RDA) entre a composição da comunidade bacteriana e as variáveis físico-químicas das lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro. As letras vermelhas representam as variáveis e os losangos a taxonomia. TN: Nitrogênio total; Chl-a: Clorofila; Alk: Alcalinidade; Sal: Salinidade; TP: Fósforo total; WT: Temperatura da água; DOC: Carbôno orgânico dissolvido. Taxonomia: Alt - Alteromonadaceae; Bac - Bacillaceae; Chlorobi - Chlorobiaceae; Chlorofl - Chloroflexaceae; Chro - Chromatiaceae; Clos - Clostridiaceae; Desulfob - Desulfobacteraceae; Desulfom - Desulfomicrobiaceae; Ect - Ectothiorhodospiraceae; Fla - Flavobacteriaceae; Gammapro - Gammaproteobacteria; Hyp - Hyphomonadaceae; Idi - Idiomarinaceae; Mic - Micromonosporaceae; Nost - Nostocales; Osc - Oscillatoriales; Pep - Peptococcaceae; Plan - Planctomycetaceae; Pse - Pseudomonadaceae; Rhodobac - Rhodobacteraceae; Rhodocyc - Rhodocyclaceae; Rhodospir - Rhodospirillaceae; She - Shewanellaceae; The - Thermomonosporaceae; Thermo - Thermotogaceae. 52
- Figura 10. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados em uma escala de concentração de arsênio e no perfil funcional *Arsenic resistance* inferidos a partir de reconstrução dos metagenomas no MG-RAST. Somente os táxons com frequência acima de 1% são apresentados. 56

- Figura 11. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArsC (*Arsenate reductase*) a partir de metagenoma..... 57
- Figura 12. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsC* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis..... 59
- Figura 13. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArsB (*Arsenic efflux pump protein*) a partir de metagenoma..... 60
- Figura 14. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsB* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis..... 62
- Figura 15. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArsA (*Arsenical pump-driving ATPase*) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados. 63
- Figura 16. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis..... 64
- Figura 17. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína Acr3 (*Arsenical resistance protein*) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados. 65
- Figura 18. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *acr3* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis..... 67
- Figura 19. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína AioA (*Arsenite oxidase*) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados..... 68

Figura 20. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *aioA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis. 70

Figura 21. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArxA (*Anaerobic arsenite oxidase*) a partir de metagenoma. 71

Figura 22. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arxA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis. 73

Figura 23. Microfotografias de linhagens de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálicas do Pantanal da Nhecolândia, MS. Imagens a esquerda: microscopia de luz e a direita: microscopia de varredura. (a) Células de *Geminocystis* sp. solitárias e em divisão (b) Tricoma de *Limnospira* sp. (c) Tricoma de *Anabaenopsis* sp. H=heterócito. CV = Célula vegetativa. . 81

Figura 24. Organização genômica dos genes de resistência ao arsênio em cianobactérias alcalifílicas. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 25. Crescimento de *Anabaenopsis* sp. CENA651 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 1200 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média ± desvio padrão..... 86

Figura 26. Crescimento de *Limnospira* sp. CENA650 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 1200 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média ± desvio padrão..... 87

Figura 27. Crescimento de *Anabaenopsis* sp. CENA651 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 4000 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média ± desvio padrão..... 88

Figura 28. Crescimento de *Limnospira* sp. CENA650 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 4000 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média ± desvio padrão..... 89

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características físico-químicas das lagoas salino-alcálinas amostradas nos períodos de seca (outubro de 2017) e cheia (setembro de 2018). | 30 |
| Tabela 2. Relação de cianobactérias alcalifílicas selecionadas cujas sequências genômicas estavam disponíveis no banco de dados GenBank | 37 |
| Tabela 3. Valores médios dos parâmetros físico-químicos nos períodos de seca e cheia. | 44 |
| Tabela 4. Quantidades de sequências geradas | 49 |
| Tabela 5. Grupos gênicos das funções do metabolismo do arsênio encontrados nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro obtidos pelo MG-RAST: SEED database (valores em %). | 54 |
| Tabela 6. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>arsC</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 58 |
| Tabela 7. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>arsB</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 61 |
| Tabela 8. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>arsA</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 64 |
| Tabela 9. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>acr3</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 66 |
| Tabela 10. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>aioA</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 69 |
| Tabela 11. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene <i>arxA</i> nas lagoas salino-alcálinas Pantanal brasileiro. | 72 |

1. INTRODUÇÃO

O Pantanal é conhecido por ser a maior planície alagável do Planeta com uma área de 150.000 km². A Nhecolândia é uma das maiores sub-regiões do Pantanal Matogrossense (26.921 km²) caracterizada pela presença de um grande sistema lacustre formado por lagoas de água doce (baías) e lagoas salino-alcálicas, na qual baías periodicamente se conectam e as salinas mantêm-se isoladas fisicamente das áreas de inundação (Abdon et al., 1998; Almeida et al., 2011; Freitas et al., 2019). Apesar de coexistirem muito próximas umas às outras, todas possuem suas próprias variabilidades químicas, físicas, biológicas (Oliveira et al., 2011) e apresentam colorações diversificadas (cristalinas, verdes e pretas).

As lagoas salino-alcálicas do Pantanal possuem águas com perfil químico rico em carbonato de sódio, pH elevado (9 - 12), baixo teor de cálcio e magnésio e elevada condutividade elétrica (Barbiéro et al., 2002; Furquim et al., 2008). Além do Na₂CO₃, o metalóide arsênio (As) também está presente em concentrações elevadas. Nestes ambientes, a dinâmica hidroquímica é controlada principalmente por processos de evaporação e precipitação, mas também pelo sistemas de solos, alternando em um ambiente com épocas de alta concentração de arsênio na água (período de seca) até épocas com elevada diluição desse elemento (período de cheia) (Barbiéro et al., 2007; Richter et al., 2019).

O As é um dos principais contaminantes de água potável, tornando-se um problema por ser um elemento tóxico e carcinogênico mesmo em baixas concentrações (Fekih et al., 2018; Zhu et al., 2014). No ambiente é encontrado em diferentes estados oxidativos: arsenato (As V), arsenito (As III), arsênio elementar (As⁰) e arsenieto (As-III), e devido a variação em seus estados é considerado um elemento bastante móvel no meio ambiente (Tsai et al., 2009; Zhang et al., 2017).

Devido às características extremas das lagoas salino-alcálicas, essas possuem limitações em sua biodiversidade, comportando principalmente micro-algas e micro-organismos, como as cianobactérias, capazes de tolerar o ambiente estressante (Malone, 2012). Dentre as cianobactérias, os gêneros dominantes encontrados nessas lagoas são *Anabaenopsis* e *Limnospira* (previamente classificada como *Arthrospira*), sendo ambas formadoras de florações e responsáveis por importantes papéis biogeoquímicos (Andreote et al., 2018).

Diversos micro-organismos são capazes de tolerar e/ou metabolizar o arsênio, exercendo um papel essencial em seu ciclo biogeoquímico, influenciando na sua biodisponibilidade e na sua especiação (transformação de uma forma inorgânica em outra) (Fekih et al., 2018; Jiang et al., 2019; Leon et al., 2018; Lièvremont et al., 2009; Páez-Espino

et al., 2009; Zhang et al., 2017). Porém, informações sobre o papel dos micro-organismos na especiação do As em lagoas salino-alcálicas foram relatados em poucas regiões do mundo: Mono Lake, Califórnia, USA; Altai, Rússia e Khovsgol, Mongólia (Edwardson et al., 2017; Hamamura et al., 2012; Hoefl et al., 2004, 2007; Hollibaugh et al., 2006; Oremland, 2004; 2017; Sorokin et al., 2012).

Apenas um trabalho (Andreote et al., 2018) realizado em duas lagoas salino-alcálicas do Pantanal investigou o potencial genético da resistência ao As. Nessas salinas foram encontrados genes relacionados à extrusão celular do As (*arsA*, *arsB* e *acr3*), a resistência (*arsD* e *arsH*) e enzimas responsáveis pela codificação da arsenato redutase (*arsC*). Especificamente para Salina Verde, o principal filo afiliado ao mecanismo de resistência ao As foi Cyanobacteria, representado pelo gênero *Anabaenopsis* (50%). Por outro lado, na Salina Preta as ordens Burkholderiales, Planctomycetales, Pseudomonadales e Actinomycetales foram as principais afiliadas ao As.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo descrever a estrutura, a composição e a distribuição dos diferentes grupos bacterianos envolvidos no metabolismo do arsênio em quatro lagoas salino-alcálicas do Pantanal durante a alta e a baixa taxa de evaporação das lagoas. Além disso, buscou-se fornecer informações relacionadas à tolerância das cianobactérias *Anabaenopsis* sp. e *Limnospira* sp. ao As (V) e identificar nos genomas dessas linhagens os genes responsáveis pela biotransformação do arsênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Pantanal e a Região da Nhecolândia

O Pantanal pertence à categoria de zonas úmidas temporárias sujeitas a um pulso (isto é, a periodicidade) de inundação monomodal previsível (Junk et al., 1989). Localiza-se no centro do continente Sul Americano, é uma planície sedimentar contínua, formado há milhares de anos com o soergimento da Cordilheira dos Andes, reconhecida nacional e internacionalmente como uma das áreas úmidas de maior importância do planeta (Alho; Gonçalves, 2005).

Compreende 150.500 km², onde 90% da sua dimensão é localizada no Brasil e 10% em áreas da Bolívia e Paraguai (Assine et al., 2015). Trata-se de uma área com altitudes entre 100 e 200 m e declividades extremamente baixas (0,03 a 0,5 m/km), o que condiciona um lento escoamento das águas na época de cheia (Garcia, 1991).

O clima da região é classificado como tropical úmido, com verão chuvoso e inverno seco, conferindo à região uma peculiaridade que a divide em períodos de cheia, seca e vazante, o qual corresponde na classificação de Köppen ao tipo Aw (Freitas et al., 2014; Garcia, 1984). Esse ecossistema possui estações contrastantes ao longo do ano, cuja média de precipitação pluviométrica anual oscila entre 1000 e 1400 mm, com cerca de 80% das chuvas concentradas no verão, principalmente em dezembro e janeiro. A temperatura média anual do ar é cerca de 25°C, oscilam de 21°C a 32°C durante invernos secos e verões chuvosos, respectivamente (Richther et al., 2019).

A flutuação no nível da água entre os períodos de seca e cheia provoca alterações marcantes na estrutura e funcionamento dos ecossistemas no Pantanal. No período de inundação ocorrem trocas de nutrientes entre os ecossistemas terrestres e aquáticos e, com o período de escoamento da água, parte do estoque iônico gerado por esta relação permanece no sistema aquático, aumentando sua produtividade. Tal estabilidade do pulso de inundação é uma das características primordiais em áreas periodicamente alagáveis, favorecendo toda a estruturação e interação da biota (Junk et al., 1989).

O bioma do Pantanal é delimitado em função dos aspectos relacionados à inundação, relevo, solo e vegetação, 11 sub-regiões foram definidas: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paiaguás, Nhecolândia, Aquidauana, Miranda, Abobral, Paraguai, Nabileque e Porto Murtinho (Silva; Abdon, 1998).

A sub-região da Nhecolândia tem uma área de aproximadamente 26.921 km² correspondente a 19,48% da área total do Pantanal localizada entre os rios Taquari e Negro, caracterizada pela presença de um grande sistema lacustre formado por lagoas de água doce (baías) e lagoas salino-alcálicas (salinas). As baías periodicamente se conectam, porém as salinas mantêm-se isoladas fisicamente das áreas de inundação (Almeida et al., 2011; Freitas et al., 2019). A região abriga cerca de 600 lagoas salinas, caracterizadas por apresentarem alta concentração de sal e elevados valores de pH (>9,0) (Almeida et al., 2011), semelhante as condições encontradas em lagoas salino-alcálicas na África e Ásia (Burganskaya et al., 2018; Sorokin et al., 2014).

As lagoas salino-alcálicas do Pantanal são rasas, com dimensões de 0,5 a 1 km de diâmetro e profundidade de 2 a 5 metros, localizadas sempre em nível topográfico mais baixo que o seu entorno e isoladas em relação à entrada de água superficial. Esse isolamento ocorre devido as áreas de vegetação conhecidas como cordilheiras circundarem as lagoas e funcionarem como barreira natural (Freitas et al., 2019; Mariot et al., 2007). O grau de concentração de cada lagoa depende de seu regime hídrico, que é comandado por flutuações anuais da altura d'água de inundação, mas, sobretudo, pelo sistema de solos (Furian et al., 2013; Martins, 2012; Parizotto, 2012) e a composição alcálica das lagoas é influenciada por processos de evaporação que ocasiona aumento na concentração de alguns elementos e precipitação de alguns sais (Barbiéro et al., 2002; Barbiéro et al., 2007; Mariot et al., 2007). O arsênio é um dos elementos presente nas lagoas salino-alcálicas que tem o seu teor aumentado pelo processo de evaporação (Barbiéro et al., 2007; Richter et al., 2019).

2.2. Arsênio

O arsênio (As) é um semimetal (metaloide) que causa sérios problemas de saúde por ser tóxico e carcinogênico (Zhu et al., 2014). Ocorre naturalmente em ambientes aquáticos e terrestres (Lièvreumont et al., 2009) e encontra-se presente em mais de 200 diferentes formas minerais, sendo os mais comuns arsenatos (60%), sulfetos e sulfossais (20%) e os 20% restantes incluem arsenitos, óxidos, silicatos e arsênio elementar (Mandal; Suzuki, 2002). Este pode apresentar quatro estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5), e está presente nas formas orgânicas e inorgânicas. As formas orgânicas do As podem ser encontradas nas águas, solos, alimentos, plantas (arsenoaçúcares) e animais marinhos (arsenobetaína). Sendo, as espécies metiladas voláteis: monometilarsenato (MMAsV), dimetilarsenato (DMAsV) e óxido de trimetilarsina (TMAsO) (Kirby et al., 2005; Maher et al., 2009; Sharma; Sohn, 2009).

Na biosfera, o arsenato (As V) e o arsenito (As III) são as espécies inorgânicas mais abundantes. Em condições aeróbicas (oxidantes), o As (V) predomina e é o mais estável, enquanto em condições de anaerobiose, ocorre uma especiação do As para a forma trivalente (arsenito), que é mais tóxica e inerentemente mais lábil (Malik et al., 2009). As formas inorgânicas são consideradas as mais tóxicas e também são as mais frequentes em suprimentos de água (Wang; Zhao, 2009).

O desgaste de rochas é responsável pela liberação do arsênio na biosfera e hidrosfera e sua presença na atmosfera é em decorrência de processos de erosão pelo vento, emissões vulcânicas e processos de volatilização. Por outro lado, algumas atividades antropogênicas podem aumentar a concentração de As no ambiente, como o uso de conservante de madeira arseniato de cobre e cromo (CCA), mineração, combustão de carvão, herbicidas, indústria farmacêutica, indústrias de semicondutores, entre outras fontes industriais (Zhu et al., 2014).

Em decorrência da toxicidade do As, as diretrizes definiram o limite de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para água potável (Brasil, 2011; EPA, 1991; WHO, 2008) e para a proteção da vida aquática em águas doces (CCME, 2001; CONAMA, 2011; EPA, 1991).

Concentrações de arsênio muito acima ($1050 \mu\text{g L}^{-1}$) do limite foram relatadas em águas subterrâneas, principalmente no sul e sudeste da Ásia, tornando-se um problema ao colocar em risco a saúde de milhões de pessoas (Fendorf et al., 2010; Flanagan et al., 2012; Rodríguez-Lado et al., 2013).

Altos níveis de As também foram relatados em águas superficiais e subterrâneas de alguns países da América Latina, como Argentina (Bundschuh et al., 2004; Nicolli et al., 2012), Chile (Arriaza et al., 2010), México (Armienta; Segovia, 2008; Castro de Esparza, 2010), Nicarágua (Mcclintock et al., 2012) e Uruguai (Guérèquiz et al., 2009).

Em estudo realizado por Ricther et al. (2019), foram mensurados o conteúdo de As dissolvido em águas superficiais, lençol freático, solos e sedimentos de dez lagoas salino-alcálicas, localizadas na Nhecolândia. Os autores relataram que algumas lagoas apresentaram concentrações naturais de As acima de 3mg L^{-1} . Apesar da elevada concentração de As, essa não é uma contaminação antropogênica. Visto que, os mesmos autores mostraram ausência de contaminação ($< 2 \mu\text{g L}^{-1}$ de As) nos rios que abastecem a planície pantaneira, indicando que essa concentração de As é uma condição natural dessas lagoas salino-alcálicas.

Apesar de tóxico, o arsênio é utilizado por alguns micro-organismos como, aceptor de elétrons na cadeia respiratória anaeróbica, doador de elétrons para crescer quimiolitotrophicamente e até para fotossíntese anoxigênica por algumas bactérias fotossintéticas e cianobactérias (Kulp et al., 2008; Oremland et al., 2005). Foi postulado que durante o início

da vida na Terra, antes do aparecimento do oxigênio molecular, os compostos de arsênio desempenharam um papel importante servindo como aceptor e doador de elétrons (Huertas et al., 2014).

2.3. Mecanismos de biotransformação do arsênio por bactérias

O arsênio não é um elemento essencial para a vida, deste modo, nenhum organismo conhecido possui sistemas de captação específicos para o elemento. Todas as vias de captação de As são oriundas de transportadores cujas funções fisiológicas incluem, transporte de nutrientes e minerais. O arsenito (As III) e arsenato (As V) atuam como análogos de glicerol e fosfato, entram nas células microbianas através de transportadores de glicerol (GlpF) e transportadores de fosfato (Pit/Pst) (Garbinski et al., 2019).

O mecanismo de toxicidade reside no fato do arsenato substituir o fosfato em reações bioquímicas essenciais, como a fosforilação oxidativa e a glicólise, resultando em compostos arsenos extremamente lábeis e que hidrolisam espontaneamente a taxas de milissegundos, tornando-os incapazes de serem utilizados pelos organismos (Tawfik et al., 2011). Por outro lado, o arsenito exerce sua toxicidade por ligações a grupos sulfidrilos comprometendo as funções de muitas proteínas (Miyashita et al., 2016).

Os micro-organismos foram expostos ao arsênio desde a origem da vida e, conseqüentemente, desenvolveram genes de resistência ao arsênio (Garbinski et al., 2019). Aceita-se que praticamente todos os organismos, de bactérias a humanos, possuem mecanismos de detoxificação do arsênio, principalmente envolvendo sistemas de transportes capazes de eliminar o arsenito (As III) das células (Rosen; Liu, 2009).

Procariotos resistentes e metabolizadores de As tem sido isolados de diversos ambientes, incluindo os extremos, como lagoas salino-alcálinas, fontes termais, drenagem ácida de minas, e esses micro-organismos desenvolveram diferentes estratégias para contrapor a toxicidade do As como, precipitação extracelular, quelação, compartimentalização, exclusão ou transformação bioquímica (redox ou metilação), e possuem diferentes níveis de tolerância ao As (Andres; Bertin, 2016; Li et al., 2016; Slyemi; Bonnefoy 2012; Yang; Rosen et al., 2016).

As formas de As mais importantes biologicamente são As(V) e As(III) e a proporção relativa dos dois estados de oxidação depende de vários fatores como processos biológicos e condições físico-químicas, principalmente do pH e potencial redox (Liao et al., 2011; Sharma; Sohn, 2009).

O mecanismo de resistência bacteriana pode ocorrer através da detoxificação da célula bacteriana pela oxidação do As (III) e por processo de metilação que transforma espécies inorgânicas em orgânicas (metiladas), sendo essas menos tóxicas (Slyemi; Bonnefoy 2012).

2.3.1 Sistema de oxidação do arsênio (aio/arx)

2.3.1.1 Sistema Aio

O operon aioAB é amplamente distribuído em bactérias. Foi identificado pela primeira vez em *Alcaligenes faecalis* a enzima arsenito oxidase (Aio) que catalisa a oxidação do arsenito (As III) para arsenato (As V) (Ellis et al., 2001). Essa enzima é codificada pelos genes *aioA* e *aioB* para duas subunidades: AioA (AoxB) e AioB (AoxA) (Slyemi; Bonnefoy, 2012; Stolz et al., 2006). Estudos revelaram que várias proteínas podem estar envolvidas na regulação da oxidação do arsenito (Kang et al. 2012; Kashyap et al. 2006; Koechler et al. 2010; Liu et al. 2012). Verificou-se que um sistema regulador transcricional de dois componentes, incluindo AioS (sensor histidina quinase) e AioR (um regulador transcricional), são essenciais para a oxidação do arsenito nas bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (Kashyap et al. 2006) e *Herminiimonas arsenicoxydans* (Koechler et al. 2010).

Esse processo de oxidação microbiana é considerado um dos principais mecanismos de detoxificação por transformar o arsenito (forma mais tóxica) em arsenato (forma menos tóxica). Em áreas alagáveis, naturais e construídas, foram detectadas a presença desses genes em vários grupos de bactérias como, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae, Rhizobiales, Burkholderiales, Comamonadaceae, Agrobacterium, Pseudomonas e Variovorax (Jia et al., 2014; Macur et al., 2004; Zhang et al., 2015).

2.3.1.2 Sistema Arx

Um novo tipo de arsenito oxidase (ArxA) foi identificado na bactéria haloalcalifílica *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1. A bactéria quimiolitotrófica *A. ehrlichii* MLHE-1, isolada do lago salino-alcálico Mono Lake (USA) realiza a oxidação do As (III) juntamente com a redução do nitrato (Zargar et al., 2010). A energia produzida durante o processo é utilizada para fixar CO₂, fornecendo carbono necessário para o crescimento. Desse modo, em populações onde bactérias heterotróficas e quimioautotróficas estão presentes, as primeiras conseguem sobreviver utilizando substâncias orgânicas produzidas pelas bactérias quimioautotróficas (Hamamura et al., 2009; Lièvreumont et al., 2009).

A caracterização da proteína ArxA revelou que, embora funcione como arsenito oxidase in vivo, possui atividade bifuncional para redução do arsenato e oxidação de arsenito in vitro e, além disso, apresenta relação evolutiva com ArrA, e não com AioA (Zargar et al., 2012).

Em estudo realizado por Hoeft et al. (2017) observou-se que três estirpes de *Ectothiorhodospira* sp. utilizaram o As (III) como acceptor de elétrons para fotossíntese anoxigênica, e continham homólogos do gene *arxA*.

2.3.2 Sistema de redução do arsênio (Arr/Ars)

2.3.2.1 Sistema Arr

Nesse processo ocorre a redução dissimilatória do As (V) a As (III) mediado pela enzima arsenato redutase dissimilatória (ArrAB), que consiste em duas subunidades: maior, ArrA (100 kDa), e menor, ArrB (30 kDa) (Slyemi; Bonnefoy, 2012). Esse processo é acoplado com a oxidação de substratos orgânicos (acetato, lactato, piruvato, malato, glicerol, butirato e etanol) e inorgânicos (sulfetos e hidrogênio) e ocorre a geração de energia (Hoeft et al., 2004; Malasarn et al., 2004; Van Lis et al., 2013).

Vários organismos de diferentes filos bacterianos podem usar o arsenato como acceptor final de elétrons para o crescimento em condições anaeróbicas. Em áreas alagadas de diferentes locais foram detectadas sequências gênicas relacionadas ao gene *arrA* (Cai et al., 2013; Jia et al., 2014; Song et al., 2009; Zhang et al., 2015). Nessas áreas, o processo de redução dissimilatória do As (V) por bactérias é comum em decorrência das condições anóxicas encontradas. Alguns autores relataram que frequentemente encontram-se bactérias dos gêneros *Geobacter* (Héry et al., 2010; Islam et al., 2004; Zhang et al., 2015) e *Shewanella* nesses locais (Oremland; Stolz, 2005; Tufano et al., 2008).

2.3.2.2 Sistema Ars

O sistema de resistência ao arsênio (*ars*) é a via de detoxificação mais estudada e frequente entre os micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos. O operon *ars* pode ser encontrado em cromossomos e/ou plasmídeos de bactérias gram positivas e gram negativas (Yan et al., 2019). Diversas organizações do operon *ars* foram descobertas em diferentes bactérias, os mais comuns são os constituídos por três genes (*arsR*, *arsB* e *arsC*) e cinco genes (*arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* e *arsC*) (Lièvreumont et al., 2009; Yan et al., 2019).

O mecanismo básico de detoxificação do As (III) é a extrusão por uma bomba de efluxo formado por um complexo protéico ligado à membrana acionado por ATP para a extrusão do arsenito. Esse complexo protéico é composto pela proteína ArsB (codificada pelo gene *arsB*) e pela proteína ArsA (codificada pelo gene *arsA*). Cabe ressaltar que a presença da proteína ArsA foi descrita apenas em alguns organismos (Tisa; Rosen 1990).

A proteína ArsR, codificada pelo gene *arsR* funciona como repressor do operon *ars*, onde se liga na região do promotor, impedindo a transcrição dos genes à jusante. Ao detectar o As (III) no ambiente sofre alteração conformacional e se libera da região do promotor do operon, permitindo a transcrição dos genes estruturais *arsDABC* (Xu et al., 1998).

O gene *arsB* presente apenas em procariotos foi o primeiro sistema de efluxo de As (III) identificado, seguido pelo gene *acr3* encontrado em bactérias, arqueias, fungos e algumas plantas. Apesar de ambos terem papéis biológicos semelhantes, eles evoluíram de forma independente, com a similaridade entre as sequências em torno de 20 a 40% (Fekih, et al 2018).

A enzima arsenato redutase, codificada pelo gene *arsC*, realiza a redução citoplasmática do As (V) a As (III) e o subsequente efluxo do As (III) pela bomba ArsB ou ArsAB (Lièvremont et al., 2009).

A proteína ArsD foi descoberta como um repressor transcrional responsivo a As (III) fraco, que não mostra semelhança de sequência com ArsR, mas se liga ao mesmo sítio que ArsR na região promotora do operon *ars*, porém com menor afinidade. Os genes *arsD* e *arsR* são considerados responsáveis pelos níveis basais e máximo de transcrição do operon *ars*, respectivamente (Xu et al., 1998).

O efeito da expressão do operon *ars* é cumulativo, algumas espécies de micro-organismos tem múltiplos operons *ars* e genes *arsC* em tandem, o que lhes confere maior resistência ao metalóide (Stolz et al., 2006). A organização dos genes no operon *ars* também difere entre os organismos, o que culmina na alteração da quantidade relativa das proteínas expressas e no perfil de resistência (Azevedo et al., 2008).

2.3.3 Sistema de metilação (ArsM)

Além do efluxo de As (III) pela bomba ArsB, outro caminho para detoxificação é o processo de metilação do As (III) catalisado pela enzima S-adenosilmetionina metiltransferase, que é codificada pelo gene *arsM*, que gera metilarsenito (MAs (III)), dimetilarsenito (DMAs (III)) e trimetilarsenito (TMAs (III)) durante o processo (Fekih, et al 2018). Apesar de metilarsenitos serem mais tóxicos que As (III), eles não se acumulam nas células e são liberados

para atmosfera rapidamente por serem voláteis (Yan et al., 2019). Diversos micro-organismos, como Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Gemmatimonadales e Cianobactérias têm mostrado a capacidade de metilar o As originando monometil, dimetil e trimetil (Oremland; Stolz, 2003; Yin et al., 2011; Zhang et al., 2015). O processo contrário também ocorre permitindo liberação de energia para os micro-organismos, resultando na desmetilação de compostos orgânicos metilados de arsênio e liberando As inorgânico (AsV ou AsIII) (Slyemi; Bonnefoy, 2012). Abaixo segue um esquema representativo dos processos microbianos envolvidos nas transformações do arsênio para melhor compreensão (Figura 1).

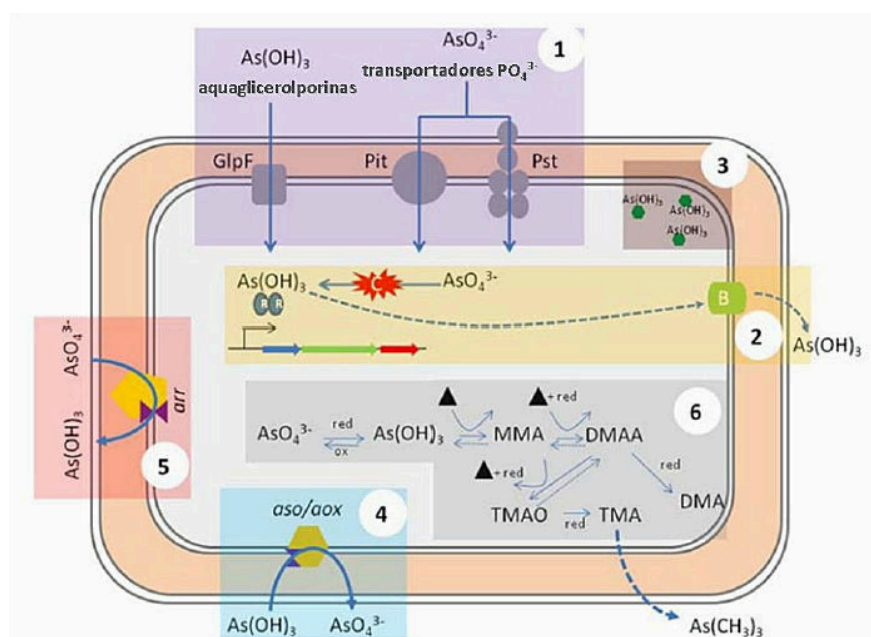


Figura 1. Representação esquemática dos diversos processos microbianos envolvidos nas transformações do arsênio. (1) Entrada do arsênio na célula; (2) redução do arsenato e expulsão do arsenito; (3) complexação do arsenito; (4) oxidação do arsenito; (5) redução dissimilatória; (6) metilação. MMA: metilarsina; DMAA: ácido dimetilarsínico; DMA: dimetilarsina; TMAO: óxido de trimetilarsina; TMA: trimetilarsina (Adaptado de Páez-Espino et al., 2009).

2.4. Diversidade microbiana em ambientes extremos

Ambientes extremos são aqueles que possuem características que permitem a vida e sobrevivência de apenas um grupo restrito de espécies, condições extremas tais como temperatura, salinidade, pressão e atividade de água podem interromper as interações fundamentais que mantêm as biomoléculas funcionais, afetando a integridade celular. Contudo, para cada condição ambiental extrema, diversos micro-organismos podem tolerar tais condições ou exigi-las para sua sobrevivência (Rampelotto, 2010).

As lagoas salino-alcálicas do Pantanal são um exemplo típico de ambientes extremos, por apresentarem elevados valores de pH (>9) e alta concentração de sal, selecionando organismos adaptados a sobreviver nesse meio (Almeida et al., 2011). Nesses ambientes, é corriqueiro o crescimento de cianobactérias, por apresentarem uma ampla tolerância ecológica que contribui para o seu sucesso competitivo (Almeida et al., 2011; Malone et al., 2012). Alguns processos como, a capacidade fotossintética, fixação de N₂, regulação osmótica e celular interna; e a fluatibilidade conferem alta adaptabilidade das cianobactérias as condições extremas (Hamisi et al., 2017; Schagerl; Burian, 2016).

Devido às altas taxas fotossintéticas, em decorrência da alta densidade populacional de cianobactérias, as lagoas salino-alcálicas estão entre os sistemas mais produtivos do mundo (Sorokin; Berben, 2014). Na região oeste da África, lagoas salino-alcálicas, apresentaram elevada produtividade primária e densidade de cianobactérias como *Limnospira platensis* (renomeação da *Arthrospira platensis* - Nowicka-Krawczyk et al., 2019) e *Anabaenopsis* sp. (Seckbach; Oren 2007), que são táxons amplamente documentados nas lagoas do Pantanal e responsáveis pela formação de florações (Malone et al. 2007, 2012; Santos et al. 2004, Santos; Sant'Anna, 2010). Sendo que, os gêneros *Limnospira*, *Anabaenopsis* e *Cyanospira* são os mais comumente relatados nas florações em lagoas salino-alcálicas (Andreote et al., 2018; Burganskaya et al., 2018; Dadheech et al., 2013; Genuário et al., 2017; Krienitz et al., 2013; Santos et al., 2018; Sorokin; Berben, 2014).

Apesar de algumas espécies de cianobactérias serem dominantes em lagoas salino-alcálicas, outros grupos foram relatados. Dentre as cianobactérias não heterocitadas, já foram identificadas isolados dentro dos gêneros *Alkalinema*, *Cyanobacterium*, *Geminocystis*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Liminothrix*, *Nodosilinea* e *Pantanalinema* (Andreote et al., 2014; Burganskaya et al., 2018; Vaz et al., 2015). As cianobactérias unicelulares mais amplamente citadas pertencem aos gêneros *Synechococcus*, *Synechocystis* e *Chroococcus* (Andreote et al., 2014; Santos; Sant'Anna, 2010; Schagerl; Burian, 2016).

Além das cianobactérias, as lagoas reúnem comunidades microbianas consideravelmente diversas. Diferentes filos bacterianos, como Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes (Hamamura et al., 2012; Oremland et al., 2017) e arqueias foram caracterizados (Grant; Sorokin et al., 2011).

Estudos sobre a comunidade microbiana em lagoas salino-alcálicas vem demonstrando a existência de uma grande diversidade metabólica nesse ambiente, sendo encontrados diferentes táxons desempenhando funções, como por exemplo, oxidantes e redutores de arsênio, oxidantes de enxofre e redutores de sulfato, nitrificantes, desnitrificantes, metanotróficas,

metanogênicas, fototróficas, entre outras (Andreote et al., 2018; Antony et al., 2013; Oremland et al., 2004, 2005).

Apesar das lagoas salino-alcálicas serem distribuídas em diversos locais, como África, Américas do Norte e Central, Ásia e Europa esses ambientes ainda são pouco explorados (Antony et al., 2013; Casamayor et al., 2013; Kázmierczak et al., 2011; Namsaraev et al., 2015; Oren, 2002; Stenger-Kovács et al., 2014).

Os estudos desses nichos são de extrema importância para melhorar a nossa compreensão da biologia de ambientes extremos, além de fornecer potencial para aplicações biotecnológicas.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade bacteriana associada à ciclagem do arsênio, e detectar os genes responsáveis pela sua transformação nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal e em genomas cianobacterianos.

Objetivos específicos:

- I. Determinar as concentrações de As nas amostras de água, sedimento e fitoplâncton das lagoas salino-alcálicas;
- II. Determinar a composição taxonômica e funcional dos grupos envolvidos na ciclagem do As;
- III. Isolar e caracterizar morfologicamente as cianobactérias que formam florações nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal;
- IV. Anotar os genes funcionais de resistência ao arsênio nas linhagens de cianobactérias isoladas e comparar com isolados de ambientes alcalifílicos;
- V. Analisar a resistência das cianobactérias isoladas em diferentes concentrações de arsenato de sódio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O estudo foi conduzido na sub-região do Pantanal Matogrossense conhecida como Nhecolândia (Figura 2). Foram avaliadas quatro lagoas salino-alcálicas (04SR, 06SR, 07SR e 08SR) localizadas na Reserva de São Roque no município de Aquidauana (MS), cujas coordenadas são 19°18'31,739"S e 56°17'26,356"W.

As coletas foram realizadas em duas épocas diferentes, ao final do período de seca (outubro de 2017) e no período de cheia (setembro de 2018), pelo grupo do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP), durante atividades referentes ao Projeto Temático “Mudanças Climáticas e Impactos Ambientais em Áreas Úmidas (Wetlands) do Pantanal (Brasil): Quantificação, Fatores de Controle e Previsão de Longo Prazo” (FAPESP 16/14227-5).

Além das amostras da água, foram coletadas amostras do sedimento e de fitoplâncton para a realização das avaliações de arsênio total. As amostras de sedimentos foram coletadas em triplicatas, na profundidade de 0 a 20 cm, que corresponde à espessura média da camada superficial do sedimento na qual se acumula a matéria orgânica. Após coleta, as amostras foram imediatamente acondicionadas e mantidas refrigeradas a 4 °C.

Para acessar o fitoplâncton presente nas lagoas, amostras de água foram coletadas com rede coletora de fitoplâncton (malha de 20 µm de porosidade) utilizada para concentrar os micro-organismos presentes na água. Cerca de 360 litros de água foram passados pela rede, resultando em torno de 200 mL de água concentrada, acondicionadas em frascos de polietileno de alta densidade, preservadas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas. Não foi possível a coleta de fitoplâncton na lagoa 07SR, pois essa não tinha quantidade suficiente para concentrar na rede.

As características físicas e químicas como, por exemplo, pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e temperatura da água (°C) foram medidas *in situ* utilizando a sonda multiparâmetro YSI-6600 V2 (YellowSpring, OH, EUA) (Tabela 1).

As lagoas selecionadas apresentam características bastante distintas entre si. Duas lagoas amostradas 04SR e 08SR apresentavam florações de cianobactérias, enquanto 06SR e 07SR não apresentavam florações. As águas da lagoa 06SR possuem uma coloração escura

devido à alta concentração de matéria orgânica, contrariamente a 07SR, onde as águas são cristalinas.

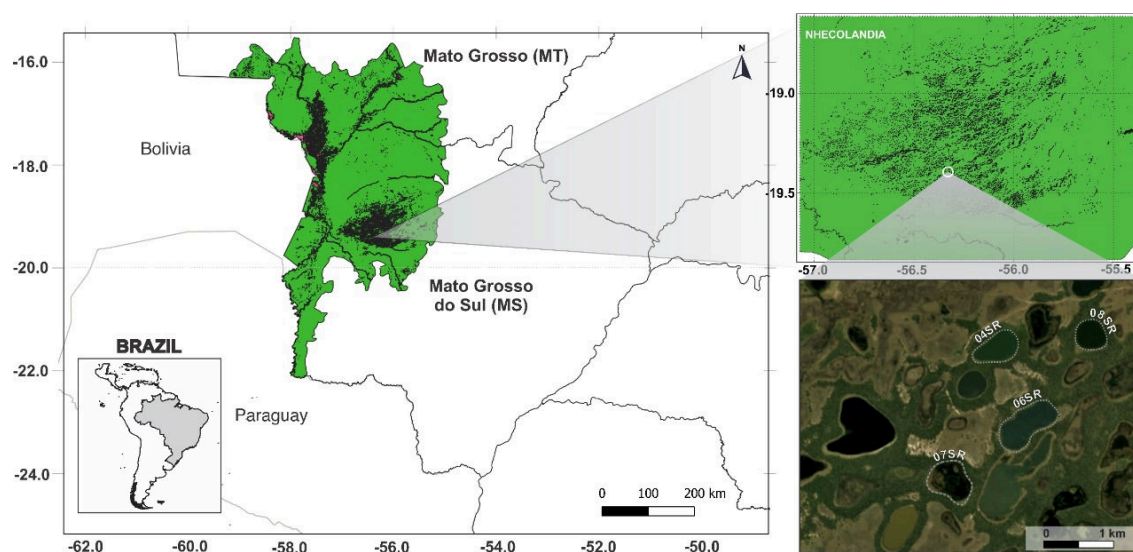


Figura 2. Distribuição geográfica das quatro lagoas salino-alcálinas amostradas no Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil.

Tabela 1. Características físico-químicas das lagoas salino-alcálinas amostradas nos períodos de seca (outubro de 2017) e cheia (setembro de 2018).

| | Coordenadas geográficas | pH | Temperatura (°C) | Condutividade elétrica (mS·cm ⁻¹) | Altura da água (cm) | Floração de cianobactéria | |
|------------------|-------------------------|------------------------------|------------------|---|---------------------|---------------------------|-----|
| Período de seca | 04 SR | 19°22'52,0"S 56°19'33,2"W | 10,01±0,01 | 26,43±0,12 | 16,29±0,56 | 41 | Sim |
| | 06 SR | 19°23'25,2"S 56°19'20,8"W | 9,70±0,03 | 37,66±0,16 | 17,99±0,06 | 20 | Não |
| | 07 SR | 19°23'50,3"S 56°19'57,2"W | 8,55±0,01 | 27,25±0,01 | 1,78±0 | 56 | Não |
| | 08 SR | 19°22'47,2"S 56°18'51,6"W | 10,07±0,01 | 35,05±0,14 | 39,25±0,19 | 10 | Sim |
| | 04 SR | 19°22'52,0"S 56°19'33,2"W | 10,02±0,06 | 26,12±1,05 | 1,73±0 | 109,5 | Sim |
| | 06 SR | 19°23'25,2"S 56°19'20,8"W | 9,09±0,01 | 26,34±0,40 | 0,68±0 | 82,25 | Não |
| Período de cheia | 07 SR | 19°23'50,3"S 56°19'57,2"W | 8,62±0,00 | 27,11±0,25 | 0,56±0 | 109,5 | Não |
| | 08 SR | 19°22'47,2"S 56°18'51,6"W | 9,42±0,05 | 25,41±0,17 | 1,00±0,01 | 85 | Sim |

4.2. Análises químicas das lagoas salino-alcálinas

Para a caracterização química das lagoas amostradas, foram obtidas alíquotas de 0,5 L da água utilizando frascos de polietileno. As amostras foram coletadas na coluna d'água acima do fundo e tomando o cuidado para não haver perturbação e ressuspensão do sedimento. Estas

foram mantidas sob refrigeração a 4°C para análise da composição química (macro e micronutrientes) em laboratório.

As amostras coletadas foram fracionadas em três subamostras para análise química: não filtrada (A); filtrada através de membrana 0,45 µm GF/F microfibras de vidro (Whatman - 0,45 µm) (B); e filtrada através de membrana 0,45 µm éster-celulose (Millipore™-0,45 µm) (C). As subamostras A foram usadas para determinar os sólidos totais dissolvidos (STD) e os sólidos suspensos totais (SST) pela metodologia USEPA 1684 (USEPA, 2001). O nitrogênio total e o fósforo total foram determinados utilizando o método persulfato para determinação simultânea, seguindo o método APHA 4500-PJ (APHA, 1999). A alcalinidade foi analisada pelo método APHA 2320 (APHA, 1999) com titulação em solução de ácido clorídrico 0,1 mol · L⁻¹. As subamostras (B) foram aplicadas para concentração de carbono orgânico dissolvido (DOC), carbono inorgânico dissolvido (DIC) e nitrogênio total dissolvido (TDN) usando o equipamento Shimadzu TOC-5000A.

A salinidade da água foi determinada pela quantidade de sólidos totais dissolvidos (STD) (Williams; Sherwood, 1994). As subamostras (C) foram utilizadas para determinar os seguintes parâmetros: NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, foram determinados por análise de injeção de fluxo (FIA), de acordo com Ruzicka e Hansen (1975). A concentração de ortofosfato (oPO₄³⁻) foi realizada seguindo o método do ácido ascórbico (Murphy; Riley, 1962). As concentrações de Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, foram analisadas por cromatografia iônica usando o equipamento Dionex ICS 90. Os elementos traços como Al, B, Fe, Mn foram determinados por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP/OES). A análise de clorofila-*a* foi realizada seguindo o método APHA 10200 H, com filtro de fibra de vidro e acetona 90%.

4.3. Análise de Arsênio total

A determinação da concentração total de As (As_{tot}) nas amostras foi realizada por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto (HG-AFS) em equipamento Excalibur Millennium PSA 10.055 (PSAnalytical, UK). As amostras de água foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante filtrado através de membranas 0,22 µm. Posteriormente adicionou-se 30 mL de HCl concentrado e 2 mL de solução de pré-redução (KI 5% e ácido ascórbico 10%) para 100 mL de amostra. Foram deixadas por 40 minutos, tempo necessário para reduzir quantitativamente o arsênio (V). Preparou-se uma solução que contém 300 mL de HCl concentrado e 20 mL da solução de pré-redução (KI 5% e

ácido ascórbico 10%) para 1L de branco de reagente, esta solução é usada para subtrair automaticamente o branco (Chen et al., 2014). Para geração de hidretos foi usada uma solução de 0,7 % de NaBH₄ em 0,1 mol/L de NaOH.

As amostras de sedimento foram secas em estufa à 40°C, peneiradas e moídas em moinho de discos RS200 Retsch durante 30 minutos com uma rotação de 1000 rpm, posteriormente as amostras foram peneiradas em malha de 0,106 mm. Após esse processo 0,2 gramas de sedimento foram submetidas a decomposição ácida (4 mL de HNO₃; 2 mL de HF; 1 mL de HCl e 0,5 mL de H₂O₂) com aquecimento em forno de micro-ondas (DGT 100 plus, Provecto Analítica) por (3 minutos a 250 W, seguido de 5 minutos a 500, 600 e 700 W respectivamente).

Amostras de fitoplâncton liofilizadas (0,05 a 0,15 gramas) foram submetidas a decomposição (6 mL de HNO₃ e 0,5 mL de H₂O₂) com aquecimento no mesmo forno micro-ondas citado acima por (5 minutos a 400 W, 8 minutos a 700 W e 4 minutos a 320 W). Além da quantificação, os fatores de bioacumulação (FB) do As no fitoplâncton foram calculados como sendo a razão entre a concentração de As total no fitoplâncton (µg/kg) e a concentração de As total na água (µg/L).

O conteúdo de As total foi determinado utilizando HG-AFS, com as seguintes condições instrumentais, fluxos 5 mL/min para o NaBH₄ e 10 mL/min para as soluções das amostras e branco. Os fluxos dos gases são, 300 mL/min para o carregador (Ar) e 2,5 mL/min para o gás de secagem (Ar). Ganho do detector, 10.

A exatidão do método foi avaliada analisando Materiais de Referência Certificados de água (NIST 1640a), sedimento (BCR 320) e fitoplâncton (BCR 414). Todas as análises destinadas à quantificação do As foram realizadas no laboratório do Grupo de Química Ambiental do Instituto de Química/Unicamp.

4.4. Análise da comunidade microbiana das lagoas salino-alcálinas

4.4.1. Extração do DNA total das amostras ambientais para análise metagenômica

Amostras de água foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL (em triplicata), preservadas em nitrogênio líquido e conduzidas até o laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no CENA/USP, em Piracicaba/SP.

As amostras foram liofilizadas e a extração do DNA total foi realizada utilizando o kit PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA),

seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado nos espectrofotômetros NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies™), e a integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE 1x (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), com aplicação de 1µL do produto do DNA extraído misturado a 2µL de corante gel “*loading buffer*” para aumentar a densidade da amostra com corante fluorescente GelRed™. A visualização do gel foi feita em fotodocumentador “Kodak Gel Logic 212 - Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA).

4.4.2 Sequenciamento metagenômico

O preparo das bibliotecas metagenômicas foi realizado com o kit *Nextera XT DNA Sample Preparation* (Illumina, Inc. EUA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificadas e fragmentadas foram encaminhadas ao Laboratório de Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia (ESALQ/USP) para o processamento final das amostras e o sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc., USA) com kit *HiSeq Reagent Kit V4* (Illumina, Inc., USA). A qualidade das leituras obtidas pelo sequenciamento metagenômico foi avaliada pelos gráficos de qualidade gerados pelo programa FastQC 0.10.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Além disso, foram verificadas sobreposições nos pares de leituras dos fragmentos e geradas sequências consenso pelo programa PEAR (Pair-End reAd mergeR) (Zhang et al., 2014). Posteriormente, as sequências que apresentaram uma qualidade Phred menor que 20 e tamanhos menores que 50 pb foram removidas utilizando o filtro do programa Seqclean 1.3.12 (<http://cores.ibest.uidaho.edu/software/seqclean>) (Zhbannikov et al., 2017).

Os arquivos gerados ao final dos procedimentos foram submetidos à anotação automática no servidor MG-RAST (Metagenomes Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Meyer et al., 2008).

4.4.3 Detecção de genes específicos

Para entender a dinâmica da ciclagem de arsênio nessas salinas, foram selecionados genes de referência associados aos processos de transformações desse elemento mediados por micro-organismos. Os genes selecionados foram:

- (i) genes envolvidos na oxidação do As III: *aioA*, *arxA*;
- (ii) genes envolvidos na redução do As V: *arrA*, *arrB*, *arsC*;
- (iii) genes relacionados ao transporte de arsênio: *arsD*, *arsA*, *arsB*, *acr3*;
- (iv) genes envolvidos no processo de metilação e demetilação do As III: *arsM* e *arsI*.

Sequências de referência para esses genes foram obtidas no banco de dados curado *FunGene – The Functional Gene Pipeline and Repository* (<http://fungene.cme.msu.edu/>) (Fish et al., 2013), e em sequência foram filtradas para no mínimo 90% de HMM Coverage, porcentagem pelo modelo HMM que corresponde à sequência da proteína codificada pelo gene. Cada sequência depositada neste banco de dados possui uma identificação taxonômica associada a ela, que permite posteriormente a inferência taxonômica associada aos genes.

A detecção dos genes foi realizada por meio da estratégia de mapeamento utilizando o programa Bowtie 2 (Langmead; Salzberg, 2012). Para isso, as sequências provenientes do metagenoma foram alinhadas com as sequências de referência obtidas e posteriormente os dados foram indexados pelo programa SAMtools (Li et al., 2009). As sequências alinhadas às sequências de referência foram visualizadas através da ferramenta Tablet (Milne et al., 2010). Os dados dos diferentes genes mapeados associados ao metabolismo do arsênio foram normalizados e analisados estatisticamente com o software SHAMAN (<http://shaman.pasteur.fr/>).

Os grupos que apresentaram esses genes foram identificados permitindo, portanto, estruturar e comparar as lagoas e a sazonalidade utilizando como base a sua abundância relativa.

4.4.4 Análises estatísticas

Os resultados das análises químicas e da comunidade microbiana foram previamente avaliados quanto à normalidade dos dados. Este passo foi realizado seguindo o teste de Shapiro-Wilk com p-valor de 0.05.

Quando os dados não apresentaram distribuição normal, aplicou-se a transformação de Johnson com objetivo de encontrar a normalidade para os dados. Quando a transformação não foi efetiva as amostras foram avaliadas com testes não-paramétricos, tais como os testes de Kruskal-Wallis e o teste de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, ambos seguindo os valores de significância de 5% ($p \leq 0,05$) na comparação das variáveis analisadas.

As diferenças nas comunidades totais foram avaliadas de acordo com a sazonalidade (anos 2017 e 2018) e ainda, de acordo com as concentrações qualitativas de As. No geral, as concentrações de As foram mais elevadas no período de seca, no entanto, uma análise de

agrupamento estatístico (k-means clustering) foi realizada com o intuito de avaliar grupos com altas e baixas concentrações, de acordo com o teste Wilk's Lambda em duas classes. As diferenças entre os grupos analisados (sazonalidade e concentração de As), foi avaliada utilizando a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e o teste de PERMANOVA para verificação da significância na variação dos grupos. Esta análise foi também conduzida na comunidade associada aos genes específicos de transformação do Arsênio, seguindo os mesmos padrões de verificação.

Análises dos índices de diversidade de Shannon e a estimativa de riqueza de famílias, pelo método não-paramétrico Chao1 foram realizadas usando-se o programa PAST, buscando assim encontrar padrões de agrupamento que possam fornecer informações sobre correlações entre as comunidades microbianas associadas ao metabolismo de arsênio e as diferentes lagoas amostradas (Hammer et al., 2001). A significância entre a variação na diversidade e riqueza em nível de sazonalidade e concentrações de As foram realizadas de forma similar aos testes previamente descritos (ANOVA e Kruskal-Wallis). Análises gráficas da taxonomia, tanto em níveis de As como avaliando a sazonalidade foram desenvolvidas em pacotes como SHAMAN (Volant et al., 2019) e Animalcules (Zhao et al., 2020). A correlação entre os perfis taxonômicos e funcionais dessas comunidades com os atributos físico-químicos das lagoas salino-alcálicas foi demonstrada através de uma ordenação gerada por uma análise de redundância (RDA) por meio do programa CANOCO 4.5 com o método de “*Forward Selection*” (Ter Braak, Smilauer, 2002).

4.5. Análises genômicas

4.5.1 Isolamento de cianobactérias

Em estudos anteriores, as maiores concentrações de arsênio na água foram detectadas em lagoas com presença de florações de cianobactérias (Barbiéri et al., 2007; Richter et al., 2019). Para conhecer a contribuição das cianobactérias no ciclo biogeoquímico do arsênio realizou-se o isolamento destas e a busca de genes envolvidos no metabolismo do arsênio em genomas cianobacterianos.

O isolamento das cianobactérias foi realizado por meio da técnica de seleção por capilaridade ou “pescaria”. Esta técnica consiste em inocular um tricoma ou célula da amostra da natureza em tubos de ensaio com meio de cultivo líquido específico. Com esta finalidade, uma lâmina de vidro foi flambada em chama de fogo, em seguida foi adicionada uma gota da amostra e várias gotas de meio de cultivo Z8 modificado (com $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$; pH 9,5) por

apresentar as características mais próximas do encontrado nas lagoas salino-alcálicas. Com o auxílio de micropipeta e microscópio óptico foram retirados tricomas da gota da amostra, transferindo-os para outra gota com meio de cultura limpo e assim sucessivamente, até conseguir chegar a um tricoma apenas da espécie de interesse; este tricoma isolado foi transferido para um tubo de ensaio com meio de cultura líquido e a partir deste processo de “pescaria” foi possível isolar clones de cada linhagem de interesse. As linhagens são mantidas em condições de cultivo no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA em meio líquido Z8 (modificado), em condições controladas: temperatura de 21 ± 1 °C, sob luz fluorescente (irradiância de $40\text{-}50 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), umidade 40 ± 5 % com fotoperíodo 14:10 h (claro:escuro). A descrição morfológica dos isolados foi feita através das características diacríticas dos gêneros de acordo com o esquema sistemático proposto por Komárek e Anagnostidis (1989) e revisado por Hoffmann et al. (2005), International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants and Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, além de outras revisões (Andreote et al., 2014; Genuário et al., 2017; Korelusova et al., 2009; Santos; Sant’anna, 2010; Santos, 2013). Na análise morfológica e morfométrica foi empregado o microscópio óptico de luz Zeiss Axioskop 40 equipado com um sistema de imagem digital Axio- Vision LE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As linhagens isoladas foram fotografadas no microscópio óptico de luz e em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP. A análise morfológica foi feita observando a organização celular, morfologia geral do tricoma e células vegetativas, presença de aerótopos, presença e medida de heterócitos e acinetos.

4.5.2 Anotação de genes de resistência ao arsênio em genomas cianobacterianos

Na busca dos genes *ars* relacionados a resistência do arsênio foram utilizados os genomas das linhagens isoladas do Pantanal e 13 genomas de cianobactérias isoladas de ambientes alcalinos depositados no banco de dados GenBank, do NCBI para análise comparativa desses genes de resistência (Tabela 2).

Os *contigs* gerados nas montagens dos genomas foram submetidos à predição gênica automática utilizando o software Prokka 1.13 (Seeman, 2014). A ordenação e visualização dos genes investigados foram verificadas pela anotação manual usando o programa Artemis 18.0.0 (Carver et al., 2012). As regiões de interesse foram identificadas por meio de alinhamento local utilizando a ferramenta Blast confrontadas com as sequências de referência contendo os genes de interesse. Os domínios e famílias proteicas foram determinadas com CDART (Geer, 2002) e Pfam (El-Gebali et al., 2019).

Tabela 2. Relação de cianobactérias alcalifílicas selecionadas cujas sequências genômicas estavam disponíveis no banco de dados GenBank em outubro de 2019 (Continua)

| Espécies | Local do isolamento | Tamanho (Mpb) | (G+C) % | BioProject | No. scaffold | Referência |
|---|---------------------------------------|----------------------|----------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528 | Brasil, MS: Salina Preta | 6,54 | 49,56 | - | 314 | Não publicado |
| <i>Anabaenopsis elenkinii</i> CCIBt3563 | Brasil, MS: Salina Reserva | 4,60 | 41,94 | - | 4 | Não publicado |
| <i>Geminocystis</i> sp. CENA526 | Brasil, MS: Salina Centenário | 5,06 | 34,39 | - | 740 | Não publicado |
| <i>Limnospira</i> sp. CENA597 | Brasil, MS: Salina Grande | 9,16 | 44,3 | - | 4 | Não publicado |
| <i>Limnospira</i> sp. CENA650 | Brasil, MS: Lagoa 08SR | 6,21 | 44,3 | - | 609 | Não publicado |
| <i>Pantanalinema rosanea</i> CENA516 | Brasil, MS: Salina Verde | 7,38 | 49,64 | - | 321 | Não publicado |
| <i>Arthrospira maxima</i> CS-328 | Chade, Africa: Lago Chade | 6,00 | 44,8 | 29085 | 129 | Carrieri et al. 2011 |
| <i>Limnospira platensis</i> C1 | Chade, Africa: Lago Bodou, Kanem | 6,09 | 44,8 | 67617 | 1 | Cheevadhanarak et al., 2012 |
| <i>Limnospira platensis</i> NIES-39 | Chade, Africa: Lago Chade | 6,79 | 44,3 | 42161 | 1 | Fujisawa et al., 2010 |
| <i>Limnospira platensis</i> YZ | China: Lago Chenghai, Yunnan Province | 6,52 | 44,2 | 299041 | 1 | Xu et al., 2016 |
| <i>Limnospira platensis</i> Paraca | Desconhecida | 6,50 | 44,3 | 34793 | 268 | Lefort et al., 2014 |

Tabela 2. Relação de cianobactérias alcalifílicas selecionadas cujas sequências genômicas estavam disponíveis no banco de dados GenBank em outubro de 2019 (Conclusão).

| Espécies | Local do isolamento | Tamanho (Mpb) | (G+C) % | BioProject | No. scaffold | Referência |
|--|--|--------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| <i>Arthrospira</i> sp. O9.13F | Rússia,Omsk:Lago Solenoye | 4,95 | 44,5 | 384118 | 928 | Não publicado |
| <i>Limnospira</i> sp. PCC 8005^f | Desconhecida | 6,23 | 44,7 | 40633 | 1 | Janssen et al. 2010 |
| <i>Arthrospira</i> sp. TJSD091 | Bohai seaside wetland, China | 6,31 | 44,7 | 280496 | 25 | Dong et al., 2015 |
| <i>Arthrospira</i> sp. TJSD092 | Coastal wetland pond, China | 6,43 | 44,9 | 448786 | 1 | Não publicado |
| <i>cyanobacterium</i> PCC 7702 | Islândia, Reykjavik: fontes termais | 4,84 | 42,4 | 158823 | 4 | Shih et al., 2013 |
| <i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC7202 | Chade, Africa: Lago alcalino | 3,16 | 38,7 | 39697 | 1 | Shih et al., 2013 |
| <i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327 | Chade, Africa: Lago Chade | 3,16 | 38,7 | 39697 | 1 | Não publicado |
| <i>Spirulina subsalsa</i> PCC9445 | Lago vulcânico, Pantelleria, Itália | 5,22 | 47,4 | 158827 | 2 | Shih et al., 2013 |

4.6. Toxicidade do arsênio para *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650

Os testes de toxicidade do As por meio da inibição do crescimento das linhagens *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650 foram realizados de acordo com o protocolo OECD 201 (Organization for Economic Cooperation and Development) *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test* (2011). Nesses testes, avaliaram-se os efeitos do As (V) sobre a sobrevivência e o crescimento dessas cianobactérias responsáveis pelas florações nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal.

Anteriormente ao teste de toxicidade, realizou-se a contagem de células em microscópio óptico e a medida da densidade óptica (OD) a 680 nm em espectrofotômetro. Para isso, foi transferido 1 mL das culturas em fase exponencial para um tubo Falcon, acrescentaram-se duas gotas de solução de lugol e manteve ao abrigo da luz por 30 minutos.

Após o processo de homogeneização, a amostra foi transferida para câmara de contagem Fuchs-Rosenthal e após sedimentação das células estas foram contadas. Os dados referentes à contagem de células e absorvância foram plotados em gráfico e por regressão linear estabeleceu-se a correlação entre as variáveis (Figura 3). Essa correlação foi usada para obter valores de número de células no experimento de toxicidade onde apenas as medidas de densidade óptica foram realizadas.

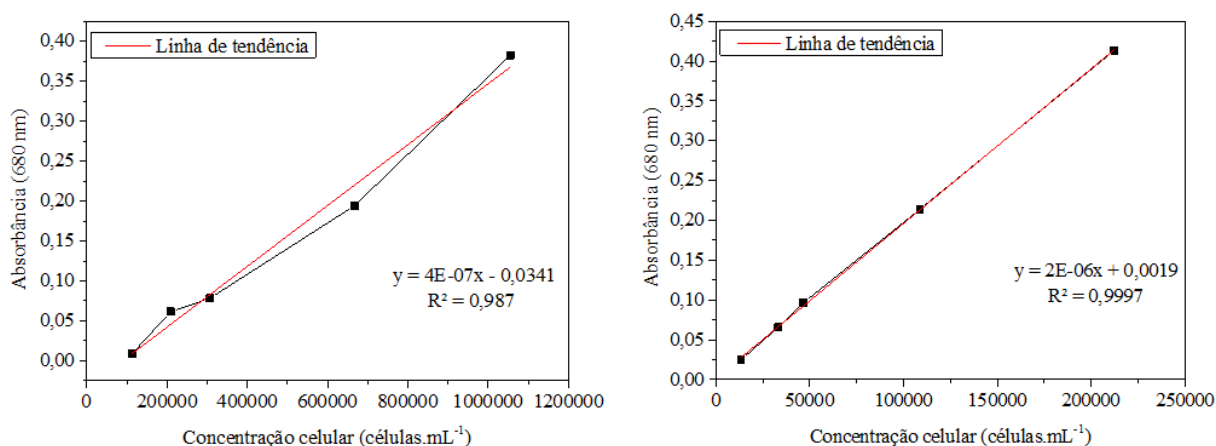


Figura 3. Regressão linear simples entre o crescimento monitorado por densidade óptica (680nm) e contagem celular ao microscópio para as culturas de *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650 na ausência de arsênio.

As concentrações máximas de arsênio toleráveis pelas cianobactérias CENA651 e CENA650 foram determinadas através da avaliação de crescimento das culturas. Inóculos (3 mL) das culturas, em fase de crescimento exponencial, foram adicionados em frascos

Erlenmeyers 125 mL, contendo 60 mL do meio de cultura Z8 modificado (com 7,5 g L⁻¹ NaCl; pH 9,5) e concentrações de 400; 600; 800; 1000; 1200; 2000; 2500; 3000; 3500 e 4000 mg.L⁻¹ de As (V) (Na₂HAsO₄.7H₂O). Avaliou-se somente o As (V) por ser a espécie química predominante no Pantanal. As concentrações de 400 a 1200 mg.L⁻¹ de As (V) foram delineadas em experimentos prévios e em decorrência das cianobactérias CENA651 e CENA650 estarem adaptadas as lagoas salino-alcálicas com até 3 mg L⁻¹ de arsênio total (Richter et al., 2019).

O crescimento das cianobactérias foi monitorado através da leitura da densidade ótica (OD) a 680 nm, durante 144 horas, com o intuito de verificar se as concentrações de arsênio utilizadas produziam toxicidade aguda. O número de células das culturas amostradas foi estimado através dos valores obtidos de densidade ótica, utilizando as equações geradas na regressão linear. Todos os frascos foram mantidos a temperatura de 24 °C, com fotoperíodo 14:10 h (claro:escuro). Todas as concentrações-teste e controle foram avaliadas em triplicata.

As taxas médias de crescimento para um período específico (144 horas) foram calculadas a partir das taxas de crescimento das cianobactérias em função do tempo, de acordo com a equação $\mu_{i-j} = \ln X_j - \ln X_i / (t_j - t_i)$ (dia⁻¹), onde μ é a taxa média de crescimento do período i ao j , X_i é a medida do crescimento no tempo i , e X_j é a medida do crescimento no tempo j . Estes dados foram então inseridos no software Origin 9 para verificação da EC₅₀ (concentração de exposição que mata 50% dos organismos testados).

Para avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas, o software Bioestat 5.0. foi utilizado empregando a análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis.

4.7. Especificação química do arsenato de sódio (Na₂HAsO₄.7H₂O) no meio de cultura Z8 modificado

O comportamento do arsenato de sódio nas concentrações 400; 600; 800; 1000; 1200; 2000; 2500; 3000; 3500 e 4000 mg.L⁻¹ no meio de cultura Z8 modificado, ou seja, a formação de espécies químicas de arsênio através das interações deste metal com os componentes do meio de cultura (sais e complexantes de metal) foi avaliado utilizando o software Visual MINTEQ ver. 3.1 (Gustafsson, 2015). Esse software calcula a atividade e concentração das espécies químicas em solução. Para essa análise, foi feita a entrada no programa dos componentes do meio de cultura com suas respectivas concentrações e as diferentes

concentrações de arsênio. Estabeleceram-se, também as condições ambientais de pH 9,5 e temperatura 25°C.

Esta análise foi realizada visando conhecer a concentração da forma iônica As^{+5} , considerada tóxica, no meio de cultura onde as células de cianobactérias tiveram o seu crescimento avaliado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises químicas

As características químicas e físicas são consideradas relevantes para determinação da estrutura e diversidade das comunidades microbianas (Hahn, 2006), além de caracterizar as áreas avaliadas.

Nas duas coletas realizadas nas lagoas salino-alcálicas (período de seca e cheia), os níveis de água estavam bem distintos. Essas diferenças refletem na concentração dos diferentes parâmetros físico-químicos avaliados (Tabela 3).

A análise dos elementos químicos presentes nas lagoas demonstrou que a concentração dos mesmos tende a aumentar nos períodos de seca e diminuir nos períodos de cheia. No período de seca, observa-se que os valores de condutividade, salinidade e alcalinidade variaram respectivamente entre 1,78 (07SR) a 39,25 (08SR) $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 0,99 (07SR) a 25,12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (08SR) e 8,03 (07SR) a 200,02 (08SR) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Valores semelhantes foram encontrados em outras lagoas salino-alcálicas da região da Nhecolândia (Andreote et al., 2014; Furian et al., 2013). Por outro lado, no período de cheia ocorreu uma elevada diluição e essas três variáveis apresentaram-se, respectivamente entre 0,56 (07SR) a 1,73 (04SR) $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 0,53 (07SR) a 1,63(04SR) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 3,60 (07SR) a 8,94 (04SR) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A diferença sazonal observada no bioma Pantanal é regulada pelo balanço hidrológico. Em decorrência da elevada temperatura e forte incidência solar na época de seca, verifica-se um balanço negativo na relação chuva/evaporação, acarretando na concentração dos elementos químicos na água (Barbiéro et al., 2018). Enquanto no período de chuva ocorre a diluição destes elementos.

As lagoas com florações de cianobactérias (04SR e 08SR) apresentaram maiores concentrações de salinidade, alcalinidade, teores de macronutrientes como, nitrogênio, fósforo, potássio e pH acima de 9. Semelhantemente, em países como Etiópia, Quênia e Tanzânia, encontram-se lagoas com as mesmas condições, sendo ambientes altamente produtivos com a dominância de cianobactérias filamentosas, dos gêneros *Anabaenopsis* e *Arthrospira* (Hamisi et al., 2017). Este último apresenta uma elevada tolerância a altos níveis de alcalinidade, o que explica sua dominância em lagoas salino-alcálicas (Burganskaya et al., 2018). Esta dominância se altera com a redução da salinidade e ocorrem florações do gênero *Anabaenopsis*, a qual também se adapta facilmente às condições físico-químicas extremas (Santos et al., 2018).

As lagoas 06SR e 07SR apresentaram maiores concentrações de elementos inorgânicos como Al, Fe, Mg, Mn, NO_2^- , indicando que pode estar ocorrendo a ciclagem de diferentes elementos nesses ambientes. Micro-organismos, como bactérias e fungos, que oxidam o Mn são amplamente distribuídos em sistemas aquáticos, nos solos e sedimento, sugerindo que eles possuem um papel de fundamental importância no ambiente (Banh et al., 2013; Tebo et al., 2005). Outra característica comum compartilhada por uma grande diversidade de bactérias é a capacidade de reduzir ferro, utilizando-o como acceptor final de elétrons com a geração de energia para a manutenção e crescimento (Melton et al., 2014).

Dentre os micronutrientes analisados verificou-se que o boro apresentou elevadas concentrações nas lagoas com florações de cianobactérias. Esse é considerado um micronutriente importante para o crescimento celular de cianobactérias (Abreu et al., 2014; Uluisik et al., 2018) e pode estar contribuindo para a dominância desses micro-organismos nesse ambiente.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros físico-químicos nos períodos de seca e cheia.

| Variáveis | Unidades | 04SR | | 06SR | | 07SR | | 08SR | |
|---------------------|---------------------------------|---------|--------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|
| | | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia |
| Temperatura | °C | 26,43 | 26,12 | 37,66 | 26,34 | 27,25 | 27,11 | 35,05 | 25,41 |
| pH | | 10,01 | 10,03 | 9,69 | 9,09 | 8,55 | 8,62 | 10,07 | 9,42 |
| E.C. | $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ | 16,29 | 1,73 | 17,99 | 0,68 | 1,78 | 0,56 | 39,25 | 1,00 |
| Salinidade | $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 11,11 | 1,63 | 9,72 | 0,83 | 0,99 | 0,53 | 25,12 | 0,97 |
| Alcalinidade | $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 97,50 | 8,94 | 66,95 | 3,72 | 8,03 | 3,60 | 200,02 | 5,21 |
| TDS | $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 12,03 | 1,78 | 10,02 | 0,84 | 1,06 | 0,552 | 30,44 | 1,01 |
| DOC | | 920 | 79,02 | 306 | 12,08 | 76 | 15,95 | 5320 | 40,35 |
| DIC | | 1200 | 171,01 | 1080 | 54,87 | 170 | 48,23 | 1510 | 91,83 |
| TN | | 1511 | 17,49 | 291 | 1,99 | 419 | 2,22 | 3394 | 5,94 |
| TDN | | 1389,70 | 10,94 | 177,18 | 1,01 | 419,95 | 1,27 | 2819,32 | 4,28 |
| TP | | 179,1 | 3,35 | 155,2 | 1,28 | 9,43 | 0,07 | 207,3 | 0,43 |
| NH_4^+ | | 5,51 | 0,69 | 0,29 | 0,04 | 0,31 | 0,04 | 2,75 | 0,07 |
| NO_2^- | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0,18 | 0,03 | 0,33 | 0,09 | 0,016 | 0,003 | 0,66 | 0,003 |
| NO_3^- | | 287,43 | 0,12 | 291,71 | 0,25 | 52,79 | 0,014 | 417,79 | 0,03 |
| oPO_4^{3-} | | 84,09 | 2,38 | 86,92 | 5,42 | 0,42 | 0,07 | 60,42 | 0,43 |
| Na^+ | | 6735 | 563 | 6018 | 222 | 432 | 84 | 14370 | 232 |
| K^+ | | 1739 | 150 | 959 | 49 | 188 | 46 | 1680 | 48 |
| Ca^{2+} | | 316 | 66 | 581 | 78 | 81 | 41 | 407 | 53 |
| Mg^{2+} | | 138 | 24 | 192 | 14 | 43 | 20 | 203 | 9 |
| Cl^- | | 381 | 40 | 529 | 20 | 39 | 7 | 1056 | 26 |
| SO_4^{2-} | | 20 | 0,01 | 809 | 22 | 2,79 | 0,48 | 1339 | 12 |
| Al | $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0,32 | 0,01 | 1,16 | 9,40 | 0,009 | 0,01 | 0,15 | 0,05 |
| B | | 6,03 | 0,51 | 2,02 | 0,10 | 0,29 | 0,09 | 10,87 | 0,29 |
| Cu | | 0,04 | 0,15 | 0,08 | 2,97 | 0,01 | 0,95 | 0,04 | 0,37 |
| Fe | | 0,27 | 0,14 | 0,93 | 41,64 | 0,06 | 0,07 | 0,17 | 0,27 |
| Mn | $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0,12 | 0,01 | 0,22 | 1,60 | 0,87 | 0,07 | 0,21 | 0,03 |
| Si | | 207 | 35,53 | 100 | 91,01 | 64 | 27,51 | 173 | 31,99 |
| Zn | $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 75 | 6,43 | 30 | 60,32 | 15 | 11,74 | 60 | 8,22 |
| Clorofila- <i>a</i> | | 2046 | 122,11 | 0,15 | 9,83 | 0,23 | 5,89 | 11348 | 36,98 |

E.C. = condutividade elétrica; Alcalinidade: como ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^-$); TDS: Sólidos dissolvidos totais; DOC: Carbono orgânico dissolvido; DIC: Carbono inorgânico dissolvido; TN: Nitrogênio total; TDN: Nitrogênio dissolvido total; TP: Fósforo total.

5.2. Análises de Arsênio total

Dentre todas as comunidades microbianas presentes na água das lagoas salino-alcalinas, o enfoque principal deste trabalho foi avaliar aquelas que participam da ciclagem do arsênio. Portanto, foi feita a quantificação do As total presente nas amostras de água, sedimento e fitoplâncton.

Todas as lagoas, no período de seca, apresentaram elevadas concentrações de arsênio dissolvido na água, as quais variaram de 53,17 a 1721,68 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que os maiores valores foram observados nas lagoas preta e verdes (com florações de cianobactérias) (Figura 4). As concentrações de As encontradas na água destas lagoas foram muito maiores que as reportadas em outras lagoas, como as lagoas canadenses de água doce altamente contaminadas com rejeitos de mineração ($250 \pm 100 \mu\text{g L}^{-1}$) (Caumette et al., 2011).

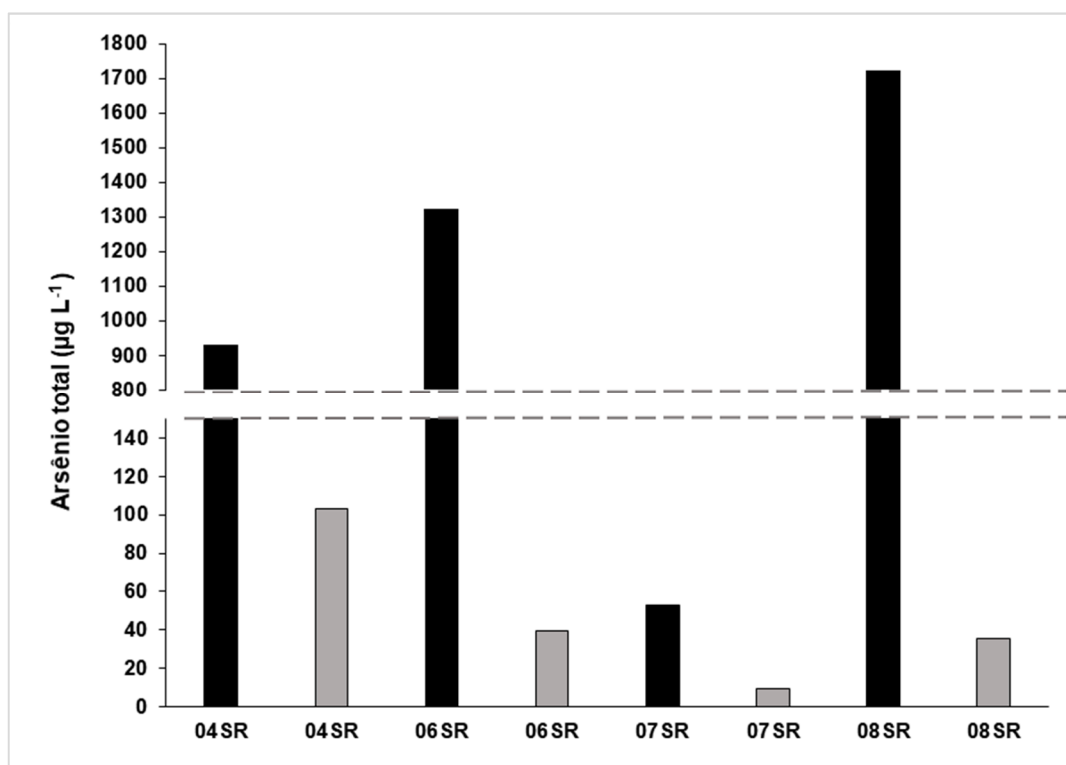


Figura 4. Concentração de arsênio total nas amostras de água coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas).

Por outro lado, no período de cheia, as concentrações de As em amostras de água coletadas nas mesmas lagoas foram significativamente menores, variando entre 9,24 e 102,86 $\mu\text{g L}^{-1}$, e estavam de 9 a 49 vezes mais baixas que no período de seca. Estas diferenças podem ser atribuídas ao processo de diluição, uma vez que na época de seca, o nível de água das lagoas encontrava-se excepcionalmente baixo, favorecendo a concentração do arsênio devido à

evaporação extrema, enquanto que na época de cheia, o nível de água encontrava-se excepcionalmente alto.

As concentrações de As nas amostras de água, exceto na lagoa 07SR (período de cheia) estavam acima das diretrizes estabelecidas para águas doces ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) (Brasil, 2011; WHO, 2008), sendo que, a concentração mais alta excedeu em 172 vezes os padrões permitidos. Concentrações na mesma faixa já foram reportadas em lagoas salino-alcálinas do Pantanal, localizadas nas fazendas Nhumirim (Barbiéro et al., 2007) e Centenário (Richter et al., 2019), demonstrando que a contaminação por As das águas das lagoas salino-alcálinas do Pantanal da Nhecolândia é um processo regional (Richter et al., 2019).

O alto teor de arsênio dissolvido nas águas das lagoas salino-alcálinas da região da Nhecolândia deve-se: (1) ao processo de evaporação, o qual concentra o arsênio junto com outras espécies dissolvidas, tais como carbonatos e fluoretos secundários, e numa menor proporção sulfatos e cloretos (Barbiero et al., 2007; Richter et al., 2019); (2) a adsorção competitiva entre As e estes íons limita a adsorção do As sobre qualquer tipo de partícula (Goldberg, 2002); (3) o aumento da concentração do As dissolvido ocorre simultaneamente com um aumento do pH, o que limita a adsorção do As(V) sobre o material particulado (Richter et al., 2019)

As concentrações de As total nos sedimentos coletados nos períodos de seca e cheia variaram entre 3,3 a $20,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 5), sem diferenças significativas entre os dois períodos, exceto na lagoa cristalina 07SR, na qual a concentração de As foi significativamente maior no período de seca, quando as águas estavam mais mineralizadas que no período de cheia.

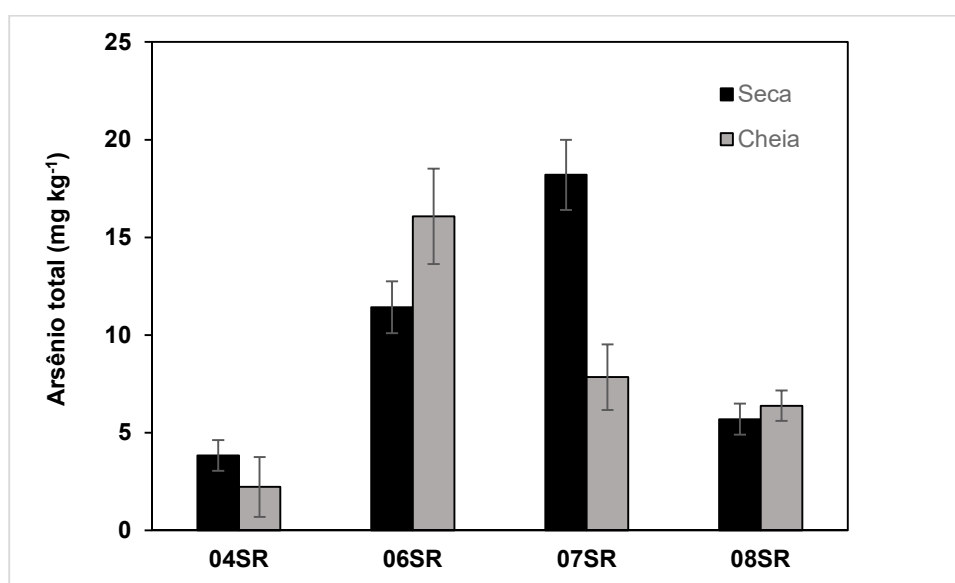


Figura 5. Concentração de arsênio total nas amostras de sedimentos coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas).

As lagoas salino-alcálinas apresentaram altos níveis de As na água (até 1721,68 $\mu\text{g L}^{-1}$), no entanto, as concentrações de As no sedimento foram consideradas baixas quando comparadas com os valores relatados por Caumette et al. (2011) que variaram entre 34 mg kg^{-1} em lagoa de água doce não contaminada e 698 mg kg^{-1} em lagoa altamente contaminada, embora a concentração de As na coluna de água desta última fosse muito menor ($250 \pm 100 \mu\text{g L}^{-1}$). Apesar do teor de As nas águas das lagoas canadenses serem menores, o pH dessas variaram de 7,6 a 7,9 o que torna mais favorável à adsorção de As em partículas, contrariamente ao que ocorre nas lagoas do Pantanal, nas quais o pH variou de 8,5 a 10.

Estes dados mostram que o ambiente alcalino das lagoas favorecem a manutenção do arsênio em solução e limita sua adsorção no material particulado que se deposita para formar o sedimento. De fato, o arsenato (As V) espécie majoritária encontrada nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal (Richter et al., 2019), possui alta adsorção em óxidos e argilas em pH baixo e diminui com o aumento do pH, ou seja, acima de pH 9 para óxido de Al, pH 7 para óxido ou hidróxido de Fe, ilita e caulinita (Cornu et al., 1999; Goldberg, 2002).

Vários estudos realizados em sistemas aquáticos com diferentes concentrações de As, relataram que micro-organismos como bactérias e fitoplâncton desempenham papéis importantes na especiação, distribuição e ciclagem de As nesses ambientes (Navratilova et al., 2011, Price et al., 2012, Rahman; Hasegawa, 2012).

As concentrações de As total no fitoplâncton coletado no período de seca variaram entre 22,7 e 39,9 mg kg^{-1} (Figura 6A). Por outro lado, no período de cheia, as concentrações variaram entre 3,67 e 12,2 mg kg^{-1} e foram de 3 a 10 vezes inferiores quando comparadas com as amostras coletadas no período de seca. Ressalta-se que tal resultado era esperado, uma vez que no período de seca as concentrações de As dissolvido na água das lagoas estavam elevadas em razão da seca extrema no período da coleta. Os resultados permitiram verificar que existe variação sazonal nas concentrações de As em fitoplâncton.

O FB do As em relação à água variou entre 11 e 427 no fitoplâncton presente nas lagoas 04SR (com floração de cianobactérias) e 07SR (sem floração) respectivamente (Figura 6B). Estes valores são relativamente baixos se comparados com os resultados reportados por Caumette et al. (2011) em lagoas contaminadas com menores concentrações de As na água.

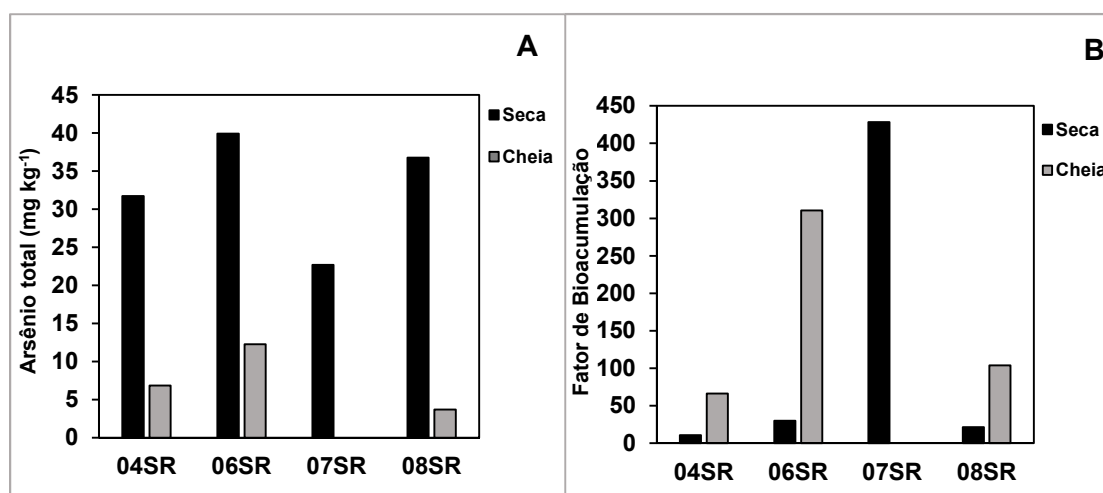


Figura 6. (A) Concentração de arsênio total nas amostras de fitoplâncton **(B)** Fator de bioacumulação no fitoplâncton nas amostras coletadas nos períodos de seca (barras pretas) e cheia (barras cinzas).

Os organismos fitoplanctônicos apresentaram baixo fator de bioacumulação em relação ao arsênio. Este fato pode ser decorrente da capacidade dos micro-organismos em tolerar e/ou metabolizar o As. Devido à semelhança físico-química entre As V (AsO_4^{3-}) e o fosfato (PO_4^{3-}), o fitoplâncton sob condições de depleção de fosfato absorve maiores quantidades de As V através dos transportadores de PO_4^{3-} (Hasegawa et al., 2019; Rahman et al., 2012). Para reduzir o efeito tóxico, os micro-organismos fotossintéticos biotransformam AsV dentro de suas células em um processo que envolve uma redução de dois elétrons de AsV em AsIII, mediado pela glutathiona, e posteriormente o AsIII pode sofrer metilação ou ser excretado para fora da células (Ye et al., 2012; Yin et al., 2011).

Além disso, vários processos podem estar ocorrendo na coluna de água limitando a biodisponibilidade do As, como a complexação. Os principais compostos responsáveis pela complexação de metais/metalóides são matéria orgânica dissolvida (MOD), como por exemplo as substâncias húmicas aquáticas (AHS), assim como a matéria orgânica natural excretada (MOE) pelo fitoplâncton (Tonietto et al., 2014; Ye et al., 2011; Warwick et al., 2005). Vários estudos destacaram que MOE pelo fitoplâncton contribuíram para a diminuição da biodisponibilidade de metais em ambientes aquáticos (Choueri et al., 2009; Lorenzo et al., 2007; Nogueira et al., 2005; Tonietto et al., 2014).

5.3. Análise da comunidade microbiana das lagoas salino-alcálinas

5.3.1 Sequenciamento metagenômico (*shotgun*)

No sequenciamento das amostras coletadas nos períodos de seca e cheia, foram obtidas uma média de 90 e 78 milhões de sequências brutas respectivamente, de amostras das lagoas salino-alcálinas 04SR, 06SR, 07SR e 08SR (Tabela 4). Após o controle de qualidade, estes números foram reduzidos para uma média 45 milhões de sequências no período de seca e 38 milhões de sequências no período de cheia. Devido a variações no volume de dados gerados por amostra, esses foram normalizados para uma melhor compreensão dos resultados.

Tabela 4. Quantidades de sequências geradas

| | Amostras | Nº Sequências brutas | Nº Sequências após filtragens |
|------------------|----------|----------------------|-------------------------------|
| Período de seca | 04SR | 88.748.512 | 44.261.271 |
| | 06SR | 78.668.104 | 39.324.182 |
| | 07SR | 95.314.138 | 47.638.049 |
| | 08SR | 97.648.150 | 48.803.399 |
| Período de cheia | 04SR | 79.979.070 | 39.672.862 |
| | 06SR | 80.159.092 | 39.828.224 |
| | 07SR | 82.993.406 | 41.212.766 |
| | 08SR | 69.815.280 | 34.694.196 |

5.3.2 Composição taxonômica da comunidade microbiana das lagoas salino-alcálinas

Na classificação taxonômica das sequências, observou-se uma predominância de organismos do domínio *Bacteria* (> 94%) nas lagoas salino-alcálinas amostradas (Figura 7). As lagoas preta (06SR) e cristalina (07SR) apresentaram maiores proporções de arqueias, eucariotos e vírus comparadas às lagoas com florações de cianobactérias (04SR e 08SR), mas ainda assim essa proporção equivale a no máximo 5% das sequências.

Andreote et al. (2018) ao estudarem duas lagoas distintas no Pantanal, uma com floração permanente de cianobactérias e outra sem registro de floração, relataram a grande representatividade do domínio *Bacteria* (94,56 – 99,39%) e encontraram em menores quantidades sequências afiliadas a eucariotos, arqueias e vírus. A presença dos domínios *Bacteria* (83,1%) e *Archaea* (10,5%) também foram relatadas por Dudhagara et al. (2015) ao

estudarem a diversidade na lagoa salino-alkalina Lonar, Índia. Indicando ser corriqueira a grande presença de procariotos em lagoas salino-alkalinas.

A lagoa 07SR apresenta maior diversidade microbiana. Isso pode ocorrer devido as condições físicas e químicas dessa lagoa serem menos extremas e mais estáveis em relação às outras. Durante os períodos de seca e cheia, os valores de pH mantiveram-se constantes, indicando que a sazonalidade e a diluição não afetaram as características do potencial hidrogeniônico.

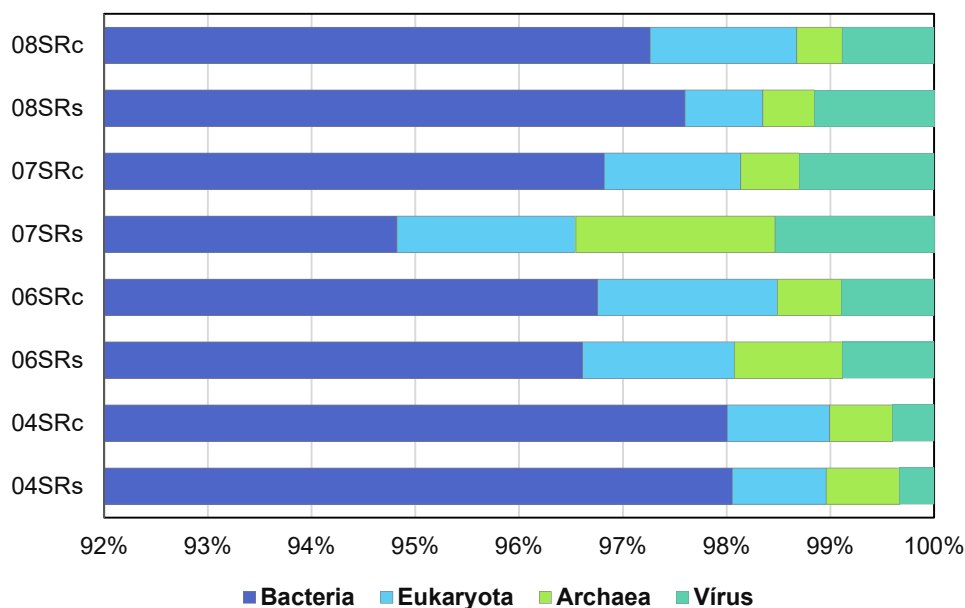


Figura 7. Abundância relativa média (n=3) em nível de domínio nas lagoas salino-alkalinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (s) e cheia (c).

O enfoque deste trabalho foi no domínio *Bacteria* devido à grande representativa e importância nas lagoas salino-alkalinas (Antony et al., 2013; Sorokin et al., 2014).

As lagoas apresentaram 27 filos bacterianos, porém, a abundância desses grupos foram diferentes entre elas e de acordo com as épocas de amostragem (Figura 8). Nas lagoas preta e cristalina (06SR e 07SR) as comunidades predominantes foram de seqüências afiliadas aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Por outro lado, as lagoas 04SR e 08SR, como já era esperado, apresentaram mais seqüências correspondentes ao filo Cyanobacteria, seguida do filo Proteobacteria. Estes resultados corroboram outros já descritos na literatura, onde filos bacterianos, como Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes e Proteobacteria foram encontrados em lagoas salino-alkalinas de diferentes regiões do mundo (Hamamura et al., 2012; Oremland et al., 2017).

No período de cheia, onde os nutrientes encontram-se mais diluídos, observa-se um aumento significativo de organismos dos filos Verrucomicrobia e Planctomycetes que são adaptados a ambientes oligotróficos. Por outro lado, no período de seca, encontram-se organismos adaptados a ambientes com alta disponibilidade de nutrientes, como os Firmicutes (Ho et al., 2017).

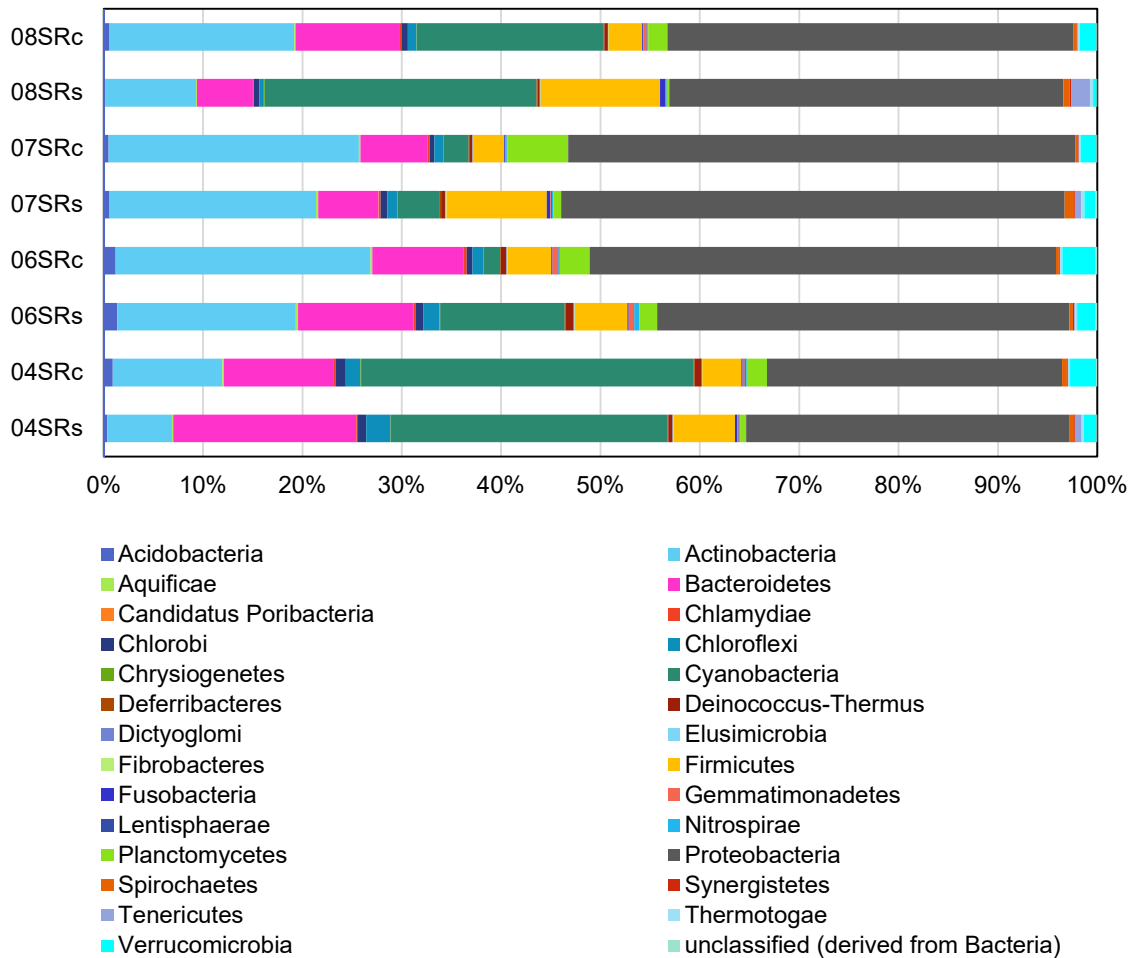


Figura 8. Abundância relativa média (n=3) em nível de filo nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (s) e cheia (c).

5.3.3 Relação entre a comunidade microbiana e as variáveis ambientais

A análise de redundância (RDA) representou 59,4% de toda a variação entre as lagoas, a química da água e a taxonomia associada, com os eixos 1 e 2 da RDA representando 39,6% e 19,8% da variação, respectivamente (Figura 9). Esses eixos também apresentaram correlações espécie-ambiente de 0,996 e 0,990, respectivamente, significando um bom ajuste das comunidades microbianas com as variáveis ambientais.

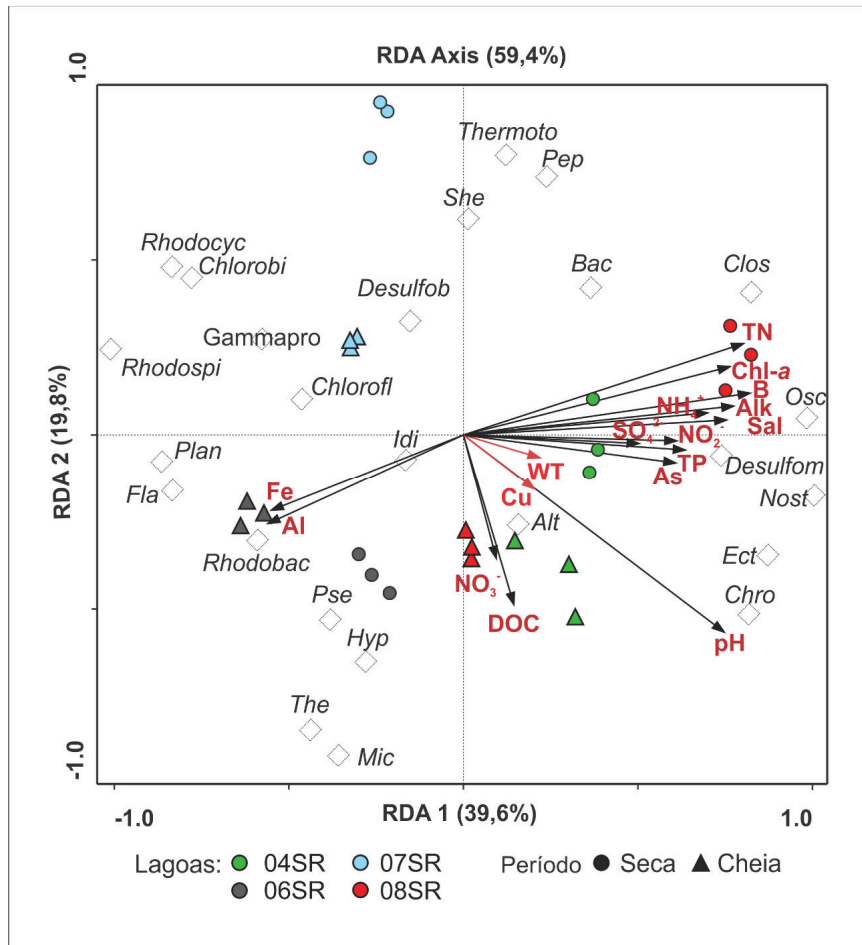


Figura 9. Análise de redundância (RDA) entre a composição da comunidade bacteriana e as variáveis físico-químicas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro. As letras vermelhas representam as variáveis e os losangos a taxonomia. TN: Nitrogênio total; Chl-a: Clorofila; Alk: Alcalinidade; Sal: Salinidade; TP: Fósforo total; WT: Temperatura da água; DOC: Carbôno orgânico dissolvido. Taxonomia: Alt - Alteromonadaceae; Bac - Bacillaceae; Chlorobi - Chlorobiaceae; Chlorofl - Chloroflexaceae; Chro - Chromatiaceae; Clos - Clostridiaceae; Desulfob - Desulfobacteraceae; Desulfom - Desulfomicrobiaceae; Ect - Ectothiorhodospiraceae; Fla - Flavobacteriaceae; Gammapro - Gammaproteobacteria; Hyp - Hyphomonadaceae; Idi - Idiomarinaceae; Mic - Micromonosporaceae; Nost - Nostocales; Osc - Oscillatoriales; Pep - Peptococcaceae; Plan - Planctomycetaceae; Pse - Pseudomonadaceae; Rhodobac - Rhodobacteraceae; Rhodocyc - Rhodocyclaceae; Rhodospi - Rhodospirillaceae; She - Shewanellaceae; The - Thermomonosporaceae; Thermo - Thermotogaceae.

No eixo 1 (RDA1), as variáveis que influenciaram o quadrante negativo (0.0 a -1.0) referiram-se as variáveis inorgânicas, como ferro e alumínio. Por outro lado, no quadrante positivo (0.0 a 1.0), as variáveis correlacionadas entre os táxons e lagoas foram referentes aos teores de nitrogênio total, clorofila, amônio, alcalinidade, salinidade, nitrito, sulfato, fósforo total e arsênio.

No eixo 2 (RDA2), as variáveis que influenciaram no padrão de distribuição dos micro-organismos foram pH, nitrato e carbono orgânico dissolvido. Em relação as lagoas como

um todo, a análise demonstrou que em decorrência das características de seca extrema, devido à baixa altura da água, houve a prevalência de algumas variáveis no agrupamento das lagoas. Apesar de a RDA ter demonstrado essa prevalência foi possível observar uma separação das comunidades.

As lagoas 06SR e 07SR que se agruparam do lado esquerdo da RDA, apresentaram menores concentrações de nutrientes, salinidade e sofreram menos influência da alcalinidade. Na lagoa preta (06SR), no período de seca, organismos da família Rhodobacteraceae, pertencentes ao filo Proteobacteria estiveram diretamente relacionadas aos íons de ferro e alumínio, enquanto a lagoa cristalina (07SR) apresentou organismos das famílias Chloroflexaceae, Rhodocyclaceae, Rhodospirillaceae e Desulfobacteraceae agrupados opostamente a essas variáveis inorgânicas.

As lagoas 04SR e 08SR, no período de seca, encontram-se mais relacionadas com o teor de nitrogênio, fósforo, boro, amônio, arsênio, alcalinidade, entre outros. As cianobactérias das ordens Oscillatoriales e Nostocales apresentaram forte correlação com essas variáveis.

O teor de amônio estar relacionado com o filo Cyanobacteria pode ser justificado pela alta atividade de fixação de nitrogênio realizada por organismos pertencentes a esse filo. Alguns processos como, a capacidade fotossintética, fixação de N₂ (formas heterocitadas), regulação osmótica e celular interna; e a flutuabilidade conferem alta adaptabilidade das cianobactérias as condições extremas (Hamisi et al., 2017; Schagerl; Burian, 2016).

5.3.4 Caracterização funcional das comunidades microbianas envolvidas na ciclagem do arsênio

As altas concentrações de arsênio presente nas lagoas impactam diretamente a composição e funcionalidade da comunidade, visto que determinam a ocorrência de grupos que toleram e/ou metabolizam esse elemento. Devido ao acúmulo, principalmente nas lagoas com florações de cianobactérias, buscou-se encontrar uma relação dessas com os processos de transformação do arsênio.

Primeiro, avaliou-se a presença de grupos gênicos funcionais do metabolismo do arsênio (Tabela 5). Foram identificados sete grupos relacionados à resistência do arsênio, tais como *Arsenate reductase*: enzima responsável pela biotransformação de As(V) para As (III); *Arsenic efflux pump protein*: proteína de membrana capaz de expelir arsenito do citoplasma; *Arsenic resistance protein ArsH*: proteína envolvida na oxidação de compostos trivalentes em algumas bactérias; *Arsenical pump-driving ATPase*: ATPase que conduz o efluxo de As(III);

Arsenical resistance operon repressor: repressor que controla os níveis basais de expressão em resposta a presença do arsenito; *Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD*: metalochaperona que se liga ao As (III) citosólico e o transfere para a subunidade ArsA, esta por sua vez é uma ATPase que forma um complexo com a proteína transmembrana ArsB para expulsar o arsenito da célula.

Independente do período, as lagoas que apresentam florações de cianobactérias (04SR e 08SR) tiveram maiores quantidades de sequências afiliadas ao metabolismo de arsênio, seguido pelas lagoas preta (06SR) e cristalina (07SR). Esses dados corroboram o estudo realizado em lagoas com presença e ausência de floração, no qual relatou-se que o potencial genético de resistência ao As tende a ser maior na lagoa que apresenta floração de cianobactéria (Andreote et al., 2018).

As lagoas 04SR e 08SR apresentaram maiores quantidades de sequências envolvidas com o transporte de arsenito (As III), tais como, *Arsenical-resistance protein ACR3* e *Arsenical pump-driving*. Por outro lado, as lagoas 06SR e 07SR apresentaram maiores quantidades de sequências afiliadas à enzima responsável pela biotransformação de As(V) para As (III).

Tabela 5. Grupos gênicos das funções do metabolismo do arsênio encontrados nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro obtidos pelo MG-RAST: SEED database (valores em %).

| <i>Arsenic resistance</i> | | 04SR | 06SR | 07SR | 08SR |
|---------------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Período de seca | <i>Arsenate reductase</i> | 0,0188 | 0,0222 | 0,0243 | 0,0155 |
| | <i>Arsenic efflux pump protein</i> | 0,0026 | 0,0015 | 0,0010 | 0,0112 |
| | <i>Arsenic resistance protein ArsH</i> | 0,0036 | 0,0024 | 0,0016 | 0,0043 |
| | <i>Arsenical pump-driving ATPase</i> | 0,0705 | 0,0371 | 0,0280 | 0,0502 |
| | <i>Arsenical resistance operon repressor</i> | 0,0050 | 0,0022 | 0,0037 | 0,0053 |
| | <i>Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD</i> | 0,0011 | 0,0006 | 0,0023 | 0,0010 |
| | <i>Arsenical-resistance protein ACR3</i> | 0,1174 | 0,0754 | 0,0588 | 0,0668 |
| | | 04SR | 06SR | 07SR | 08SR |
| Período cheia | <i>Arsenate reductase</i> | 0,0191 | 0,0299 | 0,0320 | 0,0268 |
| | <i>Arsenic efflux pump protein</i> | 0,0002 | - | 0,0001 | 0,0001 |
| | <i>Arsenic resistance protein ArsH</i> | 0,0070 | 0,0018 | 0,0016 | 0,0034 |
| | <i>Arsenical pump-driving ATPase</i> | 0,0891 | 0,0170 | 0,0097 | 0,0657 |
| | <i>Arsenical resistance operon repressor</i> | 0,0031 | 0,0012 | 0,0014 | 0,0021 |
| | <i>Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD</i> | 0,0016 | 0,0005 | 0,0006 | 0,0011 |
| | <i>Arsenical-resistance protein ACR3</i> | 0,1086 | 0,0427 | 0,0372 | 0,0645 |

O banco de dados SEED *Subsystems* forneceu informações sobre os grupos gênicos relacionados ao metabolismo de arsênio presente nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal. Porém, observou-se limitação na afiliação taxonômica relacionada aos processos específicos deste metabolismo. Deste modo, foi avaliada a distribuição taxonômica do perfil funcional

Arsenic resistance buscando identificar os grupos microbianos potencialmente relacionados ao metabolismo avaliado (Figura 10).

Os principais organismos envolvidos com a resistência ao arsênio nas lagoas 04SR, 06SR e 08SR durante o período de seca, cujas concentrações de arsênio estavam elevadas foram as cianobactérias da ordem Chroococcales e da família Nostocaceae, enquanto na época de cheia, quando o arsênio estava mais diluído, observou-se um aumento das sequências de Burkholderiaceae afiliadas ao metabolismo de arsênio. A grande quantidade de sequências afiliadas ao filo Cyanobacteria sugerem a importância desse organismo no processo de resistência ao As nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal.

Várias espécies de cianobactérias habitam ambientes ricos em arsênio (Miyashita et al., 2016). A presença de genes de resistência, principalmente relacionados ao efluxo de arsenito, foram relatados em diversas cianobactérias unicelulares e filamentosas, incluindo *Limnospira* sp. (Dyhrman; Haley, 2011; Guo et al., 2016; Lefort et al., 2014; López-Maury et al., 2003; Sánchez-Riego et al., 2014).

Na lagoa cristalina (07SR) independente da época e concentração de arsênio, as famílias que apresentaram as maiores quantidades de sequências afiliadas ao metabolismo de arsênio foram Rhodocyclaceae e Burkholderiaceae, com predomínio desta no período de cheia.

A presença da família Burkholderiaceae vem sendo relatada em regiões com elevadas concentrações de arsênio (Andreote et al., 2018; Li et al., 2014). Membros dessa família além da capacidade de oxidar e reduzir compostos de As, possuem o potencial de afetar a ciclagem do As indiretamente, alterando o estados redox e a solubilidade dos compostos que, por sua vez, afetam a liberação ou adsorção de As (Chakraborty et al., 2020).

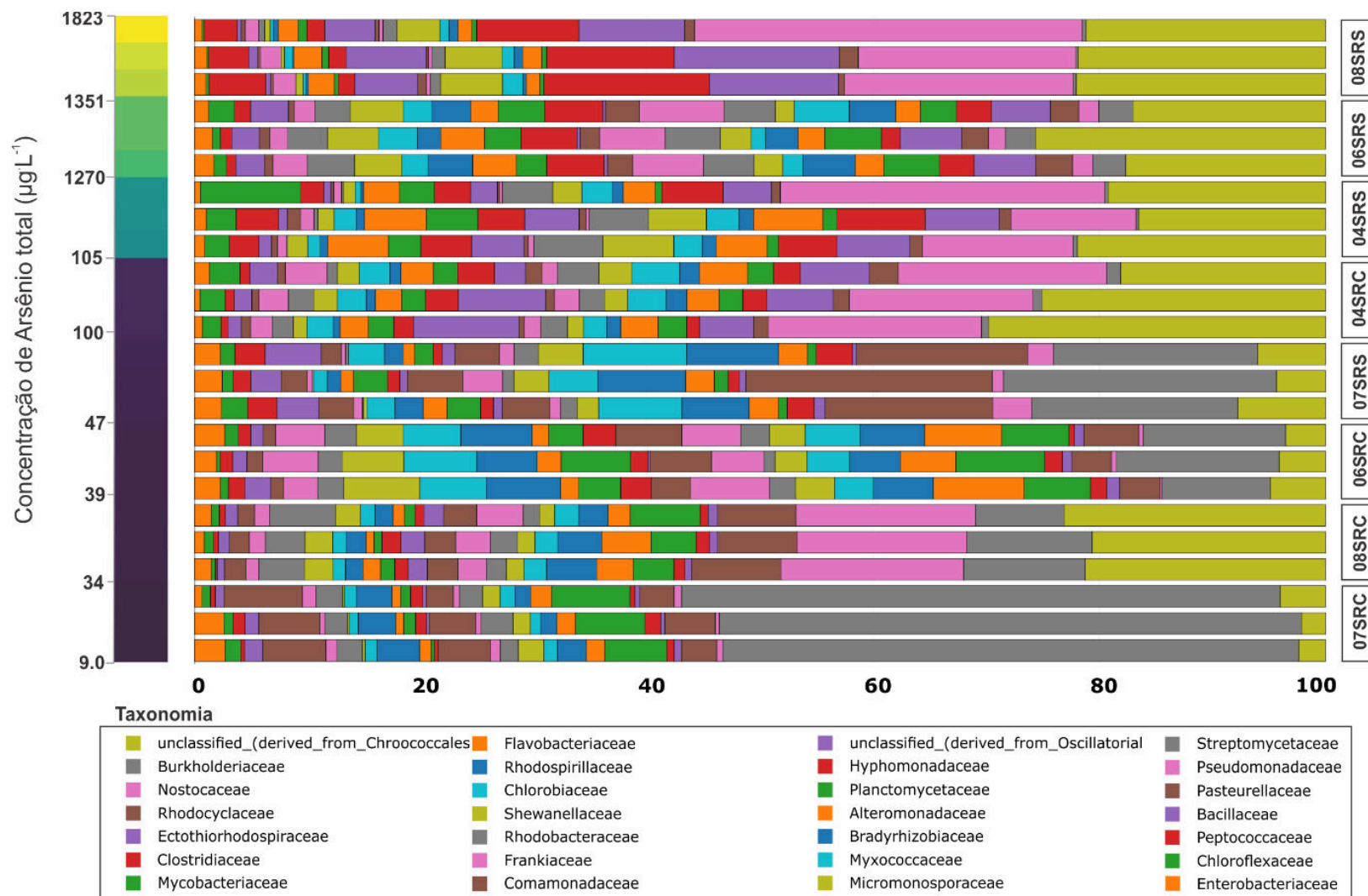


Figura 10. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados em uma escala de concentração de arsênio e no perfil funcional *Arsenic resistance* inferidos a partir de reconstrução dos metagenomas no MG-RAST. Somente os táxons com frequência acima de 1% são apresentados.

5.3.5 Mapeamento dos genes microbianos envolvidos na ciclagem do arsênio

As sequências anotadas pela plataforma MG-RAST, permitiu prever a diversidade funcional de genes bacterianos associados à ciclagem do arsênio. Porém não foi possível identificar os principais grupos relacionados a cada um dos processos. Desse modo, foi realizado um mapeamento dos principais genes envolvidos na ciclagem deste metalóide, que permitiu inferir com maior robustez sobre as comunidades microbianas associadas com o metabolismo do arsênio nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal, nos períodos de seca e cheia.

Como o As(V) é a espécie que predomina nas lagoas do Pantanal, primeiramente foram avaliados os genes *arsC*, *arsB* e *acr3* relacionados à detoxificação do As. O gene *arsC* codifica a enzima arsenato redutase, responsável pela biotransformação do As (V) para As (III). Buscando identificar os grupos microbianos potencialmente responsáveis por esse processo, avaliou-se a distribuição taxonômica do gene nas lagoas salino-alcálicas. Na figura 11, estão demonstradas as lagoas em triplicatas referentes aos dois períodos amostrados, com uma classificação taxonômica em nível de família dentro do domínio *Bacteria* dos táxons mais abundantes. Foram encontradas sequências associadas ao gene *arsC* nas lagoas que apresentaram florações de cianobactérias (04SR e 08SR) e na lagoa preta (06SR).

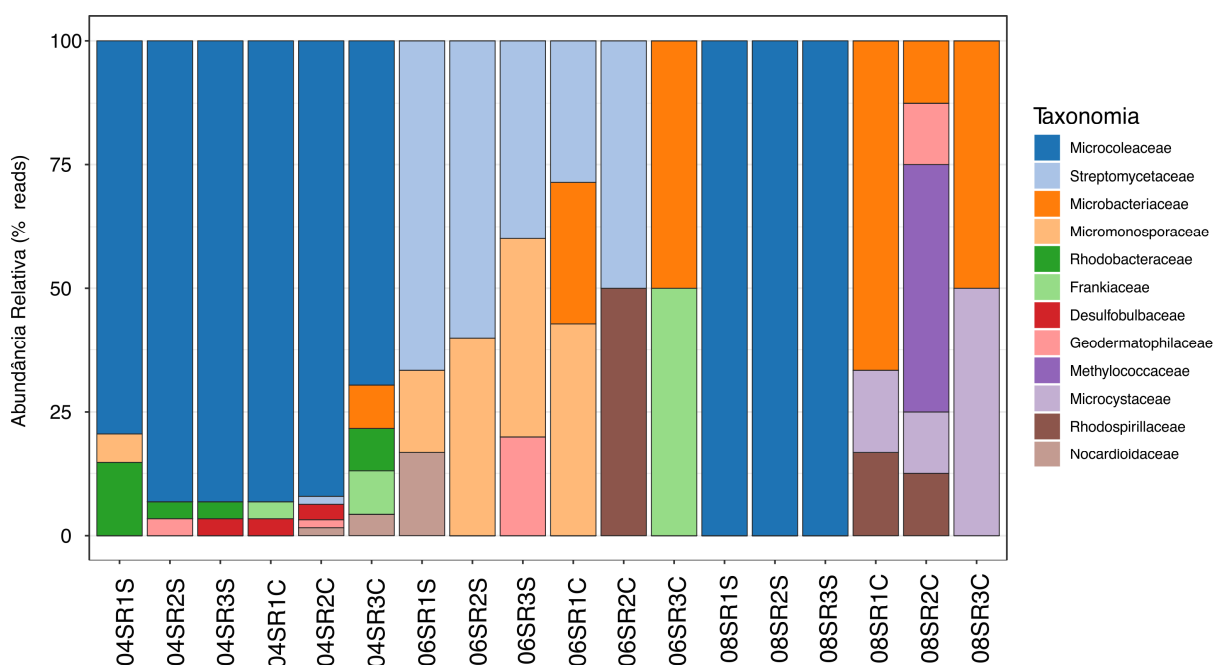


Figura 11. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArsC (*Arsenate reductase*) a partir de metagenoma.

A lagoa 04SR apresentou mais sequências afiliadas à família Microcoleaceae (69,23-94,74%) em ambos os períodos. Por outro lado, na lagoa 08SR notou-se uma alteração evidente nos táxons dominantes do período de seca para cheia. No período de seca, as sequências se afiliaram à família Microcoleaceae (94,74-100%), enquanto na cheia vê-se Microbacteriaceae (12,5-53,85%) e Microcystaceae (12,5-33,33%) como principais dominantes.

A composição das comunidades bacterianas na lagoa 06SR foi a mais distinta das lagoas, com predomínio das famílias Streptomyetaceae (33,33-66,67%) e Micromonosporaceae (16,67-44,44%) na seca.

Nas lagoas que apresentaram florações de cianobactérias (04SR e 08SR) a riqueza de famílias relacionadas ao gene *arsC* variaram de 1 a 9. Enquanto nas lagoas preta (06SR) esses valores variaram de 4 a 9. Os valores de Chao1 não apresentaram diferenças significativas entre as lagoas (Tabela 6).

Tabela 6. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *arsC* nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>arsC</i> | Chao1 | Shannon |
|------------------|-------|----------------|
| 04SRS | 4±1a | 0,458±0,280 bc |
| 04SRC | 6±2a | 0,619±0,420abc |
| 06SRS | 4±1a | 1,047± 0,173ab |
| 06SRC | 9±5a | 1,347± 0,255a |
| 08SRS | 1±1a | 0,069± 0,173 c |
| 08SRC | 9±5a | 1,357±0,255a |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

O índice de Shannon da comunidade bacteriana associada ao gene *arsC* na lagoa 06SR foi significativamente maior do que nas lagoas 04SR e 08SR. De modo geral, o índice de diversidade de Shannon aumentou significativamente do período de seca (maiores concentrações de As) para cheia (menores concentrações de As) em todas as lagoas. A menor diversidade de bactérias no período de seca não foi inesperada, pois altos níveis de poluentes metálicos provavelmente exercem uma forte pressão seletiva, e assim, reduzem a diversidade microbiana geral (Achour et al., 2007)

Essa mudança sazonal das comunidades microbianas relacionadas com a biotransformação do arsenato em arsenito representa uma alteração na diversidade beta (β) das lagoas salino-alcálicas. A análise estatística aplicada nos dados confirmou que as comunidades bacterianas diferiram significativamente (valor de $p=0,054$) entre as lagoas quando comparados grupos com alto e baixo nível de arsênio. Corroborando com a informação sobre a mudança da diversidade beta em relação ao nível de As, a análise de similaridade (ANOSIM) demonstrou

um valor estatístico de R igual a 0,6231 com significância de $p=0,0001$. Isso significa que existe dissimilaridade entre a estrutura das comunidades microbianas que habitam essas lagoas de acordo com os níveis de arsênio. Na figura 12, uma análise de coordenadas principais (PCoA) permite observar essa dissimilaridade entre as amostras. No período de seca observou-se uma proximidade das amostras das lagoas 04SR e 08SR, e essas mais distantes das amostras da lagoa 06SR. Enquanto as amostras no período de cheia apresentaram-se bem distantes uma das outras, evidenciando a heterogeneidade da comunidade bacteriana nessas lagoas. As coordenadas principais PC1 e PC2 representam 72,4% da variabilidade dos dados, sugerindo que os níveis de arsênio e a sazonalidade contribuem para a estruturação dessas comunidades.

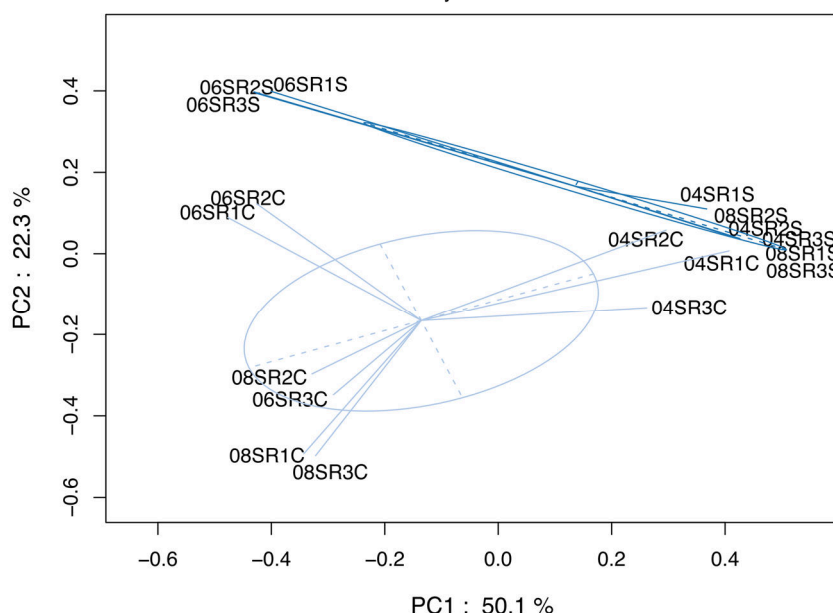


Figura 12. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsC* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

Dentro da célula, após a enzima arsenato redutase reduzir o As(V) a As(III), esse pode ser expelido da célula pela bomba de efluxo, codificada pelo gene *arsB*. Deste modo avaliou-se nas lagoas a presença e a distribuição taxonômica desse gene.

Ao analisar o mapeamento do gene *arsB*, verificou-se a presença somente nas lagoas que apresentaram florações de cianobactérias (Figura 13). Nas lagoas 06SR e 07SR, o gene *arsB* afiliou-se taxonomicamente a quatro sequências, desse modo, o mapeamento não foi considerado representativo para se avaliar a diversidade presente nessas lagoas.

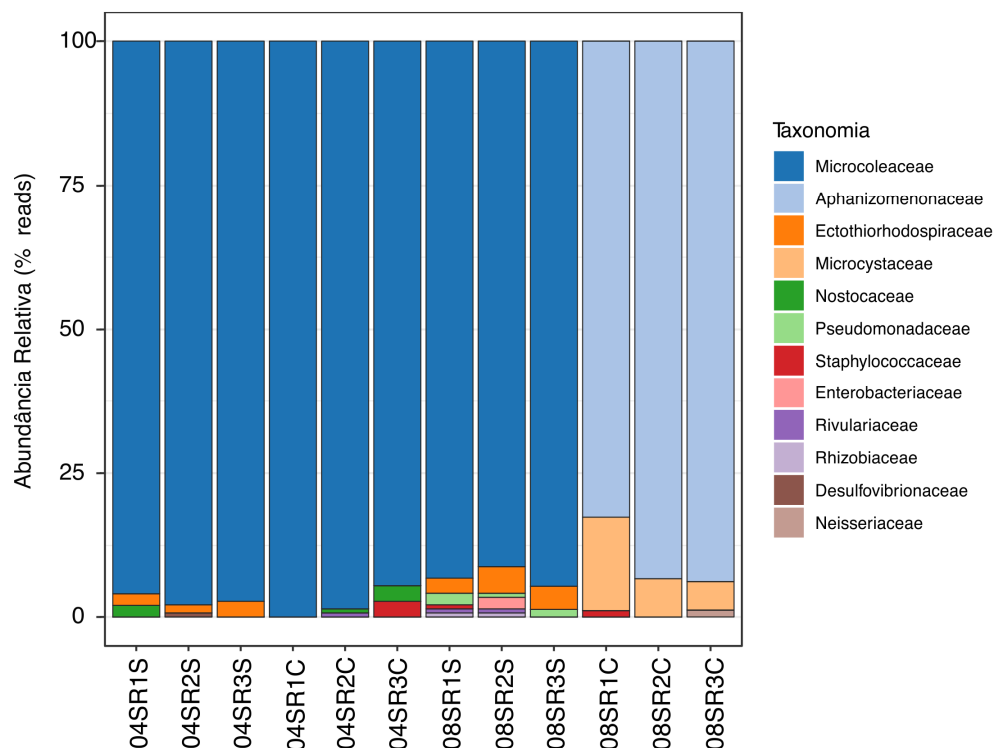


Figura 13. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArsB (*Arsenic efflux pump protein*) a partir de metagenoma.

Na classificação taxonômica das sequências afiliadas ao gene *arsB*, observou-se uma predominância de organismos da família Microcoleaceae (95,23-99,73%) nas lagoas 04SR (seca e cheia) e 08SR (91,39-94,65%) no período de seca. Enquanto no período de cheia, na lagoa 08SR observou-se uma mudança na composição bacteriana com predomínio da família Aphanizomenonaceae (83,17-93,58%).

Os índices de riqueza e diversidade do gene *arsB* não apresentaram diferenças significativas nas lagoas estudadas (Tabela 7). A riqueza de famílias na lagoa 04SR foi a mesma independente do período, e a diversidade de Shannon variou pouco do período de seca para cheia. Na lagoa 08SR, o índice de riqueza de famílias que apresentaram o gene *arsB* variaram de 3 a 9. Enquanto para diversidade não houve variação, sendo essa de 0,336. Os valores encontrados para ambos os índices são considerados baixos indicando a predominância de poucas espécies.

Tabela 7. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *arsB* nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>arsB</i> | Chao1 | Shannon |
|-------------------------|--------------|----------------|
| 04SRS | 3±1a | 0,143±0,045a |
| 04SRC | 3±1a | 0,108±0,105a |
| 08SRS | 9±5a | 0,336± 0,089a |
| 08SRC | 3±1a | 0,336± 0,133a |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

A análise de PCoA mostrou que as estruturas das comunidades bacterianas com gene *arsB* nas lagoas com altas concentrações de arsênio são muito similares entre si, observando assim, uma alta sobreposição dos pontos no período de seca (Figura 14). Por outro lado, no período de cheia quando as concentrações de As estavam mais baixas, as amostras da lagoa 08SR se agruparam distantes da lagoa 04SR. A análise da diversidade beta confirmou que a estrutura das comunidades bacterianas diferiu significativamente (valor de $p=0,022$) entre as lagoas quando comparadas através da análise de variância PERMANOVA. De acordo com o valor estatístico de R igual a 1 com significância de $p=0,0059$, existe uma grande dissimilaridade na estrutura das comunidades microbianas dos grupos com alto e baixo nível de arsênio. Os eixos PC1 e PC2 foram responsáveis por 99,7% da variação dos dados, o que indica que os níveis de arsênio foram suficientes para explicar a estruturação dessas comunidades quando a análise é baseada no gene *arsB*.

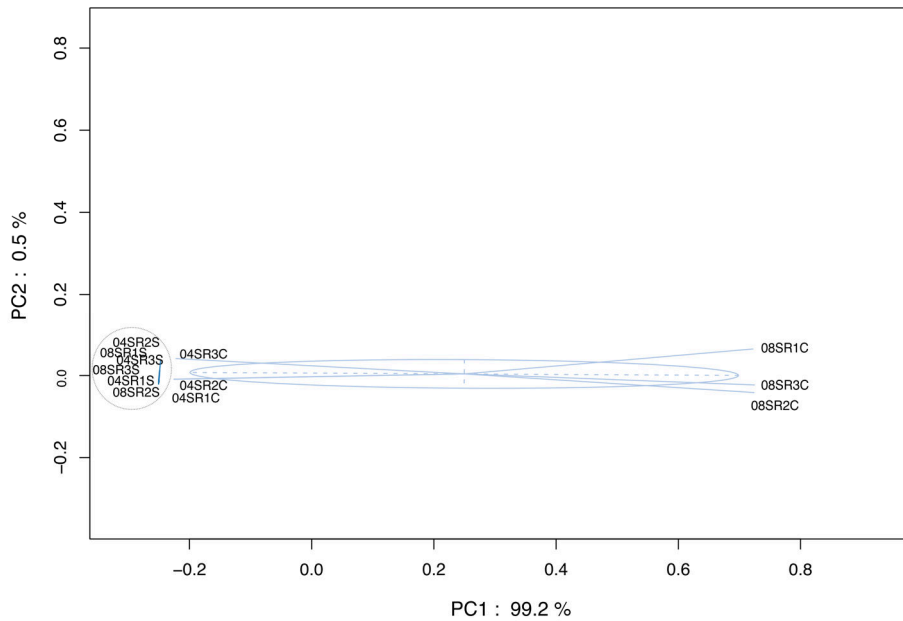


Figura 14. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsB* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

A proteína ArsA é uma ATPase que forma um complexo com a proteína transmembrana ArsB para expulsar o arsenito da célula de maneira mais eficaz. As sequências do gene *arsA* afiliaram-se principalmente com organismos das famílias Aphanizomenonaceae e Microcoleaceae, pertencentes ao Filo Cyanobacteria, nas lagoas 04SR e 08SR (Figura 15).

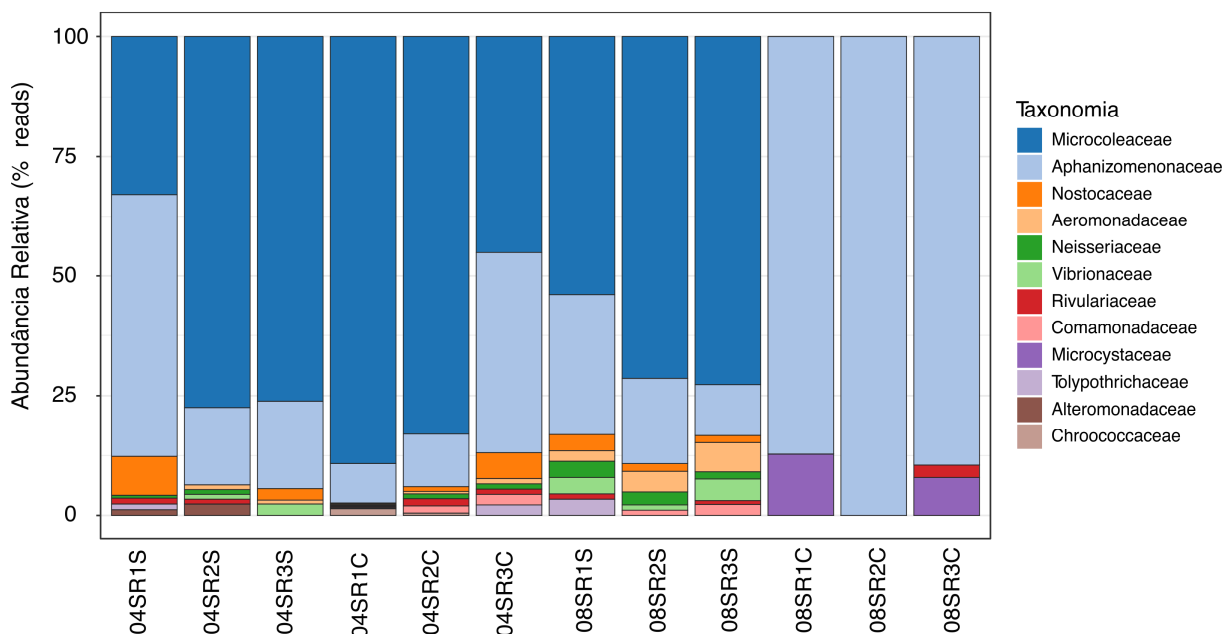


Figura 15. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína *ArsA* (Arsenical pump-driving ATPase) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados.

Em ambos os períodos, na lagoa 04SR observou-se um predomínio das famílias Aphanizomenonaceae (8,16-53,55%) e Microcoleaceae (32,22-87,90%). Enquanto na lagoa 08SR, as famílias Aphanizomenonaceae (10,37-29,58%) e Microcoleaceae (53,84-71,18%) predominaram no período de seca. Por outro lado, no período de cheia houve alteração dos táxons dominantes com as famílias Aphanizomenonaceae (82,81-100%) e Microcystaceae (8,62-12,5%) sendo as mais abundantes.

Nas lagoas 06SR e 07SR, não foram encontradas sequências associadas com o gene *arsA* no mapeamento.

A lagoa 04SR apresentou diversidade de micro-organismos equivalentes independente da época e o índice de riqueza de famílias que apresentaram o gene *arsA* variaram de 12 a 23 (Tabela 8). Por outro lado, a lagoa 08SR apresentou baixa riqueza de famílias variando de 3 a 11 quando comparada a lagoa 04SR, os baixos valores encontrados demonstram que poucas espécies predominam na comunidade.

Tabela 8. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *arsA* nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>arsA</i> | Chao1 | Shannon |
|------------------|--------|---------------|
| 04SRS | 12±6a | 0,924±0,238a |
| 04SRC | 23±14a | 0,902±0,437a |
| 08SRS | 11±3a | 1,147±0,167a |
| 08SRC | 3±2a | 0,351± 0,310a |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

A análise da diversidade beta corroborou com a informação de que as comunidades bacterianas não diferiram significativamente (valor de $p=0,065$) entre as lagoas quando comparadas. As lagoas 04SR e 08SR, no período de seca, agruparam-se mais próximas do que no período de cheia (Figura 16). Adicionalmente, os dois eixos da PCoA explicaram 86,3% da variabilidade dos dados, com os eixos 1 e 2 da PCoA representando 66,3% e 20% da variação, respectivamente, significando um bom ajuste das comunidades microbianas.

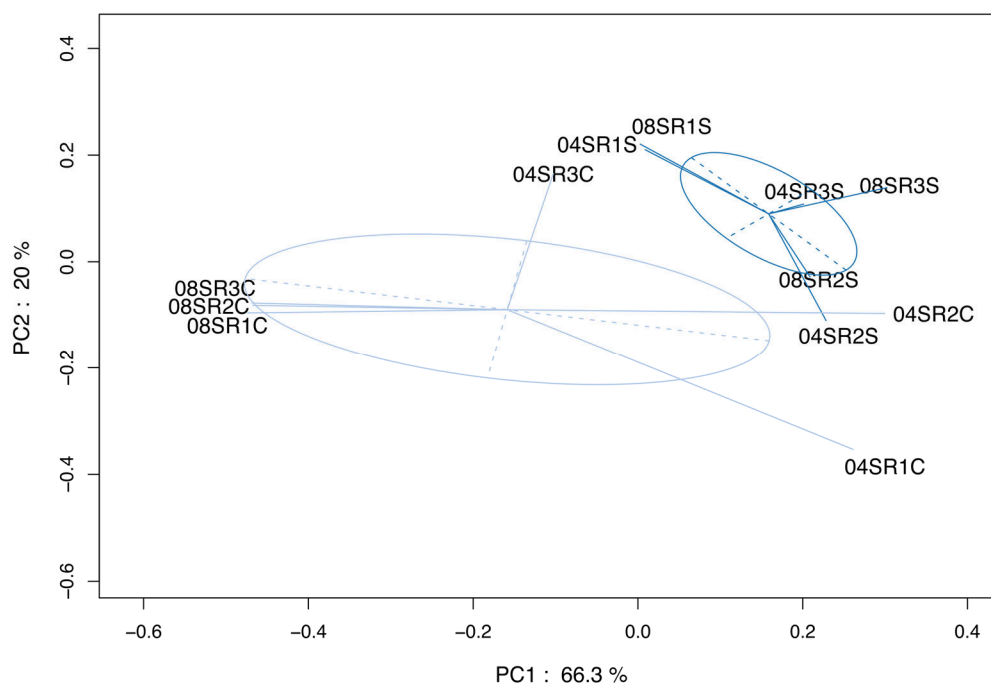


Figura 16. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arsA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

Além da bomba *ArsB* citada anteriormente, o efluxo de arsenito também pode ocorrer pela bomba *Acr3*. Baseando-se no gene *acr3*, observou-se que as lagoas com florações de

cianobactérias, 04SR (período de seca e cheia) e 08SR (seca) apresentaram mais seqüências associados com membros pertencentes ao Filo Cyanobacteria (Figura 17).

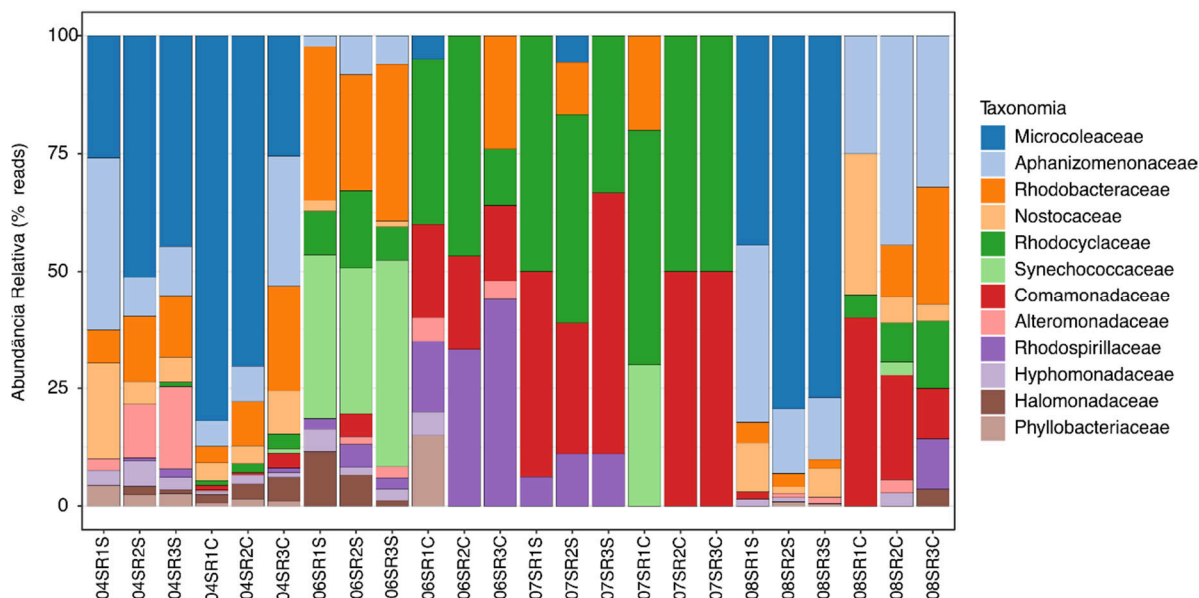


Figura 17. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína *Acr3* (*Arsenical resistance protein*) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados.

Na lagoa 04SR observou-se em ambos os períodos, o predomínio das famílias Aphanizomenonaceae (5,27-30,78%) e Microcoleaceae (20,55-77,63%). Por outro lado, observou-se um domínio da família Microcoleaceae (40,21-68,09%) na lagoa 08SR somente no período de seca.

Na lagoa 06SR, foi possível observar uma distinção das comunidades microbianas do período de seca daquelas existentes nas lagoas no período de cheia, com uma alteração evidente nos táxons dominantes de um período para o outro de acordo com a abundância relativa de seqüências encontrados. No período de seca encontram-se as Famílias Synechococcaceae (18,62-32,32%) e Rhodobacteraceae (14,70-24,24%) como principais dominantes, enquanto que na cheia vê-se Rhodocyclaceae (3,84-16,39%) e Rhodospirillaceae (4,44-15,38%). As famílias dominantes em ambos os períodos na lagoa 07SR foram Rhodocyclaceae (4,76-21,62%) e Comamonadaceae (4,76-18,91%).

Nas lagoas salino-alcálicas que houve presença de florações de cianobactérias (04SR e 08SR) a riqueza de famílias relacionadas ao gene *acr3* variou de 17 a 39, enquanto nas lagoas

preta (06SR) e cristalina (07SR) esses valores foram de 23 a 72. Apesar dessa diferença da riqueza de famílias nas lagoas, não houve diferença significativa entre eles (Tabela 9).

De modo geral, o índice de diversidade de Shannon nas lagoas 04SR e 08SR cujas médias variaram entre 1,46 a 2,64 foram menores em relação as lagoas sem florações de cianobactérias 06SR e 07SR, nas quais os índices variaram de 2,22 a 3,04. De acordo com os resultados obtidos, a sazonalidade entre o período de seca (maiores concentrações de As) e cheia (menores concentrações de As) teve efeito sobre a diversidade de famílias que possuem o gene *acr3*, apresentando assim diferenças significativas entre os períodos amostrados, exceto para lagoa preta 06SR.

Tabela 9. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *acr3* nas lagoas salino-alcalinas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>acr3</i> | Chao1 | Shannon |
|-------------------------|--------------|-----------------|
| 04SRS | 17 ± 12a | 2,19 ± 0,039abc |
| 04SRC | 39 ± 7a | 1,69 ± 0,670 bc |
| 06SRS | 41 ± 14a | 2,70 ± 0,346a |
| 06SRC | 42 ± 10a | 3,04 ± 0,099a |
| 07SRS | 72± 59a | 2,60 ± 0,032ab |
| 07SRC | 23± 10a | 2,22 ± 0,409abc |
| 08SRS | 21± 8 a | 1,46 ± 0,129 c |
| 08SRC | 31± 9 a | 2,64 ± 0,322a |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

Na figura 18, uma análise de coordenadas principais (PCoA) permitiu observar que a dissimilaridade entre as amostras com diferentes níveis de arsênio e de acordo com a sazonalidade apresentou uma variabilidade de 50,1%. O teste de variância (PERMANOVA) aplicado nos dados mostrou diferença significativa (valor de $p=0,001$) entre as lagoas com alto e baixo nível de arsênio. Observou-se na PCoA a formação clara de grupos distintos das amostras de acordo com os níveis de arsênio, e ainda, a análise de similaridade (ANOSIM) demonstrou um valor estatístico de R igual a 0,7867 com significância de $p=0,0001$. As lagoas 04SR (seca e cheia) e 08SR (seca) agruparam-se devido suas altas concentrações de arsênio e ficaram distantes da lagoa 08SR (cheia), a qual apresentou baixas concentrações de arsênio. De acordo com o R^2 e p -valor foi possível identificar que existe dissimilaridade entre a estrutura das comunidades microbianas com gene *acr3* que habitam as diferentes lagoas em relação aos níveis de arsênio alto e baixo.

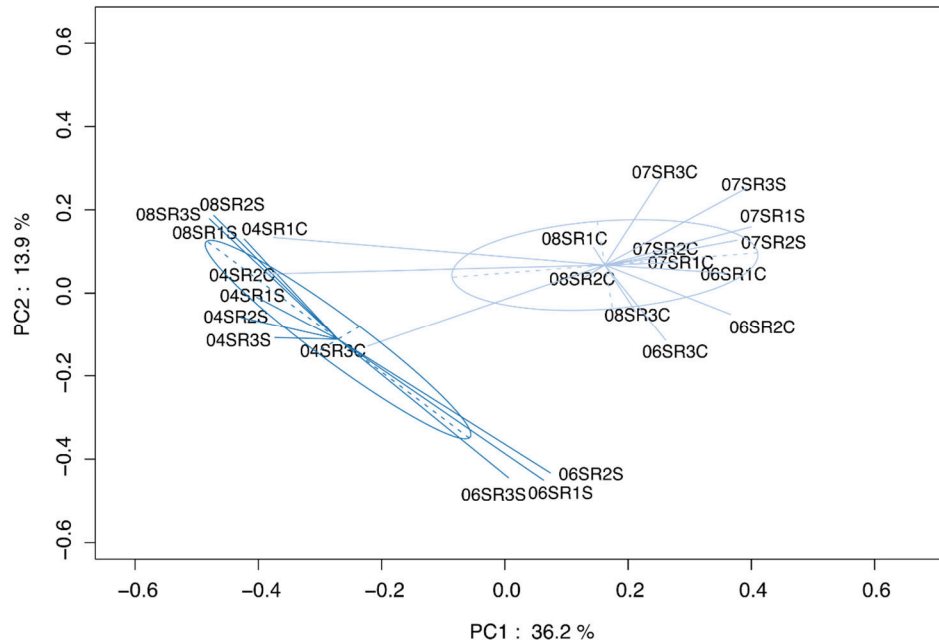


Figura 18. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *acr3* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

Após as bombas ArsB ou Acr3 transportarem o As (III) para fora do citoplasma, esse pode ser oxidado por alguns micro-organismos. O processo de oxidação aeróbica do As (III) é mediado pela enzima *arsenite oxidase* que transforma o As (III) em As (V), considerado menos tóxico.

A figura 19 mostra os micro-organismos potencialmente responsáveis pelo processo de oxidação do As (III) nas lagoas salino-alcálinas. Na lagoa 04SR observou-se em ambos os períodos, o predomínio da família Rhodobacteraceae (42,67-51,21%). Podemos observar de maneira geral que os organismos da família Vibrionaceae apresentaram mais sequências associadas às lagoas com florações de cianobactérias (04SR e 08SR) no período de seca, enquanto no período de cheia observou-se uma redução desse grupo.

Na lagoa preta (06SR) não houve discriminação nas comunidades microbianas da época de seca daquelas existentes nas lagoas na época de cheia, de forma que, as famílias com mais sequências afiliados ao gene *aioA* foram Rhodocyclaceae (22,88-36,93%), Rhodobacteraceae (6,78-18,33%) e Comamonadaceae (3,33-24%). Por outro lado, a lagoa cristalina (07SR) apresentou uma redução aparentemente significativa entre o período de seca e cheia de organismos das famílias Comamonadaceae (seca: 32,55-52,63%; cheia: 11,68-20,27%) e Alcaligenaceae (seca: 16,27-27,78%; cheia: 4,34-9,09%).

Na lagoa 08SR, observou-se uma notória alteração nos táxons dominantes das épocas de seca para cheia. No período de seca encontram-se as famílias Vibrionaceae (18,18-25%) e Oceanospirillaceae (18,42-37,31%) como principais dominantes, enquanto no período de cheia verificam-se organismos da família Comamonadaceae (22-38,98%).

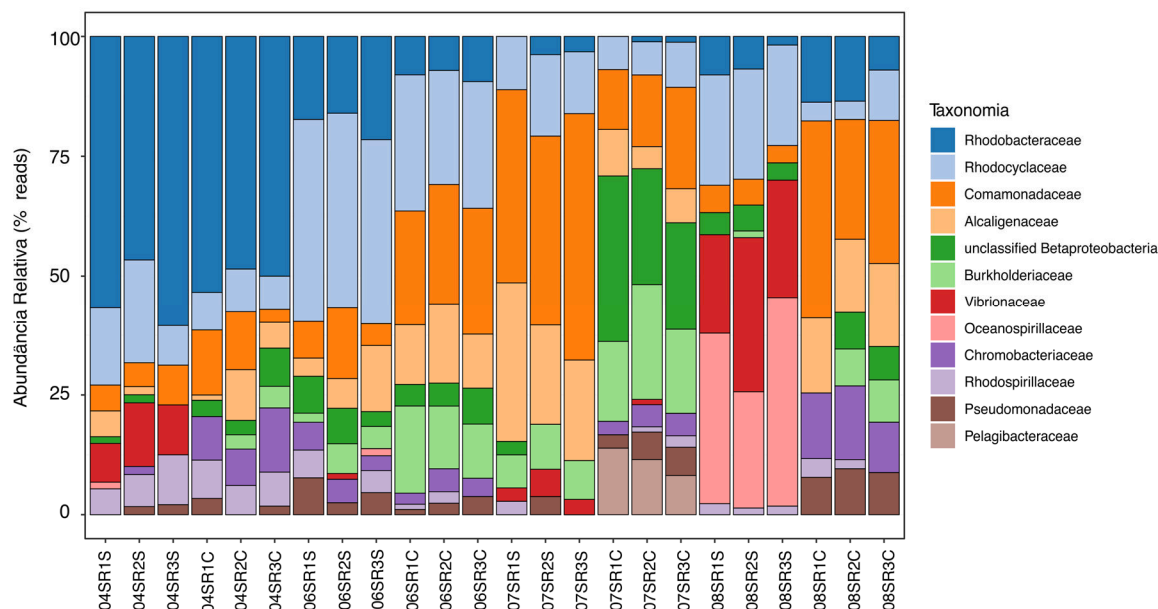


Figura 19. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína AioA (*Arsenite oxidase*) a partir de metagenoma. Somente os táxons mais abundantes foram apresentados.

As lagoas 04SR e 06SR apresentaram as maiores amplitudes de riqueza do gene *aioA* (Tabela 10). Nas lagoas salino-alcálinas 04SR e 06SR os valores de Chao1 variaram de 16 a 27, enquanto que nas lagoas 07SR e 08SR foram de 12 a 15. Os valores de Chao1 não apresentaram diferenças significativas entre as lagoas e nem em relação a sazonalidade.

A diversidade dos organismos que desempenham a função de oxidar o arsenito também foi semelhante nas lagoas, sendo que essa variou de 1,77 a 2,26. Esses valores corroboram com os encontrados por Jiang et al. (2014) ao analisar a diversidade de bactérias oxidantes de As (III), cujos índices de Shannon variaram entre 0 a 2,03 em áreas geotérmicas com diferentes concentrações de As (17,6 a 465,41 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 10. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *aioA* nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>aioA</i> | Chao1 | Shannon |
|-------------------------|--------------|----------------|
| 04SRS | 27±20a | 1,81± 0,042a |
| 04SRC | 22±5 a | 1,93± 0,075a |
| 06SRS | 22 ±5 a | 2,26± 0,135a |
| 06SRC | 16 ±5 a | 2,07± 0,038a |
| 07SRS | 13 ±5 a | 1,77± 0,404a |
| 07SRC | 15±4 a | 2,05± 0,103a |
| 08SRS | 12 ±4 a | 1,96± 0,247a |
| 08SRC | 12 ±3 a | 2,08± 0,253a |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

Para acessar a diversidade beta (β) das lagoas salino-alcálicas e ver a heterogeneidade da estrutura das comunidades microbianas de acordo com níveis de As utilizou-se a análise de PCoA (Figura 20). Com a análise observou-se que as lagoas 06SR, 07SR e 08SR agruparam-se próximas no período de cheia, o que mostrou que a estrutura das comunidades bacterianas são similares entre si. Por outro lado, quando as concentrações de arsênio estavam mais elevadas no período de seca, as lagoas 04SR, 06SR e 08SR formaram um outro grupo, porém essas ficaram mais distantes. De acordo com o *p*-valor (0,001) e o valor estatístico de R igual a 0,6514 com significância de $p=0,0001$, existe dissimilaridade na estrutura das comunidades microbianas com gene *aioA* que habitam as lagoas. Adicionalmente, as coordenadas principais PCo1 e PCo2 explicam 59,5% da variabilidade dos dados, sugerindo que outros fatores também podem estar influenciando a estruturação dessas comunidades.

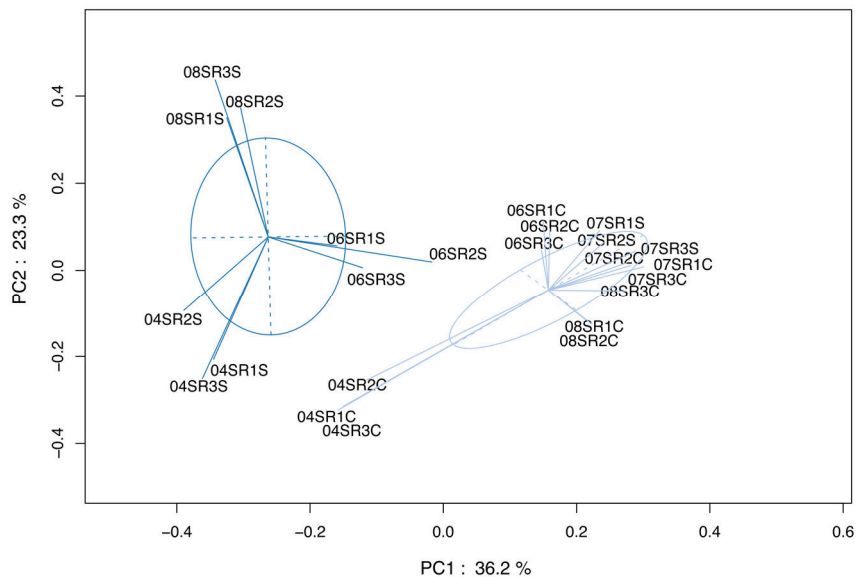


Figura 20. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *aioA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

Estudos realizados com bactérias anaeróbicas revelaram outro conjunto especializado de arsenito oxidase nomeada ArxA. Essas bactérias são capazes de usar o arsenito como fornecedor de energia durante o crescimento autotrófico, acoplando a oxidação anaeróbica do arsenito através dos produtos do gene *arxA* à redução de nitrato ou com fixação de CO₂ (Kumari; Jagadevan, 2016).

A figura 21 mostra as famílias de bactérias arsenotróficas potencialmente responsáveis pelo processo de oxidação anaeróbica do As (III) nas lagoas salino-alcálicas.

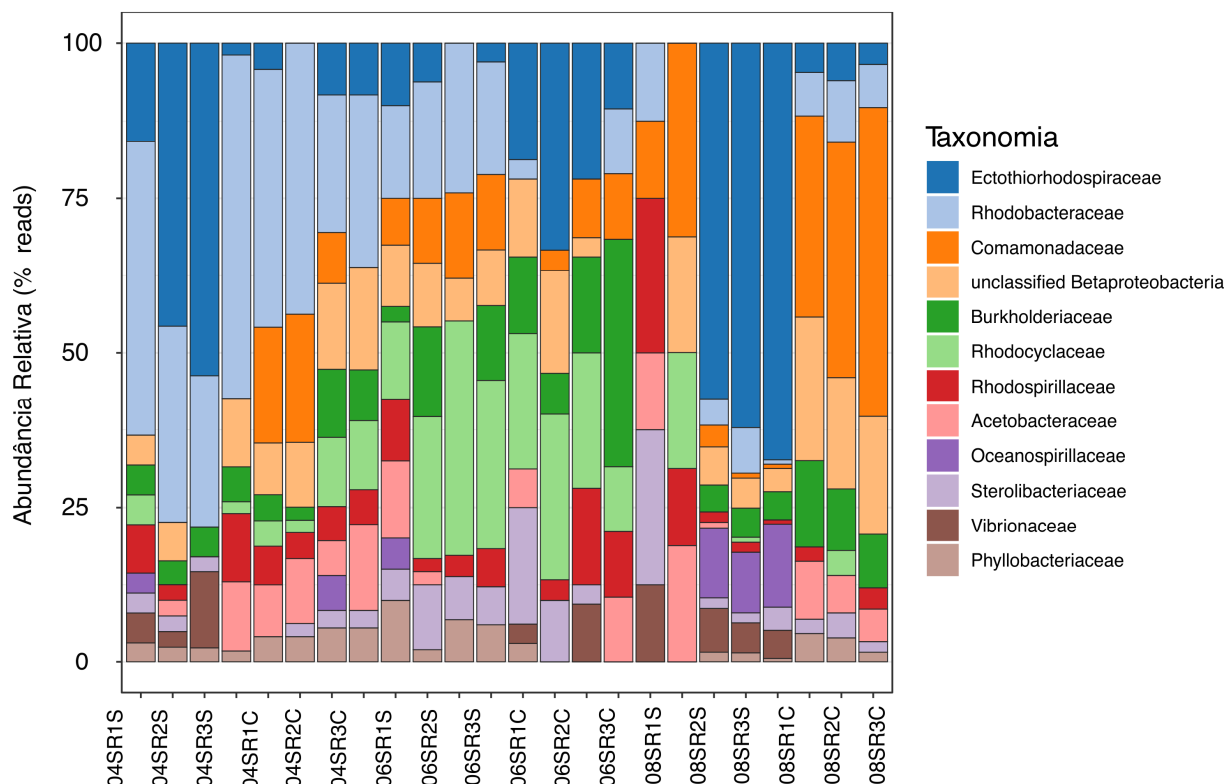


Figura 21. Abundância relativa bacteriana em nível de família nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, durante os períodos de seca (S) e cheia (C). Resultados baseados na proteína ArxA (*Anaerobic arsenite oxidase*) a partir de metagenoma.

Na lagoa 04SR, as famílias Ectothiorhodospiraceae (10,34-43,75%) e Rhodobacteraceae (20,31-31,03%) foram as dominantes no período de seca. Por outro lado, no período de cheia observou-se uma redução de sequências associadas à família Ectothiorhodospiraceae (0-2,08%) e um aumento das sequências afiliadas à família Rhodobacteraceae (32,72-45,83%).

Na lagoa 08SR, do período de seca para cheia, observou-se uma alteração dos táxons dominantes. Sendo que, na seca houve predomínio da família Ectothiorhodospiraceae (49,18-53,50%), enquanto na cheia da família Comamonadaceae (31,91-41,42%).

As lagoas 06SR e 07SR apresentaram-se mais diversas do que as lagoas com florações de cianobactérias, sendo possível observar um padrão de distribuição do gene entre as famílias, sem a predominância de uma delas especificamente.

O índice de riqueza de famílias com o gene *arxA* nas lagoas salino-alcálicas variou de 20 a 33 (Tabela 11). Dentre as lagoas, do período de seca para cheia, houve uma pequena redução nos índices de riqueza e esses não apresentaram diferença significativa.

Tabela 11. Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) do gene *arxA* nas lagoas salino-alcálicas Pantanal brasileiro.

| Gene <i>arxA</i> | Chao1 | Shannon |
|-------------------------|--------------|----------------|
| 04SRS | 27±15a | 2,083±0,387 bc |
| 04SRC | 26±6a | 2,150±0,129abc |
| 06SRS | 30±10a | 2,775±0,137a |
| 06SRC | 28±16a | 2,453±0,178abc |
| 07SRS | 33±24a | 2,606±0,314ab |
| 07SRC | 20±15a | 2,075±0,200bc |
| 08SRS | 24±3a | 1,950±0,139 c |
| 08SRC | 20±11a | 2,103±0,148bc |

Letras minúsculas: comparação entre as lagoas

Em relação ao índice de Shannon, as lagoas que apresentaram as maiores diversidades associadas ao gene *arxA* foram a 06SR (2,775±0,137) e 07SR (2,606±0,314) no período de seca. A diversidade da comunidade bacteriana dessas lagoas foi significativamente maior do que nas lagoas 04SR (2,083±0,387) e 08SR (1,950±0,139) no mesmo período. Observa-se uma possível redução no índice de diversidade do período de seca para cheia nas lagoas 06SR e 07SR, enquanto nas lagoas 04SR e 08SR ocorre um aumento da diversidade de Shannon.

As estruturas das comunidades bacterianas dos períodos de seca (alto nível de As) e cheia (baixo nível de As), avaliadas através do PCoA, diferiram significativamente (valor de $p=0,001$) entre as lagoas (Figura 22). Apesar da diferença significativa, observou-se uma proximidade no agrupamento da lagoa 06SR (seca) com as lagoas 04SR e 08SR no período de cheia. De acordo com o valor estatístico de R igual a 0,3406 com significância de $p=0,0001$, os níveis de arsênio alto e baixo não foram suficientes para explicar a mudança na estrutura da comunidade. Adicionalmente, as coordenadas principais PC1 e PC2 explicaram 43,9% da variabilidade dos dados, sugerindo que outros fatores podem estar influenciando a estruturação das comunidades que possuem o gene *arxA*.

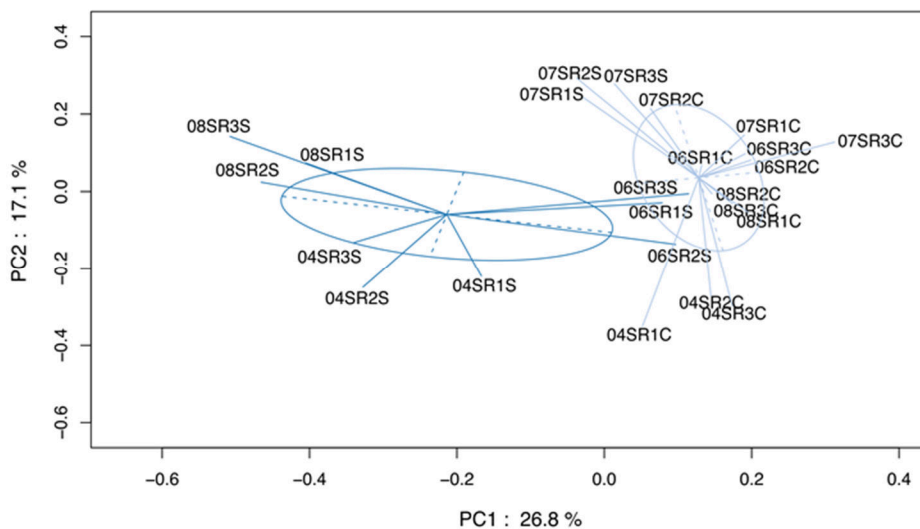


Figura 22. Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades microbianas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro, de acordo com sazonalidade (períodos de seca (S) e cheia (C)) e concentrações qualitativas de arsênio (altas concentrações: círculo azul escuro) e (baixas concentrações: círculo azul claro). Resultados baseados no gene *arxA* a partir do metagenoma. Índice de diversidade: Bray-Curtis.

A estrutura da comunidade bacteriana baseada nos genes metabolizadores de arsênio foi estudada principalmente em águas subterrâneas, sedimentos, fontes hidrotermais e em lagoas salino-alcálicas (Cai et al., 2009; Duquesne et al., 2008; Gihring; Banfield, 2001; Handley et al., 2009; Kumari; Jagadevan, 2016; Oremland; Stolz, 2005). A literatura é pouca informativa sobre a funcionalidade de genes associados com metabolismo do arsênio em águas de lagoas salino-alcálicas. Dos 11 genes selecionados por estarem envolvidos com a ciclagem de arsênio, não foram encontradas sequências associadas a cinco genes (*arrA*, *arrB*, *arsM*, *arsI* e *arsD*) no mapeamento. Os seis genes mapeados foram relacionados com redução do arsenato (*arsC*), transporte de arsenito (*arsA*, *arsB* e *acr3*) e oxidação do arsenito (*aiOA* e *arxA*).

A entrada do As (V) nas células microbianas, forma predominante nas lagoas, ocorre por transportadores de fosfato, como Pst (transporte específico de fosfato) e Pit (transporte inorgânico de fosfato), sendo o último a via primária de entrada (Slyemi; Bonnefoy, 2012). Uma vez dentro das células, As (V) é reduzido para As (III) pela enzima arsenato redutase citoplasmática, codificada pelo gene *arsC*, presente em micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos (Lièvremonet et al., 2009). A presença deste gene foi observada nas lagoas 04SR, 06SR e 08SR (Figura 11), as mesmas que apresentaram as maiores concentrações de As (V).

Os filos bacterianos mais abundantes relacionados ao gene *arsC* encontrados nas lagoas foram Cyanobacteria (04SR e 08SR) e Actinobacteria (06SR), sendo o último comumente encontrado afiliado ao gene *arsC* e em ambientes altamente contaminados com As (Retamal-Morales et al., 2017; Tanmoy et al., 2018). Firrincieli et al. (2019) demonstraram que isolados

do filo Actinobacteria possuem capacidade de crescer em altas concentrações de As (V) e geralmente representantes deste filo possuem o sistema genético de resistência básica de As (V) composto por *arsR*, *acr3* e *arsC*, indicando que esses micro-organismos, além da capacidade de tolerar altas concentrações de As, podem biotransformá-lo.

Com relação ao filo Cyanobacteria, representantes estão distribuídos mesmo em locais altamente contaminados com arsênio, tais como lagoas salino-alcálicas, minas ácidas, fontes termais (Bertin et al., 2011; Edwardson; Hollibaugh, 2017; Sangwan et al., 2015). A presença de genes de detoxificação do arsenato foi relatada em várias espécies de cianobactérias, incluindo o gênero *Limnospira* sp., pertencente a família Microcoleaceae (Guo et al., 2016; Huertas et al., 2014; Lefort et al., 2014), um dos principais responsáveis pelas florações nas lagoas do Pantanal (Andreote et al., 2018; Santos et al., 2018). Isto indica um possível potencial desta cianobactéria em reduzir o As (V) em As (III) nessas lagoas. Pode parecer contraintuitivo a conversão celular do estado de oxidação menos tóxico (As V) para o estado mais tóxico e solúvel (As III). Porém, análises moleculares indicaram que todas as vias de detoxificação do arsênio usavam arsênios trivalentes como substratos antes do grande evento de oxigenação (GOE) da Terra (Chen et al., 2020). Após o GOE, desencadeou uma oxidação em escala global de espécies reduzidas de arsênio e levou à biodisponibilidade generalizada do arsenato. Desse modo, o sistema antigo de eliminação de As(III) se expandiu para acomodar essas mudanças ambientais (Chen et al., 2020). Portanto, a solução mais simples é reduzir o As (V) a As (III) para o qual as células já possuem mecanismos de remoção citosólica.

Após a enzima arsenato redutase reduzir o As (V) a As (III), esse pode ser expelido da célula por bombas de membrana específicas. Nas lagoas 04SR e 08SR, observou a presença da proteína de membrana integral ArsB, que bombeia As (III) para fora da célula. Quando sozinha, a ArsB funciona quimiosmoticamente, explorando o potencial de membrana para impulsionar o efluxo do metalóide. Quando acoplada com ArsA, uma ATPase que converte o potencial de membrana em ATP, fornece energia da hidrólise do ATP para o ArsB, fazendo o efluxo de arsenito de forma mais eficiente (Yang et al., 2012). Além da bomba citada anteriormente, o efluxo de arsenito pode ocorrer pela bomba Acr3, que também pode acoplar-se à ArsA ATPase (Castillo; Saier, 2010).

O transporte de arsenito pela bomba ArsB(A) codificada pelos genes *arsB* e *arsA* foi observado nas lagoas que apresentaram florações de cianobactérias (Figuras 13 e 15), sendo esse processo atribuído principalmente ao Filo Cyanobacteria. O mecanismo de detoxificação do arsênio nas células cianobacterianas inclui o efluxo de compostos de arsênio inorgânico intracelular. O operon *ars*, contendo os genes *arsB* e *arsC* é amplamente distribuído na maioria

das cianobactérias sequenciadas, sugerindo que esses genes são cruciais para resistência ao arsênio em cianobactérias (Miyashita et al., 2016).

Dentro do filo Cyanobacteria, as famílias Aphanizomenonaceae e Microcoleaceae afiliaram-se aos genes *arsB* e *arsA*. Estas famílias apresentarem-se relacionadas aos genes é de grande importância considerando-se que dentro dessas têm-se os gêneros *Anabaenopsis* sp. e *Limnospira* sp., respectivamente, ambas responsáveis pelas florações nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal (Costa et al., 2016; Santos et al., 2018), sugerindo a possível contribuição destas cianobactérias em expelir o As (III), diminuindo o acúmulo dessa forma mais tóxica.

Os baixos índices de diversidade associados com os genes *arsC*, *arsB* e *arsA* (Tabelas 6, 7 e 8) refletem a dominância de poucas espécies nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal com potencial para redução do arsenato e extrusão de arsenito. Embora as condições ambientais sejam diferentes, Sheik et al. (2012) relataram que o domínio de uma única espécie aumentou quanto menos diversificado eram os solos contaminados com diferentes concentrações de As.

Apesar da redundância funcional como bombas de efluxo de As (III), ArsB e Acr3 têm diferenças estruturais e uma diversidade muito distinta (Garbinski, et al., 2019). As proteínas ArsB estão presentes apenas em procariontes, enquanto as proteínas Acr3 são encontradas em bactérias, arqueias, fungos e algumas plantas (Castillo; Saier, 2010; Yang et al., 2015). Diferente do gene *arsB* que foi encontrado somente nas lagoas 04SR e 08SR, sequências afiliadas ao gene *acr3* foram encontradas em todas as lagoas (Figura 17).

Além das famílias Aphanizomenonaceae e Microcoleaceae já relatadas por estarem envolvidas no transporte de As (III) nas lagoas 04SR e 08SR, outros taxóons também compõem a estrutura das comunidades bacterianas nas diferentes lagoas. Nas lagoas 06SR (cheia) e 07SR ambos os períodos, encontrou-se a família Rhodocyclaceae afiliada ao gene *acr3*. Membros dessa família já foram relatados em diferentes ambientes contaminados com arsênio tais como, águas subterrâneas, sedimentos, solos (Hassan et al. 2016; Sonthiphand et al., 2019; Wang et al. 2014) e possuem capacidades metabólicas versáteis, incluindo a capacidade de crescer sob condições oligotróficas (Ivanova et al., 2013), estado que ambas lagoas encontravam-se durante os períodos que a família foi associada ao gene.

Chakraborty et al. (2020) detectaram quatro famílias principais: *Burkholderiaceae*, *Gallionellaceae*, *Rhodocyclaceae* e *Comamonadaceae* ao investigarem a águas subterrâneas contaminadas com As, sendo as duas últimas também observadas nas lagoas salino-alcálicas. Os mesmos autores sugerem que além da capacidade de oxidar e reduzir compostos arsênicos, os membros da classe *Betaproteobacteria* têm de alterar os estados redox e a solubilidade dos compostos que, por sua vez, afetam a liberação ou retenção de As.

Outras famílias como, Synechococcaceae e Rhodobacteraceae foram atribuídas ao gene *acr3* na lagoa 06SR (seca). A presença dessas famílias já foram relatadas em sedimentos (Franco et al., 2015) e águas subterrâneas (Paul et al., 2015) contaminadas com As. Saunders et al. (2016), ao analisarem o potencial genômico para efluxo de arsênio em organismos da família Synechococcaceae relataram que as mesmas possuem os genes *acr3*, *arsC* e *arsR* sendo suficientes para o transporte de arsenito.

Quase todas as espécies procarióticas possuem um gene *arsB* ou um *acr3* (Yang et al., 2012), em alguns casos ambos dentro de um único organismo, embora nenhum exemplo da coexistência dos dois transportadores codificados no mesmo operon tenha sido relatado (Yang et al., 2015).

Após o As (III) estar fora da célula, seja pela bomba *ArsB* ou *Acr3*, esse pode ser metilado ou oxidado (Slyemi; Bonnefoy 2012). A biometilação do arsenito é catalisada pela enzima S-adenosilmetionina metiltransferase (*ArsM*), formando os intermediários voláteis monometil arsenito (MMAs (III)), dimetil arsenito (DMAs (III)) e trimetil arsina (TMAs) (Huang et al., 2018; Slyemi; Bonnefoy 2012). Verificou-se nas lagoas o potencial genético de micro-organismos para metilação do As (III), porém não foram encontradas sequências associadas com o gene *arsM* no mapeamento. Por outro lado, em todas as lagoas foram mapeados gene (*aioA*), que codifica a enzima arsenito oxidase, relacionado à oxidação aeróbia do arsenito. Durante esse processo, o gene *aioA* codifica a proteína arsenito oxidase que usa As (III) como doador de elétrons, oxidando-o em As (V).

O processo de oxidação microbiana do arsenito foi descrito pela primeira vez em 1918 por Green (Santini et al., 2000). Desde as primeiras descobertas, mais de 40 estirpes de bactérias aeróbias oxidantes de As (III), pertencentes principalmente ao filo Proteobacteria, foram isoladas de diversos ambientes contaminados com As, como sedimentos, solos, rejeitos de minas, áreas hidrotérmicas e águas naturais (Cai et al., 2009; Duquesne et al., 2008; Gihring; Banfield, 2001; Handley et al., 2009; Kumari; Jagadevan, 2016).

Nas lagoas salino-alcálinas foram encontradas sequências do gene *aioA* afiliadas principalmente as famílias Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Rhodobacteraceae, Rhodocyclaceae, Oceanospirillaceae e Vibrionaceae (Figura 19). A presença da família Comamonadaceae, afiliada ao gene *aioA*, já foi relatada em lagoa salino-alcáalina (Silva, 2015), localizada na mesma região que as lagoas avaliadas neste estudo.

Membros da família Alcaligenaceae presente em todas as lagoas, apresentam-se como uma das bactérias oxidantes heterotróficas mais antigas e bem caracterizadas, uma vez que, a

enzima arsenita oxidase foi isolada pela primeira vez da bactéria *Alcaligenes faecalis* em 1992 (Anderson et al., 1992; Ellis et al., 2001).

Crognale et al. (2019) relataram a prevalência das famílias Comamonadaceae, Rhodobacteraceae, Burkholderiaceae e Xanthomonadaceae no processo de oxidação de As (III) ao caracterizarem a comunidade microbiana em águas subterrâneas contaminadas com As, sendo as duas primeiras famílias também encontradas afiliadas ao gene *aioA* nas lagoas do Pantanal.

As famílias Comamonadaceae e Rhodocyclaceae apresentaram-se como principais dominantes na lagoa 06SR. Membros destas famílias são frequentemente encontrados em ambientes contaminados por arsênio e apresentam capacidades fisiológicas e metabólicas interessantes, como a capacidade de oxidar As (III) (Cai et al., 2009; Ghosh et al., 2014) e também são conhecidos por oxidarem o Fe (II) (Weber et al., 2006), elemento encontrado em altas concentrações na lagoa 06SR.

Além da família Comamonadaceae, frequentemente associada à oxidação do arsenito, foram detectadas em áreas alagáveis, naturais e construídas, a presença do gene *aioA* em vários grupos de bactérias como, Aeromonadaceae, Bradyrhizobiaceae, Burkholderiales, Enterobacteriaceae, Methylobacteriaceae, Moraxellaceae, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae e Pseudomonadaceae (Chang et al., 2010; Jia et al., 2014; Macur et al., 2004; Zhang et al., 2015). A grande diversidade de bactérias que realizam o processo de oxidação aeróbia do arsenito sugere a importância deste mecanismo considerado um dos principais para detoxificação de As por oxidar As (III) a As (V) forma menos tóxica (Slyemi; Bonnefoy, 2012).

Outro sistema de oxidação envolvendo gene *arxA* foi identificado em bactérias anaeróbicas. Neste sistema a oxidação anaeróbica de As (III) é combinada com a redução de nitrato ou integrada à cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese anoxigênica (Kumari; Jagadevan, 2016).

Em todas as lagoas foram encontradas sequências do gene *arxA* afiliadas a família Ectothiorhodospiraceae (Figura 21). Vários táxons dessa família são conhecidos por serem oxidantes anaeróbicas de arsenito e encontrados em abundância em lagoas salino-alcálicas (Challacombe et al., 2013; Hamamura et al., 2014; Hoefl et al., 2017; Stamps et al., 2018). A oxidação anaeróbica do arsenito foi descrita pela primeira vez na bactéria quimioautotrófica *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1, pertencente a família Ectothiorhodospiraceae (Oremland et al., 2002; Hoefl et al., 2007), onde o gene *arxA* codificou uma nova enzima molibdopterina, essencial para oxidação de arsenito associada com a redução de nitrato (Zargar et al., 2010; 2012). Além das bactérias quimioautotróficas, esse mecanismo também têm sido observado em

bactérias fotossintéticas isoladas de ambientes salino-alcálinos, como *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1 e *Ectothiorhodospira* sp. BSL-9, ambas são capazes de oxidar o arsenito acoplado à fotossíntese anoxigênica, processo conhecido fotoarsenotrofia (Hernandez-Maldonado et al., 2017).

Edwardson et al. (2017) relataram que a ciclagem de arsênio em zonas microaerofílicas da coluna d'água no lago Mono, Califórnia foi dominada por membros oxidantes de arsenito das famílias Ectothiorhodospiraceae e Halomonadaceae transcrevendo o gene *arxA*. Assim, pode-se dizer que há uma prevalência de organismos pertencentes a essas famílias nas lagoas salino-alcálinas.

Ospino et al. (2019) observaram a presença do gene *arxA* nas famílias Ectothiorhodospiraceae, Rhodocyclaceae, Rhodospirillaceae, Oceanospirillaceae, Sterolibacteriaceae, sendo estas também observadas nas salino-alcálinas do Pantanal. Os mesmos autores relataram que a presença do gene *arxA* é restrita aos genomas de Proteobacteria, corroborando com todas famílias bacterianas encontradas nas quatro lagoas analisadas.

Apesar de ser um metabolismo que ocorre geralmente em lagos profundos e sedimentos (Edwardson et al., 2017; Kulp et al., 2008), a oxidação anaeróbica do arsenito foi mapeado nas águas das lagoas salino-alcálinas do Pantanal. Este processo tem potencial para ocorrer devido à alteração na concentração de oxigênio observada nessas lagoas. Embora as lagoas amostradas sejam rasas, verificou-se uma supersaturação de oxigênio nos primeiros 3 cm daquelas que apresentaram florações de cianobactérias, porém na profundidade de 7 cm as mesmas estavam anóxicas (Dados de campo não publicado). Brothers et al. (2014) observaram que em lago raso com elevadas concentrações de carbono orgânico dissolvido e fitoplâncton, ocorre diminuição da zona eufótica que culmina na redução do oxigênio, eliminação da maior parte da produção primária bentônica e conseqüentemente promove anóxia. Por outro lado, nas lagoas sem a presença de florações de cianobactérias, a decomposição da matéria orgânica presente nessas pode ocasionar a anóxia. De acordo com Esteves (1998), as principais perdas de oxigênio na água se deve ao consumo durante a decomposição da matéria orgânica (oxidação), perdas para a atmosfera, respiração de organismos aquáticos e oxidação de íons metálicos como, por exemplo, o ferro e o manganês, sendo esses elementos encontrados em altas concentrações nas lagoas 06SR e 07SR respectivamente. As lagoas apresentaram bactérias com potencial para realização deste metabolismo, porém recomenda-se em estudos futuros uma verificação do potencial redox nestas lagoas em diferentes profundidades.

5.4. Análises Genômicas

5.4.1 Isolamento e caracterização morfológica das linhagens de cianobactérias

A análise da comunidade microbiana feita em microscopia óptica, mostrou que em cada lagoa existe uma diversidade diferenciada, havendo como esperado predominância de cianobactérias nas lagoas que apresentaram floração.

O foco do isolamento foi a obtenção das linhagens mais expressivas, desse modo, três cianobactérias foram isoladas: *Geminocystis* sp. CENA649, *Limnospira* sp. CENA650 e *Anabaenopsis* sp. CENA651, sendo esses dois últimos os principais causadores de florações no Pantanal brasileiro e já reportados anteriormente (Andreote et al., 2018; Costa et al., 2016; Genuário et al., 2017; Santos; Sant'anna, 2010).

A linhagem *Geminocystis* sp. CENA649 apresentou células solitárias esféricas ou ovais e células hemisféricas após a divisão celular, coloração azul-esverdeada, não formaram colônias e observou-se comprimento celular de 6,1 – 8,7 μm (7,0 μm em média) e 5,4 – 7,7 μm de largura (6,3 em média), razão comprimento / largura das células de 1,0 a 1,2 (Figura 23a)

As características morfológicas da linhagem CENA649, pertencente a ordem Synechococcales mantiveram-se similar a descrição de Andreote et al. (2014), porém observou-se um diâmetro maior (6,3 - 7,0 μm) comparado as linhagens *G. herdmanii* PCC 6308 (3,5 – 4 μm), isoladas de lagoas em Wisconsin, EUA, e *G. papuanica* (4 – 5 μm), isolada da superfície do solo de florestas tropicais nas proximidades de Papua-Nova Guiné (Korelusova et al., 2009). A linhagem PCC 6308 era identificada anteriormente como *Synechocystis* sp., porém ao evidenciar as principais diferenças morfológicas (diâmetro da célula, a posição ultraestrutural dos tilacoides e a posição filogenética) entre *Synechocystis* e *Geminocystis* foi proposto a reclassificação desta linhagem para o novo gênero *Geminocystis* (Korelusova et al., 2009).

A linhagem *Limnospira* sp. CENA650, pertencente à ordem Oscillatoriales apresentou células azul-esverdeadas, organizadas em tricomas solitários, cilíndricos, ligeiramente espiralados e levemente atenuados ou não em direção aos ápices; células com protoplasma granuloso, mais curtas que largas a subquadráticas, com aerótopos; comprimento celular de 2,6 – 3,4 μm (3,0 μm em média) e 6,6 – 7,3 μm (6,9 μm em média), razão comprimento / largura da células de 0,4 a 0,5 (Figura 23b). Na linhagem CENA650 observou-se variação na morfologia dos tricomas regularmente ondulados quando comparados com as linhagens estudadas por Santos (2008, 2013) e Santos; Sant'anna (2010) em lagoas (Salina do meio, Salitrada Campo Dora) do Pantanal da Nhecolândia.

Chaiyasitdhi et al. (2018) ao investigarem as vantagens estruturais do dimorfismo em *Limnospira platensis*, relacionaram a versatilidade morfológica a motilidade de deslizamento, uma estratégia de preservar a espécie em condições adversas. As estruturas onduladas dos tricomas helicoidais dificultam o deslizamento e geram perdas na energia propulsora durante a flutuação. Por outro lado, os tricomas retos tem melhor capacidade de deslizamento em ambientes aquáticos, permitindo que o mesmo encontre quimiotaticamente ambientes mais favoráveis.

A linhagem *Anabaenopsis* sp. CENA651, pertencente à ordem Nostocales apresentou coloração verde, células cilíndricas, elípticas, com extremidades arredondadas, envelope mucilaginoso hialino ou ausente, com aerótopos; tricomas curtos; heterócitos esféricos terminais solitários ou aos pares quando intercalar e acinetos esféricos a elípticos, solitários ou aos pares, distantes do heterócito. As células tinham de 5,5 – 10,8 μm de comprimento (7,3 μm em média), o heterócito de 2,7 – 5,4 μm (4,0 μm em média) e o acineto 8,5 μm , em relação a largura, as células tinham 2,9 – 4,6 μm (3,6 μm em média), o heterócito de 3,1 – 5,3 μm (4,0 μm em média) de largura e o acineto 4,1 μm .

Morfologicamente, *Anabaenopsis* sp. corrobora com os resultados apresentados por Santos et al. (2018). Este gênero é considerado o morfotipo heterocitado mais abundante encontrado nas lagoas salino-alcálinas do Pantanal (Santos; Sant'anna 2010, Santos et al., 2018). *Anabaenopsis elenkinii* apresenta hábito planctônico e a ocorrência de tricomas com aerótopos foi observada na linhagem CENA651, porém também foi observada a presença de tricomas sem aerótopos, sendo que isso pode estar relacionado à senescência dos tricomas em resposta a mudanças de pH (Santos et al., 2011).

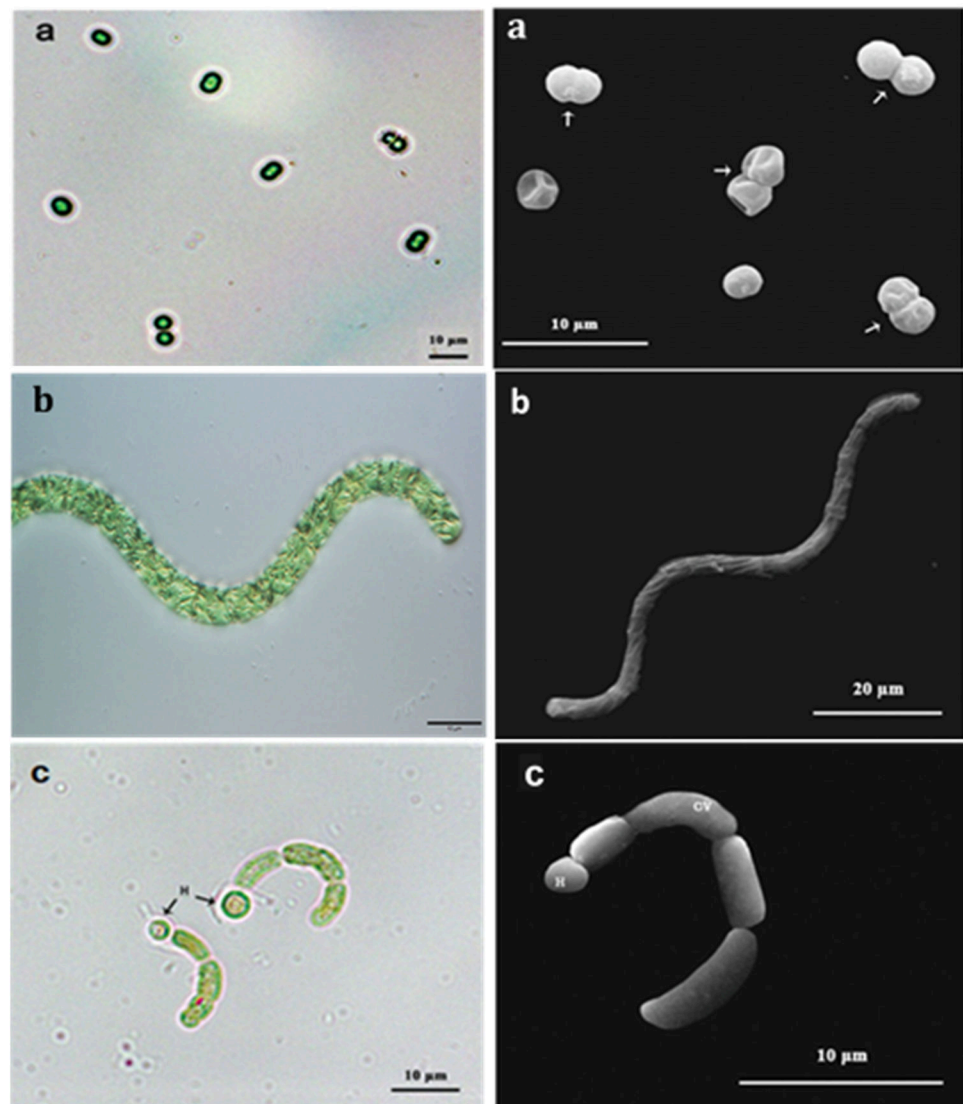


Figura 23. Microfotografias de linhagens de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálicas do Pantanal da Nhecolândia, MS. Imagens à esquerda: microscopia de luz e à direita: microscopia de varredura. (a) Células de *Geminocystis* sp. solitárias e em divisão (b) Tricoma de *Limnospira* sp. (c) Tricoma de *Anabaenopsis* sp. H=heterócito. CV = Célula vegetativa.

5.4.2 Anotação de genes de resistência ao arsênio em genomas cianobacterianos

Número cada vez maior de genomas de procariontes resistentes ao As encontram-se disponíveis nos bancos de dados, permitindo a identificação de muitos agrupamentos gênicos (clusters) relacionados ao As, revelando a heterogeneidade desses agrupamentos, em termos de conteúdo genético e organização. Comparações entre esses clusters tornam possível distinguir um conjunto mínimo de genes comuns e outros genes que são mais específicos para cada sistema (Andres; Bertin, 2016).

Desse modo, devido às altas concentrações de As nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal, buscou-se genes envolvidos na resistência deste metalóide nos genomas de cianobactérias isoladas deste ambiente e em isolados de ambientes alcalinos e/ou contaminados com As (Figura 24).

Nas linhagens do gênero *Arthrospira*, exceto *Arthrospira* sp. TJS091 e *A. maxima* CS-328, foram encontrados o operon *ars*, constituído de três genes *acr3*, *arsH* e *arsC*. Esse operon é responsável pelo sistema de resistência ao arsênio, uma vez que, o gene *arsC* codifica a enzima arsenato redutase, responsável pela biotransformação de As V (arsenato) para As III (arsenito); o gene *arsH* que codifica uma redutase quinona dependente NADPH, capaz de reduzir vários compostos sem uma função clara na resistência ao arsênico em cianobactérias; e o gene *acr3*, que codifica uma bomba de efluxo transmembrana que expulsa o As III da célula, reduzindo a sua concentração intracelular (Huertas et al., 2014). A presença do operon *ars* já foi relatada em linhagem de *Limnospira platensis* (Huertas et al., 2014).

Nas duas linhagens citadas anteriormente, TJS091 e CS-328 não foram encontrados nenhum dos genes pertencentes ao operon *ars*, porém, como o genoma está incompleto, não foi possível afirmar se essas espécies não possuem os genes ou se as sequências correspondentes não foram montadas. Em todas as linhagens de *Arthrospira* e *Limnospira* foram encontrados os genes *arsR* (repressor transcricional responsivo a As (III)) e *arsM* (responsável pelo processo de metilação que leva à formação de espécies voláteis de arsênio) (Zhu et al., 2014; Yang; Rosen, 2016).

Independente da distância geográfica do isolamento, a organização do agrupamento gênico do operon *ars* foi semelhante entre os isolados do gênero *Arthrospira* e *Limnospira*, embora alguns genes estejam localizados em direções opostas. Por outro lado, Huertas et al. (2014) observaram que mesmo em cianobactérias pertencentes ao mesmo gênero, como *Nostoc*, a organização do operon *ars* foi variável entre as linhagens com outros genes adicionados, ou seja, cianobactérias mais próximas filogeneticamente podem apresentar diferença na estrutura gênica.

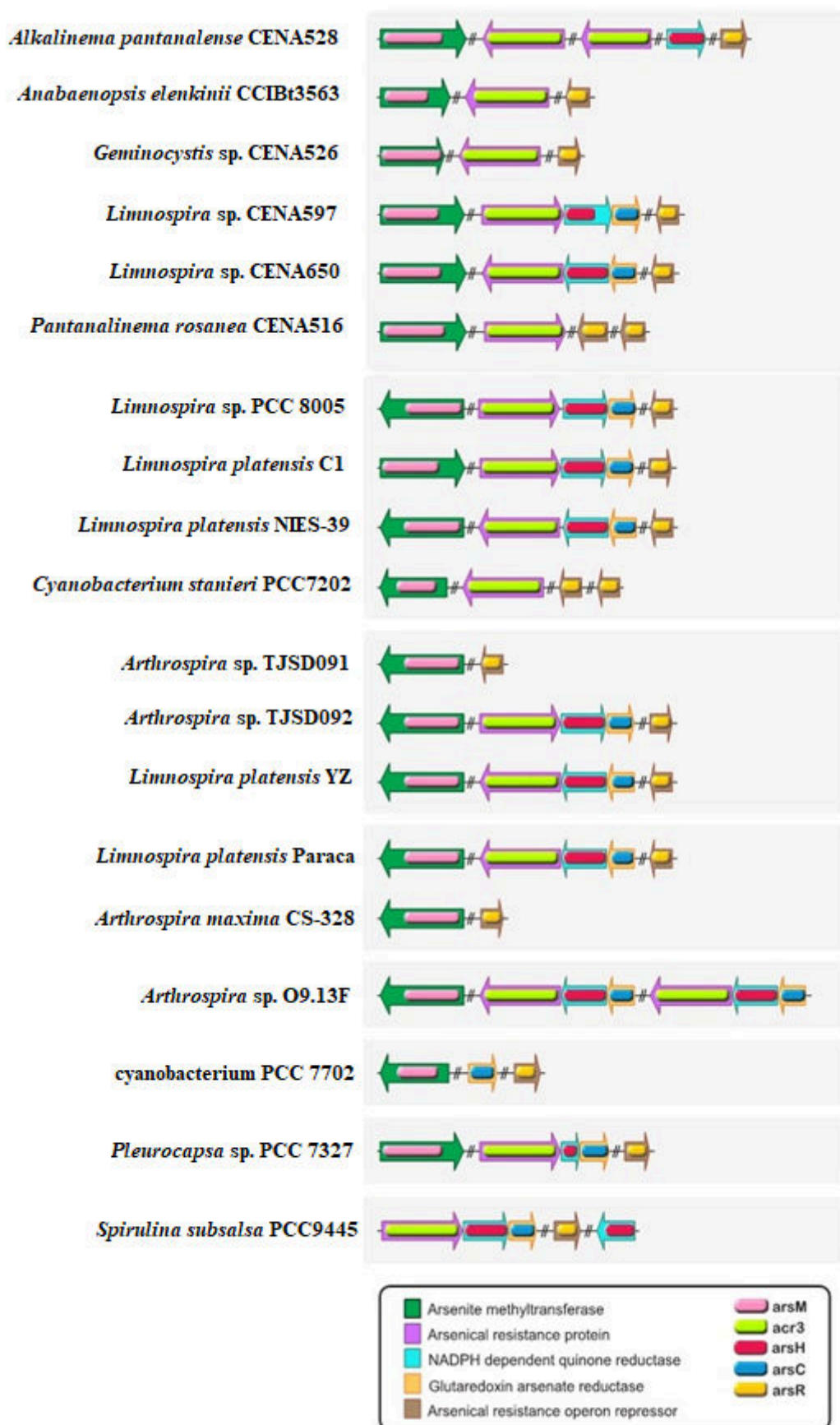


Figura 24. Organização genômica dos genes de resistência ao arsênio em cianobactérias alcalifílicas.

Dentre as linhagens do Pantanal, a anotação gênica detectou o operon *ars* somente nos isolados de *Limnospira* CENA597 e CENA650. As linhagens dos gêneros *Anabaenopsis* e *Pantanalinema* apresentaram os genes *arsM*, *acr3* e *arsR*, entretanto, não se pode afirmar que nesses gêneros o operon *ars* esteja ausente, uma vez que o genoma ainda não está fechado.

A presença dos três genes citados acima também foram observados no isolado *Geminocystis* sp. CENA526. A ausência do operon *ars* era esperada, já que as linhagens *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 (Shih et al., 2013), *Geminocystis* sp. NIES-3708 (Hirose et al., 2015) e *Geminocystis* sp. NIES-3709 (Hirose et al., 2015), que apresentam genomas completos, também não possuem o operon.

No isolado *Alkalinema pantanalense* CENA528 notou-se a presença de dois genes pertencentes ao operon, *acr3* e *arsH*, porém esses genes estavam localizados em contigs diferentes. Foram encontrados ainda os genes *arsM* e *arsR*. Outras linhagens como, *Alkalinema* sp. CACIAM 70d, *Alkalinema* sp. RL_2_19 e *Alkalinema* sp. RU_4_3 foram analisadas para verificar se o operon *ars* estava presente nas linhagens do gênero. O operon *ars* completo não foi encontrado em nenhuma das linhagens, os genes *arsR*, *acr3*, *arsH* e *arsM* foram encontrados no isolado CACIAM 70d. Por outro lado, no isolado RL_2_19 foi encontrado somente *arsR*. Em nenhuma das linhagens foi encontrado o operon *ars* completo, no isolado CACIAM 70d foram encontrados os quatro genes anotados na CENA528. Por outro lado, no isolado RL_2_19 foi encontrado somente *arsR*. Enquanto para o isolado RU_4_3, os genes encontrados foram *arsR*, *arsC*, *arsH* e *arsM*. É possível que organismos pertencentes ao gênero *Alkalinema* possua o operon *ars*, porém, como todos os genomas analisados estavam incompletos os genes relacionados ao operon não foram acessados no processo de montagem.

As linhagens cyanobacterium PCC 7702, *L. platensis* YZ e *Pleurocapsa* sp. PCC 7327 assim como as linhagens do Pantanal foram isoladas de ambientes contaminados com As, cujas concentrações de As total foram 4 mg L⁻¹ (Elders, 2010), 0,5 mg L⁻¹ (He; Laurent, 2013) e 0,2 mg L⁻¹ (Stoner et al., 1977) respectivamente. Nas duas últimas, foram encontrados o operon *ars* e os genes *arsM* e *arsR*, enquanto que para a linhagem PCC7702, encontrou-se os genes *arsC*, *arsM* e *arsR*. É possível que os outros genes do operon *ars* não tenham sido encontrados pelo fato do genoma estar incompleto.

De modo geral, foi possível observar que as cianobactérias isoladas de ambientes alcalifílicos, contaminados ou não com As, apresentaram pelo menos um dos sistemas de detoxificação, o gene *arsM* ou o operon *ars*. Interessante observar que o gene *arsM* foi anotado em todas as linhagens analisadas, exceto *Spirulina subsalsa* PCC9445. Chen et al. (2020) relataram que as vias enzimáticas que atuam no arsênio trivalente, incluindo metilação (*arsM*)

e efluxo de arsenito pela bomba ACR3, constituíam o núcleo dos sistemas de resistência microbiana ao arsênio durante período Arqueano, isto é, antes do GEO (Grande evento de oxigenação). Por outro lado, estima-se que a expansão genética do sistema de resistência ao arsênio, com os genes *arsC*, *arsH* e *arsR* tenha evoluído próximo ao final ou significativamente após o GEO. A evolução dessas novas enzimas resultou na formação de diversos operons *ars* presentes nos procariotos existentes e o ajuste regulatório dos genes do operon ocorreu ao longo da evolução da Terra. A origem precoce dos genes *arsM* e *acr3*, juntamente com a ampla distribuição entre os organismos, sustenta o papel fundamental dos mecanismos de detoxificação.

Em algumas linhagens como *Alkalinema pantanalense* CENA528, *Pantanalinema rosanae* CENA516, *Cyanobacterium stanieri* PCC7202, *Arthrospira* sp. O9.13F e *Spirulina subsalsa* PCC9445 observou-se a presença de genes repetidos em posições distintas. Procariotos com múltiplos genes de As parecem ser frequentes e geralmente oferecem níveis mais altos de resistência aos derivados de arsênio (Li; Krumholz, 2007). Essa redundância dos genes pode ser resultado da duplicação ou transferência horizontal lateral ocasionada pela dinâmica e constante troca de material genético entre micro-organismos, que representa um importante fator na evolução de genomas procarióticos (Páez-Espino et al., 2015; Villarreal-Chiu et al., 2012).

A persistência de genes *ars* entre as linhagens microbianas distintas ao longo de bilhões de ano, independentes da localização geográfica e concentração de As ambiental implica uma continuidade temporal do estresse por arsênio (Zhu et al., 2014).

5.5. Toxicidade do arsênio para *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650

O teste de toxicidade com *Anabaenopsis* sp. CENA651 apresentou pouca variação no crescimento entre as concentrações de arsênio de 0 a 1200 mg L⁻¹ (Figura 25). De acordo com a análise estatística de Krushal-Wallis não houve diferença significativa nos tempos 48; 72 e 144 horas entre os tratamentos testados. Nos tempos 0; 24; 96 e 120 horas houve diferença estatística (*p*-valor <0,05) entre a amostra controle e as concentrações testadas.

Ao final das 144 horas, as taxas de crescimento da CENA651 mantiveram-se positivas e constantes nas concentrações até 1200 mg L⁻¹ de As (V), demonstrando que este elemento não afetou significativamente a taxa de crescimento da espécie nas concentrações testadas.

Este resultado corrobora com o estudo realizado por Shaheen et al. (2007) que detectaram a sobrevivência das espécies *Phormidium* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. e *Calothrix* sp. em meio de cultivo com As (V) na concentração de 1000 mg L⁻¹.

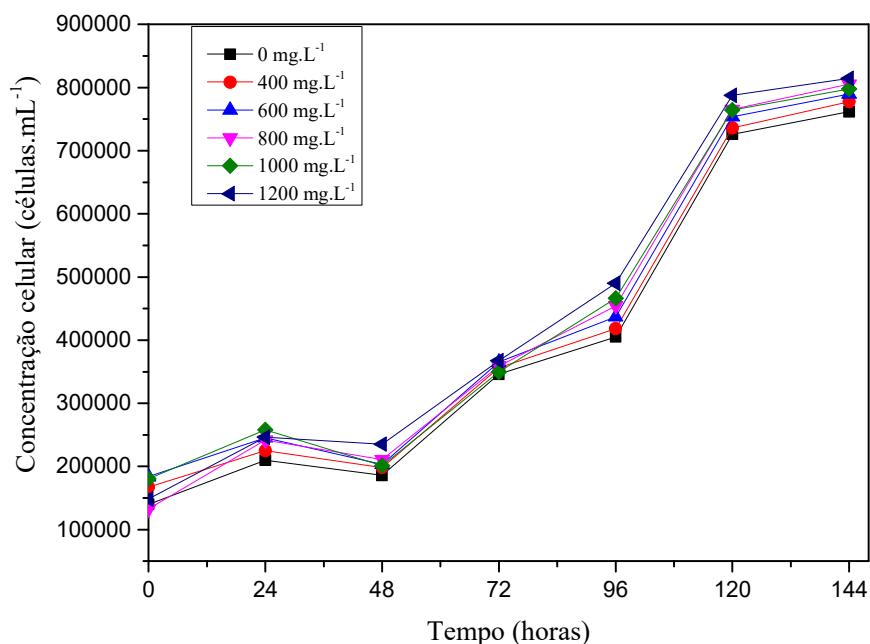


Figura 25. Crescimento de *Anabaenopsis* sp. CENA651 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 1200 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média \pm desvio padrão.

O crescimento da linhagem *Limnospira* sp. CENA650 nas concentrações de 0 a 1200 mg L⁻¹ de arsênio (Figura 26) não apresentou diferença significativa nos tempos 24 e 48 horas entre os tratamentos testados. Por outro lado, os tempos 0; 72; 96; 120 e 144 horas apresentaram diferenças significativas (p -valor $<0,05$). No entanto, observou-se maior variação nas taxas de crescimento microbiano das amostras testadas nos tempos de 120 e 144 horas.

Apesar de alguns tratamentos apresentarem diferença significativa, essa não foi suficiente para se observar uma inibição do crescimento.

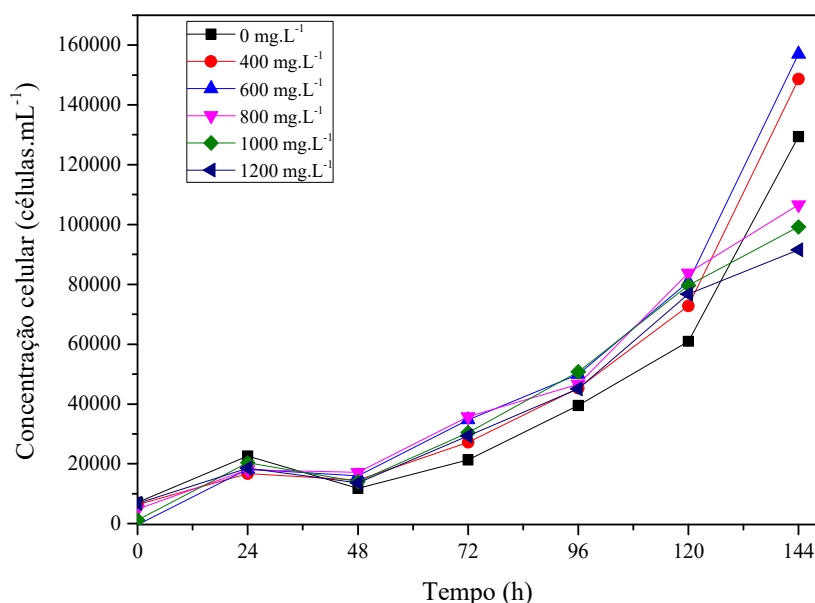


Figura 26. Crescimento de *Limnospira sp.* CENA650 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 1200 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média \pm desvio padrão.

A fim de se determinar a concentração de exposição do arsênio que pudesse inibir o crescimento das cianobactérias CENA650 e CENA651 em 50%, outras concentrações de As (V) foram definidas e testadas partindo-se da concentração inicial de 2000 mg L⁻¹ até 4000 mg L⁻¹ de As (V).

O crescimento da CENA651 nas concentrações mais elevadas de As (V) apresentou pouca variação durante as 144 horas (Figura 27). Durante todo o experimento, tanto nas concentrações de As (V) mais baixas (0 a 1200 mg L⁻¹) como nas mais altas (0 a 4000 mg L⁻¹), observou-se que o tratamento controle (sem adição do arsênio) teve crescimento inferior ou igual aos tratamentos contendo as diferentes concentrações de arsênio. Isso demonstra que o arsênio parece exercer um pequeno efeito positivo no crescimento da *Anabaenopsis sp.* CENA651 nas concentrações testadas. Em estudo realizado por Bhattacharya e Pal (2012), foi observado que a cianobactéria *Phormidium tenue* foi capaz de crescer melhor em meio contendo 6 mg L⁻¹ e 22,5 mg L⁻¹ de arsenato de sódio quando comparado ao tratamento sem arsênio.

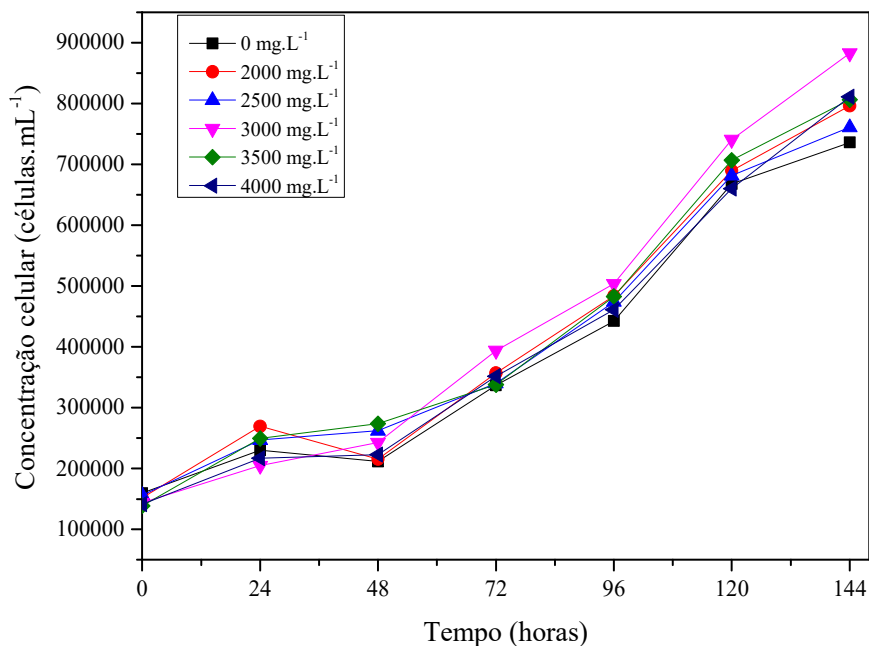


Figura 27. Crescimento de *Anabaenopsis* sp. CENA651 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 4000 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média \pm desvio padrão.

O crescimento da CENA650 apresentou variações entre os tratamentos nas concentrações 0 a 4000 mg L⁻¹ de As (V). Ao analisar a Figura 28, verificou-se uma queda no crescimento microbiano no tempo de 48 horas em todas as concentrações testadas e em seguida esse foi retomado. Comportamento similar ao da *Limnospira* sp. CENA650 foi observado por Franco et al. (2015) durante o crescimento da *Synechococcus* sp., exposta a 2916 mg L⁻¹ de As (V), que retomou o crescimento a partir de 24 horas. Em estudo realizado por Pandey et al. (2012) verificou-se o comportamento da cianobactéria *Anabaena* sp. cultivada com 3000 mg L⁻¹ de As(V), também apresentou queda nos estágios preliminares e o crescimento foi retomado a partir de 24 horas.

Esta queda no crescimento microbiano pode demonstrar um efeito inicial bacteriostático, o qual pode ser compensado por mecanismos celulares de resistência que podem promover mudanças na expressão gênica e na atividade de enzimas como arsenato reductase, que resultam na retomada do crescimento (Pandey et al., 2012).

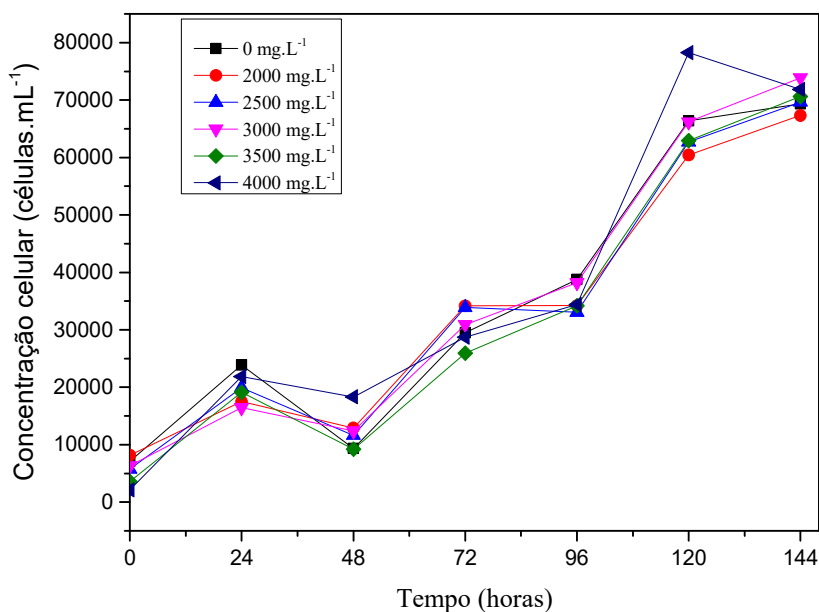


Figura 28. Crescimento de *Limnospira* sp. CENA650 nas concentrações de arsênio (V), 0 a 4000 mg L⁻¹, em 144 horas. Os pontos representam a média ± desvio padrão.

Apesar de alguns tratamentos terem apresentado diferença significativa, em nenhuma das concentrações testadas observou-se inibição do crescimento suficiente para se calcular a EC₅₀. Desta forma, conclui-se que o As (V) na concentração 4000 mg L⁻¹ apresentou baixa toxicidade para os tratamentos inoculados com as cianobactérias *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650 quando comparado ao tratamento controle. É importante reforçar que essas concentrações são superiores as encontradas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal em mais de 1000 vezes (Richter et al., 2019).

5.6. Especificação química do arsênio em meio Z8 modificado

A avaliação do comportamento químico do As(V) (Na₂HAsO₄·7H₂O) nas concentrações 400; 600; 800; 1000; 1200; 2000; 2500; 3000; 3500 e 4000 mg.L⁻¹, mostrou que as possíveis espécies de As previstas foram: AsO₄³⁻, HAsO₄²⁻ e H₂AsO₄⁻ (Tabela 12).

Estas espécies de oxiânions formadas são consideradas tóxicas. O grau de toxicidade dos compostos de As tende a obedecer à seguinte ordem: arsina > arsenitos inorgânicos > compostos trivalentes orgânicos > arsenatos inorgânicos > compostos pentavalentes orgânicos > As elementar (Mondal et al., 2006; O'Day, 2006). Outro fator importante de ser enfatizado é que não houve a complexação do As, ou seja, o metalóide encontrava-se totalmente disponível para célula.

Tabela 12. Especiação do $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 400 a 4000 mg L^{-1} no meio de cultura Z8 modificado calculada utilizando-se o programa Visual MINTEQ versão 3.1.

| As adicionado (mg L^{-1}) | Espécies de As (%) | | | Total dissolvido (%) |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
| | AsO_4^{3-} | HAsO_4^{2-} | H_2AsO_4^- | |
| 400 | 2,022 | 97,849 | 0,129 | 100 |
| 600 | 2,029 | 97,842 | 0,129 | 100 |
| 800 | 2,036 | 97,835 | 0,129 | 100 |
| 1000 | 2,043 | 97,829 | 0,128 | 100 |
| 1200 | 2,050 | 97,822 | 0,128 | 100 |
| 2000 | 2,076 | 97,797 | 0,127 | 100 |
| 2500 | 2,091 | 97,782 | 0,127 | 100 |
| 3000 | 2,106 | 97,768 | 0,126 | 100 |
| 3500 | 2,121 | 97,754 | 0,125 | 100 |
| 4000 | 2,135 | 97,741 | 0,125 | 100 |

O aumento da concentração de As na solução, proporcionou pequenos incrementos na porcentagem da espécie AsO_4^{3-} , enquanto as espécies HAsO_4^{2-} e H_2AsO_4^- diminuíram. O programa possibilitou estimar que as quantidades de espécies formadas de HAsO_4^{2-} , AsO_4^{3-} e H_2AsO_4^- variaram respectivamente de 391,40 a 3909,64 mg L^{-1} , 8,08 a 85,4 mg L^{-1} e 0,51 a 5 mg L^{-1} quando adicionadas as concentrações de 400 a 4000 mg L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Embora se observa três espécies de As no meio de cultura, mais de 97% desse elemento em todas as suspensões apresentaram-se na forma HAsO_4^{2-} , que pode ser explicado pelo pH 9,5 do meio. Smedley e Kinniburgh (2002) relataram que a espécie de As encontrada predominante na faixa de pH entre 2 e 7 é H_2AsO_4^- (dihidrogenoarsenato). Os mesmos autores enfatizaram que o HAsO_4^{2-} (monohidrogenoarsenato) é a espécie mais comumente encontrada em valores de pH entre 7 e 11,5, o que corrobora com nossos dados. Já a espécie AsO_4^{3-} está presente em condições extremamente alcalinas.

Nessa avaliação, foram considerada apenas as interações do As(V) com os componentes do meio de cultura, porém as células microbianas também podem interferir no processo de especiação do arsênio. Diversos estudos têm demonstrado o papel de diferentes espécies de cianobactérias como agente de biotransformação dos oxianions de As(V) em formas orgânicas consideradas menos tóxicas (Franco et al., 2015; Guo et al., 2011, Yin et al., 2011).

Baseado na resistência das cianobactérias CENA650 e CENA651 às concentrações elevadas de As e conhecendo as possíveis espécies de As formadas no meio de cultura Z8, recomenda-se que experimentos de especiação com essas linhagens sejam realizados para contribuir com o conhecimento da dinâmica do arsênio nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal.

6. CONCLUSÕES

- Este trabalho fornece a primeira avaliação robusta sobre a funcionalidade, estrutura e composição das comunidades microbianas envolvidas na ciclagem de arsênio nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro. Os resultados mostraram que as cianobactérias responsáveis pelas florações no Pantanal têm potencial para reduzir o As (V) em As (III) e posteriormente eliminar o As (III) através das bombas de efluxo. Além disso, diferentes grupos de micro-organismos apresentaram potencial para oxidação do arsenito a arsenato.
- O estudo confirma os altos níveis de As dissolvidos nas águas das lagoas salino-alcálicas da Nhecolândia e os baixos níveis do metalóide no sedimento. Os resultados mostram que os organismos fitoplanctônicos apresentaram baixo fator de bioacumulação em relação ao As. Isto pode ser decorrente da capacidade destes em biotransformarem o As ou ainda outros processos podem estar limitando a biodisponibilidade do As.
- Os resultados evidenciam que com o agrupamento gênico presente nas cianobactérias responsáveis pelas florações *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Limnospira* sp. CENA597 e *Limnospira* sp. CENA650, a participação das mesmas na ciclagem de As nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal pode ocorrer através do processo de metilação ou efluxo de As (III), ambos conhecidos por serem sistemas de detoxificação. Além disso, as anotações demonstraram importantes informações quanto ao arranjo e posicionamento dos genes de resistência ao As.
- As cianobactérias *Anabaenopsis* sp. CENA651 e *Limnospira* sp. CENA650 mostraram-se resistentes ao As (V) ao crescerem nas concentrações de 4000 mg L⁻¹ de arsenato de sódio, sugerindo que os mecanismos de resistência (genes) podem estar ativos, o que provavelmente explica a capacidade dessas cianobactérias formarem florações nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal que são ricas em arsênio.
- Por fim, este estudo contribui para a expansão dos conhecimentos da estrutura e a capacidade funcional das comunidades microbianas associadas com a ciclagem de arsênio em lagoas salino-alcálicas, e do potencial das linhagens CENA650 e CENA651 na biotransformação do arsênio.

REFERÊNCIAS

- ABDON, M. M.; POTT, V. J.; SILVA, J. S. V. Avaliação da cobertura por plantas aquáticas em lagoas da sub-região da Nhecolândia no pantanal por meio de dados Landsat e SPOT. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 13, p. 1675-1681, 1998.
- ABREU, I. et al. The interaction of boron with glycolipids is required to increase tolerance to stresses in *Anabaena* PCC 7120. **Phytochemistry**, v. 106, p. 55-60, 2014.
- ACHOUR, A. R.; BAUDA, P.; BILLARD, P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. **Research in microbiology**, v. 158, n. 2, p. 128-137, 2007.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. **Biodiversidade do Pantanal: ecologia & conservação**. Editora UNIDERP, Campo Grande, 2005.
- ALMEIDA, T. I. R. et al. Biogeochemical process and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 391-407, 2011.
- ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, Jeffrey; HILLE, R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23674-23682, 1992.
- ANDREOTE, A. P. D. et al. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Journal of phycology**, v. 50, n. 4, p. 675-684, 2014.
- ANDREOTE, A. P. D. et al. Contrasting the genetic patterns of microbial communities in soda lakes with and without cyanobacterial bloom. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 244, 2018.
- ANDRES, J.; BERTIN, P. N. The microbial genomics of arsenic. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 299-322, 2016.
- ANTONY, C. P. et al. Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. **The ISME journal**, v. 7, n. 3, p. 468-476, 2013.
- APHA (American Public Health Association, & American Water Works Association). Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association, 1989.
- ARMIENTA, M. A.; SEGOVIA, N. Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 30, n. 4, p. 345-353, 2008.
- ARRIAZA, B. et al. Exploring chronic arsenic poisoning in pre-Columbian Chilean mummies. **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 6, p. 1274-1278, 2010.
- ASSINE, M. L. et al. The Quaternary alluvial systems tract of the Pantanal Basin, Brazil. **Brazilian Journal of Geology**, v. 45, n. 3, p. 475-489, 2015.
- AZEVEDO, J. S. N. D. et al. Gene expression of the arsenic resistance operon in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 2, p. 137-142, 2008.
- BANH, A. et al. Manganese (Mn) oxidation increases intracellular Mn in *Pseudomonas putida* GB-1. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77835, 2013.
- BARBIÉRO, L. et al. Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. **Wetlands**, Wilmington, v. 22, n. 3, p. 528-540, 2002.
- BARBIÉRO, L. et al. Natural arsenic in groundwater and alkaline lakes at the upper Paraguay basin, Pantanal, Brazil. **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**, v. 9, p. 101-127, 2007.
- BARBIÉRO, L. et al. Biogeochemical diversity, O₂-supersaturation and hot moments of GHG emissions from shallow alkaline lakes in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. **Science of the total environment**, v. 619, p. 1420-1430, 2018.

- BERTIN, P. N. et al. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta-and proteo-genomics. **The ISME journal**, v. 5, n. 11, p. 1735-1747, 2011.
- BHATTACHARYA, P.; PAL, R. Scope of phycoremediation of Arsenic using *Phormidium tenue* with special reference to modulation in cellular biochemistry. **J. Algal Biomass Util**, v. 3, p. 1-8, 2012.
- BLUM, J. S. et al. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. **Archives of microbiology**, v. 171, n. 1, p. 19-30, 1998.
- BRASIL, Portaria No. 2914/2011, do Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília**, v. 12, 2011.
- BROTHERS, S. et al. A feedback loop links brownification and anoxia in a temperate, shallow lake. **Limnology and Oceanography**, v. 59, n. 4, p. 1388-1398, 2014.
- BUNDSCHUH, J. et al. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 2-35, 2012.
- BURGANSKAYA, E. I. et al. Benthic phototrophic community from Kiran soda lake, south-eastern Siberia. **Extremophiles**, v. 22, n. 2, p. 211-220, 2018.
- CAI, L. et al. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 4, 2009.
- CAI, L. et al. Metagenomic exploration reveals high levels of microbial arsenic metabolism genes in activated sludge and coastal sediments. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9579-9588, 2013.
- CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. **CCME Water Quality Index 1.0, Technical report**, 2001.
- CARRIERI, D. et al. Contribution of a sodium ion gradient to energy conservation during fermentation in the cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* CS-328. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7185-7194, 2011.
- CARVER, T. et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.
- CASAMAYOR, E. O.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; CASTAÑEDA, C. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. **FEMS microbiology ecology**, v. 85, n. 3, p. 503-518, 2013.
- CASTILLO, R.; SAIER, M. H. Functional promiscuity of homologues of the bacterial ArsA ATPases. **International journal of microbiology**, v. 2010, 2010.
- CASTRO DE ESPARZA, M. L. Mejoramiento de la calidad del agua de pozos en zonas rurales de Puno, Perú. **Tecnologías económicas para el abatimiento de arsénico en aguas. Buenos Aires: Editorial Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo**, p. 243-256, 2010.
- CAUMETTE, G. et al. Arsenic speciation in plankton organisms from contaminated lakes: transformations at the base of the freshwater food chain. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 23, p. 9917-9923, 2011.
- CCME, 2001. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life.
- CHAIYASITDHI, A. et al. The biomechanical role of overall-shape transformation in a primitive multicellular organism: A case study of dimorphism in the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Plos one**, v. 13, n. 5, p. e0196383, 2018.

- CHAKRABORTY, A.; DASGUPTA, C. K.; BHADURY, P. Diversity of Betaproteobacteria revealed by novel primers suggests their role in arsenic cycling. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03089, 2020.
- CHALLACOMBE, J. F. et al. Complete genome sequence of *Halorhodospira halophila* SL1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 8, n. 2, p. 206-214, 2013.
- CHANG, J.S. et al. Arsenic detoxification potential of *aox* genes in arsenite-oxidizing bacteria isolated from natural and constructed wetlands in the Republic of Korea. **Environmental geochemistry and health**, v. 32, n. 2, p. 95-105, 2010.
- CHEEVADHANARAK, S. et al. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438). **Standards in genomic Sciences**, v. 6, n. 1, p. 43-53, 2012.
- CHEN, B. et al. Accurate fast screening for total and inorganic arsenic in rice grains using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS). **Analytical methods**, v. 6, n. 18, p. 7554-7558, 2014.
- CHEN, S. C. et al. The Great Oxidation Event expanded the genetic repertoire of arsenic metabolism and cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 19, p. 10414-10421, 2020.
- CHOUERI, R. B. et al. The influence of cyanobacterium exudates on copper uptake and toxicity to a tropical freshwater cladoceran. **Journal of plankton research**, v. 31, n. 10, p. 1225-1233, 2009.
- CONAMA, 2011. Resolução 357/2005. (<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>)
- CORNU, S. et al. Influence de composés organiques sur l'adsorption de l'arsenic par les kaolinites. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIA-Earth and Planetary Science**, v. 328, n. 10, p. 649-654, 1999.
- CROGNALE, S. et al. Biological As (III) oxidation in biofilters by using native groundwater microorganisms. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 93-102, 2019.
- DADHEECH, P. K. et al. Cyanobacterial diversity in the hot spring, pelagic and benthic habitats of a tropical soda lake. **FEMS microbiology ecology**, v. 85, n. 2, p. 389-401, 2013.
- DONG, S. et al. Draft genome sequence of cyanobacteria *Arthrospira* sp. TJS091 isolated from seaside wetland. **Marine genomics**, v. 24, p. 197-198, 2015.
- DUDHAGARA, P. et al. Metagenomic data of fungal internal transcribed Spacer and 18S rRNA gene sequences from Lonar lake sediment, India. **Data in Brief**, v. 4, p. 266-268, 2015.
- DUQUESNE, K. et al. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 1, p. 228-237, 2008.
- DYHRMAN, S.; HALEY, S. Arsenate resistance in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 214, 2011.
- EDWARDSON, C.F.; HOLLIBAUGH, J. T. Metatranscriptomic analysis of prokaryotic communities active in sulfur and arsenic cycling in Mono Lake, California, USA. **The ISME journal**, v. 11, n. 10, p. 2195-2208, 2017.
- ELDERS, A. Iceland deep drilling project (IDDP): Arsenic distribution and mobility in active and fossil geothermal systems in Iceland. In: **Proceedings World Geothermal Congress**. 2010.
- ELLIS, P. J. et al. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. **Structure**, v. 9, n. 2, p. 125-132, 2001.
- EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D427-D432, 2019.
- EPA. Arsenic, Inorganic (CASRN 7440-38-2): Integrated Risk Information System, 1991.
- ESTEVEZ, A. F. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro. Ed. Interciência, p.602, 1998.

- FEKIH, I. B. et al. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2473, 2018.
- FENDORF, S.; MICHAEL, H. A.; VAN GEEN, A. Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in South and Southeast Asia. **Science** v. 328, n. 5982, p. 1123–1127, 2010.
- FLANAGAN, S. V.; JOHNSTON, R. B.; ZHENG, Y. Arsenic in tube well water in Bangladesh: health and economic impacts and implications for arsenic mitigation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 90, p. 839-846, 2012.
- FIRRINCIELI, A. et al. Identification of resistance genes and response to arsenic in *Rhodococcus aetherivorans* BCP1. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 888, 2019.
- FRANCO, M. W. et al. Arsenic biotransformation by cyanobacteria from mining areas: evidences from culture experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 23, p. 18607-18615, 2015.
- FREITAS, A. C. et al. In: Guimarães, E.; Trevelin, C. C.; Manoel, P. S. **Pantanal: paisagens, flora e fauna**; 1. ed., São Paulo: Cultura Acadêmica, 2014.
- FREITAS, J. G. et al. Interaction between lakes' surface water and groundwater in the Pantanal wetland, Brazil. **Environmental earth sciences**, v. 78, n. 5, p. 139, 2019.
- FUJISAWA, T. et al. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* NIES-39. **DNA research**, v. 17, n. 2, p. 85-103, 2010.
- FURIAN, S et al. Chemical diversity and spatial variability in myriad lakes in Nhecolândia in the Pantanal wetlands of Brazil. **Limnology and Oceanography** v. 58, p. 2249-2261, 2013.
- FURQUIM, S. A. C. et al. Mineralogy and genesis of smectites in alkaline-saline environment of Pantanal wetland, Brazil. **Clays and Clay Minerals**, Long Island City, v. 56, n. 5, p. 580-596, 2008.
- GARBINSKI, L. D.; ROSEN, B. P.; CHEN, J. Pathways of arsenic uptake and efflux. **Environment international**, v. 126, p. 585-597, 2019.
- GARCIA, E. A. C. O clima no Pantanal mato-grossense. Circular técnica N° 14. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Corumbá, MS, 1984.
- GARCIA, E. A. C. Zoneamento agroecológico e socioeconômico da Bacia Hidrográfica Brasileira do rio Paraguai: uma abordagem numérica preliminar. **Embrapa Pantanal**, Corumbá, p. 1-65, 1991.
- GENUARIO, D. B. et al. Heterocyte-forming cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 109, p. 105-112, 2017.
- GEER, Lewis Y. et al. CDART: protein homology by domain architecture. **Genome research**, v. 12, n. 10, p. 1619-1623, 2002.
- GHOSH, D.; BHADURY, P.; ROUTH, J. Diversity of arsenite oxidizing bacterial communities in arsenic-rich deltaic aquifers in West Bengal, India. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 602, 2014.
- GIHRING, T. M.; BANFIELD, J. F. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 335-340, 2001.
- GOLDBERG, S. Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 2, p. 413-421, 2002.
- GRANT, W. D.; SOROKIN, D. Y. Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles. In: **Extremophiles handbook**. 2011.
- GUÉRÉQUIZ, R. et al. Environmental risk assessment of arsenic in the Raigón aquifer, Uruguay. **Biologist (Lima)**, v. 7, n. 1–2, 2009.
- GUO, P. et al. Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1754-1759, 2011.

- GUO, Y. et al. Arsenic methylation by an arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase from *Spirulina platensis*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 49, p. 162-168, 2016.
- GUSTAFSSON, P. J. Visual MINTEQ (Version 3.0): an equilibrium speciation model that can be used to calculate equilibrium metal speciation. 2015.
- HAHN, Martin W. The microbial diversity of inland waters. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 256-261, 2006.
- HAMAMURA N. et al. Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 2, p. 421-431, 2009.
- HAMAMURA, N.; LIU, Y.; INSKEEP, W. P. Identification of bacterial community and arsenate-reducing bacteria associated with a soda lake in Khovsgol, Mongolia. **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry**, p. 99-107, 2012.
- HAMISI, M. I. et al. Plankton composition, biomass, phylogeny and toxin genes in Lake Big Momela, Tanzania. **African journal of aquatic science**, v. 42, n. 2, p. 109-121, 2017.
- HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HANDLEY, K. M.; HÉRY, M.; LLOYD, J. R. Redox cycling of arsenic by the hydrothermal marine bacterium *Marinobacter santoriniensis*. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1601-1611, 2009.
- HASSAN, Z. et al. Iron cycling potentials of arsenic contaminated groundwater in Bangladesh as revealed by enrichment cultivation. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 9, p. 779-792, 2016.
- HASEGAWA, H. et al. Freshwater phytoplankton: biotransformation of inorganic arsenic to methylarsenic and organoarsenic. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- HE, J.; CHARLET, L. A review of arsenic presence in China drinking water. **Journal of hydrology**, v. 492, p. 79-88, 2013.
- HERNANDEZ-MALDONADO, J. et al. The genetic basis of anoxygenic photosynthetic arsenite oxidation. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 1, p. 130-141, 2017.
- HÉRY, M. et al. Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifer sediments from West Bengal. **Geobiology**, v. 8, n. 2, p. 155-168, 2010.
- HIROSE, Y. et al. Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. strain NIES-3708, which performs type II complementary chromatic acclimation. **Genome announcements**, v. 3, n. 3, 2015.
- HIROSE, Y. et al. Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. strain NIES-3709, which harbors a phycoerythrin-rich phycobilisome. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, 2015.
- HO, A.; DI LONARDO, D. P.; BODELIER, P. L.E. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 3, p. fix006, 2017.
- HOEFT, S. E. et al. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with Mono Lake water and isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 5, p. 2741-2747, 2004.
- HOEFT, S. E. et al. *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 3, p. 504-512, 2007.
- HOEFT, S. et al. Arsenite as an electron donor for anoxygenic photosynthesis: description of three strains of *Ectothiorhodospira* from Mono Lake, California and Big Soda Lake, Nevada. **Life**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.

- HOLLIBAUGH, J. T. et al. Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a soda lake. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 2043-2049, 2006.
- HUANG, K. et al. Arsenic methylation by a novel ArsM As (III) S-adenosylmethionine methyltransferase that requires only two conserved cysteine residues. **Molecular microbiology**, v. 107, n. 2, p. 265-276, 2018.
- HUERTAS, M. J. et al. Metals in cyanobacteria: analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. **Life**, v. 4, n. 4, p. 865-886, 2014.
- ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 68-71, 2004.
- IVANOVA, V. et al. High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura Cave, Bulgaria. **Journal of Cave & Karst Studies**, v. 75, n. 3, 2013.
- JIA, Y. et al. Arsenic uptake by rice is influenced by microbe-mediated arsenic redox changes in the rhizosphere. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 2, p. 1001-1007, 2014.
- JIANG, Z. et al. Arsenic mobilization in a high arsenic groundwater revealed by metagenomic and Geochip analyses. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.
- JIANG, Z. et al. Diversity and abundance of the arsenite oxidase gene *aioA* in geothermal areas of Tengchong, Yunnan, China. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 161-170, 2014.
- JUNK, W. J. et al. The flood pulse concept in river-foodplain systems. **Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences**, v. 106, n. 1, p. 110-127, 1989.
- KANG, Y. S. et al. Involvement of RpoN in regulating bacterial arsenite oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 16, p. 5638-5645, 2012.
- KASHYAP, D. R. et al. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1081-1088, 2006.
- KAŹMIERCZAK, J. et al. Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. **Facies**, v. 57, n. 4, p. 543-570, 2011.
- KIRBY, J.; MAHER, W.; SPOONER, D. Arsenic occurrence and species in near-shore macroalgae-feeding marine animals. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 16, p. 5999-6005, 2005.
- KOECHLER, S. et al. Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 53, 2010.
- KORELUSOVA, J.; KASŤOVSKÝ, J.; KOMÁREK, J. Heterogeneity Of The Cyanobacterial Genus *Synechocystis* And Description Of A New Genus, *Geminocystis* 1. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 4, p. 928-937, 2009.
- KRIENITZ, L.; DADHEECH, P. K.; KOTUT, K. Mass developments of the cyanobacteria *Anabaenopsis* and *Cyanospira* (Nostocales) in the soda lakes of Kenya: ecological and systematic implications. **Hydrobiologia**, v. 703, n. 1, p. 79-93, 2013.
- KULP, T. R. et al. Arsenic (III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 967-970, 2008.
- KUMARI, N.; JAGADEVAN, S. Genetic identification of arsenate reductase and arsenite oxidase in redox transformations carried out by arsenic metabolising prokaryotes—A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 163, p. 400-412, 2016.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357, 2012.
- LEFORT, F. et al. Whole-genome shotgun sequence of *Arthrospira platensis* strain Paraca, a cultivated and edible cyanobacterium. **Genome announcements**, v. 2, n. 4, 2014.
- LEON, C. G. et al. Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). **PloS one**, v. 13, n. 5, 2018.

- LI, H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.
- LI, J.; PAWITWAR, S. S.; ROSEN, B. P. The organoarsenical biocycle and the primordial antibiotic methylarsenite. **Metallomics**, v. 8, n. 10, p. 1047-1055, 2016.
- LI, X.; KRUMHOLZ, L. R. Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* gene. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 10, p. 3705-3711, 2007.
- LI, X.; ZHANG, L.; WANG, G. Genomic evidence reveals the extreme diversity and wide distribution of the arsenic-related genes in Burkholderiales. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e92236, 2014.
- LIAO, V. H. C. et al. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic rich groundwater in Taiwan. **Journal of contaminant hydrology**, v. 123, n. 1-2, p. 20-29, 2011.
- LIÈVREMONT, D.; BERTIN P. N.; LETT, M. C. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1229-1237, 2009.
- LIU, G. et al. A periplasmic arsenite-binding protein involved in regulating arsenite oxidation. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1624-1634, 2012.
- LÓPEZ-MAURY, L.; FLORENCIO, F. J.; REYES, J. C. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 18, p. 5363-5371, 2003.
- LORENZO, J. I. et al. Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Marine chemistry**, v. 103, n. 1-2, p. 61-75, 2007.
- LUO, J. et al. Metagenomic approach reveals variation of microbes with arsenic and antimony metabolism genes from highly contaminated soil. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.
- MACUR, R. E. et al. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. **Environmental science & technology**, v. 38, n. 1, p. 104-111, 2004.
- MAHER, W.; FOSTER, S.; KRIKOWA, F. Arsenic species in Australian temperate marine food chains. **Marine and Freshwater Research**, v. 60, n. 9, p. 885-892, 2009.
- MALASARN, D. et al. *arrA* is a reliable marker for As (V) respiration. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 455-455, 2004.
- MALIK, A. H. et al. Perspectives of low cost arsenic remediation of drinking water in Pakistan and other countries. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 1-12, 2009.
- MALONE, C. F. S.; SANTOS, K. R. S.; SANT'ANNA, C. L. Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal Brasileiro. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 4, 745-755, 2012.
- MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, v.58, n. 1, p. 201-235, 2002.
- MARIOT, M. et al. Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolândia, Brasil. **Science of the Total Environment**, v. 388, n. 1-3, p. 184-193, 2007.
- MARTINS E. R. C., 2012. **Tipologia de Lagoas Salinas no Pantanal da Nhecolândia (MS)**. Tese (Doutorado em Geografia Física) - Universidade de São Paulo. 2012.
- MCCLINTOCK, T. R. et al. Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 76-91, 2012.
- MELTON, E. D. et al. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 797-808, 2014.

- MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2008.
- MILNE, I. et al. Tablet—next generation sequence assembly visualization. **Bioinformatics**, v. 26, n. 3, p. 401-402, 2010.
- MIYASHITA, S. I. et al. Arsenic metabolism in cyanobacteria. **Environmental Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 577-589, 2016.
- MONDAL, P.; MAJUMDER, C. B.; MOHANTY, B. Laboratory based approaches for arsenic remediation from contaminated water: recent developments. **Journal of Hazardous materials**, v. 137, n. 1, p. 464-479, 2006.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NAMSARAEV, Z. B. et al. Microbial processes and factors controlling their activities in alkaline lakes of the Mongolian plateau. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, n. 6, p. 1391-1401, 2015.
- NAVRATILOVA, J. et al. Arsenic cycling in marine systems: degradation of arsenosugars to arsenate in decomposing algae, and preliminary evidence for the formation of recalcitrant arsenic. **Environmental Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 44-51, 2011.
- NICOLLI, H. B. et al. Arsenic and associated trace-elements in groundwater from the Chaco-Pampean plain, Argentina: results from 100 years of research. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 36-56, 2012.
- NOGUEIRA, P.F.M et al. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Biology**, v. 50, n. 9, p. 1560-1567, 2005.
- NOWICKA-KRAWCZYK, P.; MÜHLSTEINOVÁ, R.; HAUER, T. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- O'DAY, P. A. Chemistry and mineralogy of arsenic. **Elements**, v. 2, n. 2, p. 77-83, 2006.
- OLIVEIRA, A. P. G. et al. Uso de sensoriamento remoto na quantificação das lagoas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Curitiba, v.15, p. 3695-3702, 2011.
- OREMLAND, R. S. et al. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4795-4802, 2002.
- OREMLAND, R. S.; STOLZ, J. F. The ecology of arsenic. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 939-944, 2003.
- OREMLAND, R. S.; STOLZ, J. F.; HOLLIBAUGH, J. T. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 15-27, 2004.
- OREMLAND, R. S. et al. A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1305-1308, 2005.
- OREMLAND, R. S.; STOLZ, J. F. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 2, p. 45-49, 2005.
- OREMLAND, R. S. et al. Autotrophic microbial arsenotrophy in arsenic-rich soda lakes. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 15, 2017.
- OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 2002.
- OSPINO, M. C.; KOJIMA, H.; FUKUI, M.. Arsenite oxidation by a newly isolated betaproteobacterium possessing arx genes and diversity of the arx gene cluster in bacterial genomes. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1210, 2019.

- PÁEZ-ESPINO, D et al. Microbial responses to environmental arsenic. **Biometals**, v. 22, n. 1, p. 117-130, 2009.
- PÁEZ-ESPINO, D.; DURANTE-RODRÍGUEZ, G.; LORENZO, V. Functional coexistence of twin arsenic resistance systems in *Pseudomonas putida* KT 2440. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 229-238, 2015.
- PANDEY, S.; RAI, R.; RAI, L. Chand. Proteomics combines morphological, physiological and biochemical attributes to unravel the survival strategy of *Anabaena* sp. PCC7120 under arsenic stress. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 3, p. 921-937, 2012.
- PARIZOTTO, T. M. **Estudo morfológico e hidroquímico de uma micro depressão no Pantanal da Nhecolândia - MS**. Dissertação (Mestrado em Geografia Física) - Universidade de São Paulo. 2012.
- PAUL, D. et al. Diversity, metabolic properties and arsenic mobilization potential of indigenous bacteria in arsenic contaminated groundwater of West Bengal, India. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0118735, 2015.
- PRICE, A. et al. Distribution of arsenic species in an open seagrass ecosystem: relationship to trophic groups, habitats and feeding zones. **Environmental Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 77-88, 2012.
- RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H. Arsenic in freshwater systems: Influence of eutrophication on occurrence, distribution, speciation, and bioaccumulation. **Applied Geochemistry**, v. 27, n. 1, p. 304-314, 2012.
- RAMPELOTTO, P. H. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. **Sustainability**, v. 2, n. 6, p. 1602-1623, 2010.
- RETAMAL-MORALES, G. et al. Genomic characterization of the arsenic-tolerant actinobacterium, *Rhodococcus erythropolis* S43. In: **Solid State Phenomena**. Trans Tech Publications Ltd, 2017. p. 660-663.
- RICHTER, L. et al. Dissolved arsenic in the upper Paraguay River basin and Pantanal wetlands. **Science of the total environment**, v. 687, p. 917-928, 2019.
- RODRÍGUEZ-LADO, L. et al. Groundwater arsenic contamination throughout China. **Science**, v. 341, n. 6148, p. 866-868, 2013.
- ROSEN, B. P.; LIU, Z. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. **Environment international**, v. 35, n. 3, p. 512-515, 2009.
- ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.
- SÁNCHEZ-RIEGO, A. M.; LÓPEZ-MAURY, L.; FLORENCIO, F. J. Genomic responses to arsenic in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96826, 2014.
- SANGWAN, N. et al. Arsenic rich Himalayan hot spring metagenomics reveal genetically novel predator-prey genotypes. **Environmental microbiology reports**, v. 7, n. 6, p. 812-823, 2015.
- SANTINI, J. M. et al. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 92-97, 2000.
- SANTOS, K. R. S. **Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)**. 2013. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica.
- SANTOS, K. R. S. et al. Polyphasic characterization of newly isolated *Anabaenopsis* (Cyanobacteria) strains from tropical Brazil and Mexico. **Phytotaxa**, v. 367, n. 1, p. 1-12, 2018.

- SANTOS, K. R. S. ; JACINAVICIUS, F. R.; SANT'ANNA, C. L. Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. **Fottea**, v. 11, n. 1, p. 119-126, 2011.
- SANTOS, K. R. S.; SANT'ANNA, C. L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Brazilian journal of botany**, v. 33, n. 1, p. 61-83, 2010.
- SAUNDERS, J. K.; ROCAP, G. Genomic potential for arsenic efflux and methylation varies among global *Prochlorococcus* populations. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 197-209, 2016.
- SCHAGERL, M.; BURIAN, A. The ecology of African Soda Lakes: driven by variable and extreme conditions. In: **Soda Lakes of East Africa**. Springer, Cham, 2016. p. 295-320.
- SECKBACH, J.; OREN, A. Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In: **Algae and cyanobacteria in extreme environments**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 3-25.
- SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.
- SHAHEEN, R. et al. A study on arsenic decontaminating cyanobacteria of an arsenic affected soil. **J Soil Nature**, v. 1, n. 2, p. 23-29, 2007.
- SHARMA, V. K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environment International**, v. 35, n. 4, p. 743-759, 2009.
- SHEIK, C. S. et al. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e40059, 2012.
- SHIH, P. M. et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1053-1058, 2013.
- SILVA, G. M. **Diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas em lagoas salino-alcálinas do Pantanal brasileiro**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 33, n. 13, p. 1703-1711, 1998.
- SLYEMI, D.; BONNEFOY, V. How prokaryotes deal with arsenic. **Environmental microbiology reports**, v. 4, n. 6, p. 571-586, 2012.
- SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural Waters. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 517-568, 2002.
- SONG, B. et al. Molecular methods to detect and monitor dissimilatory arsenate-respiring bacteria (DARB) in sediments. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 1, p. 108-117, 2009.
- SONTHIPHAND, P. et al. Metagenomic insights into microbial diversity in a groundwater basin impacted by a variety of anthropogenic activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 26, p. 26765-26781, 2019.
- SOROKIN, D. Y. et al. *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* gen. nov. sp. nov., a deep-lineage, obligately anaerobic, dissimilatory sulfur and arsenate-reducing, haloalkaliphilic representative of the order Bacillales from soda lakes. **Extremophiles**, v. 16, n. 4, p. 597-605, 2012.
- SOROKIN, D. Y. et al. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. **Extremophiles**, v. 18, n. 5, p. 791-809, 2014.
- STAMPS, B. W. et al. Metabolic capability and phylogenetic diversity of Mono Lake during a bloom of the eukaryotic phototroph *Picocystis* sp. strain ML. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 21, 2018.
- STENGER-KOVÁCS, C. et al. Vanishing world: alkaline, saline lakes in Central Europe and their diatom assemblages. **Inland Waters**, v. 4, n. 4, p. 383-396, 2014.

- STOLZ, J. F. et al. Arsenic and selenium in microbial metabolism. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 107-130, 2006.
- STONER, J. C.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Arsenic levels in Oregon waters. **Environmental Health Perspectives**, v. 19, p. 139-143, 1977.
- TANMOY, P. et al. Arsenic bioremediation potential of arsenite-oxidizing *Micrococcus* sp. KUMAs15 isolated from contaminated soil. **Pedosphere**, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2018.
- TAWFIK, D. S.; VIOLA, R. E. Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. **Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1128-1134, 2011.
- TEBO, B. M. et al. Geomicrobiology of manganese (II) oxidation. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 421-428, 2005. BANH, A. et al. Manganese (Mn) oxidation increases intracellular Mn in *Pseudomonas putida* GB-1. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.
- TER BRAAK, C. J.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5)**. www.canoco.com, 2002.
- TISA, L. S.; ROSEN, B. P. Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 1, p. 190-194, 1990.
- TSAI, S. L.; SINGH, S.; CHEN, W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 659-667, 2009.
- TONIETTO, A.E. et al. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) exudates: chemical characterization and complexation capacity for Cu, Zn, Cd and Pb. **Water research**, v. 49, p. 381-390, 2014.
- TUFANO, K. J. et al. Reductive processes controlling arsenic retention: revealing the relative importance of iron and arsenic reduction. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 22, p. 8283-8289, 2008.
- ULUISIK, I. et al. The importance of boron in biological systems. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 45, p. 156-162, 2018.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids and Biosolids; Method 1684; EPA-821-R-01-015. 2001.
- VAN LIS, R. et al. Arsenics as bioenergetic substrates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 176-188, 2013.
- VILLARREAL-CHIU, J. F.; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 19, 2012.
- WANG, S.; ZHAO, X. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. **Journal of environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2367-2376, 2009.
- WANG, Y. et al. Vertical distribution of bacterial communities in high arsenic sediments of Hetao Plain, Inner Mongolia. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 10, p. 1890-1899, 2014.
- WARWICK, P.; INAM, E.; EVANS, N. Arsenic's interaction with humic acid. **Environmental Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 119-124, 2005.
- WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 752-764, 2006.
- WILLIAMS, W. D.; SHERWOOD, J. E. Definition and measurement of salinity in salt lakes. **International Journal of Salt Lake Research**, v. 3, n. 1, p. 53-63, 1994.
- WHO, 2008. Guidelines for Drinking-water Quality. WHO Press, Geneva.
- XU, C. et al. Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. **The Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 16-23, 1998.

- XU, T. et al. Whole genomic DNA sequencing and comparative genomic analysis of *Arthrospira platensis*: high genome plasticity and genetic diversity. **DNA Research**, v. 23, n. 4, p. 325-338, 2016.
- YAN, G. et al. Genetic mechanisms of arsenic detoxification and metabolism in bacteria. **Current genetics**, v. 65, n. 2, p. 329-338, 2019.
- YANG, H. C. et al. Pathways of arsenic uptake and efflux. In: **Current topics in membranes**. Academic Press, p. 325-358. 2012.
- YANG, H. C.; ROSEN, B. P. New mechanisms of bacterial arsenic resistance. **Biomedical journal**, v. 39, n. 1, p. 5-13, 2016.
- YANG, Y. et al. The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. **PeerJ**, v. 3, p. e943, 2015.
- YE, J. et al. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. **Trends in plant science**, v. 17, n. 3, p. 155-162, 2012.
- YE, L. et al. Dynamics of dissolved organic carbon after a cyanobacterial bloom in hypereutrophic Lake Taihu (China). **Limnologica**, v. 41, n. 4, p. 382-388, 2011.
- YIN, X. X. et al. Biotransformation and volatilization of arsenic by three photosynthetic cyanobacteria. **Plant physiology**, v. 156, n. 3, p. 1631-1638, 2011.
- ZARGAR, K. et al. Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arsenite-oxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3755-3762, 2010.
- ZARGAR, K. et al. *ArxA*, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1635-1645, 2012.
- ZHANG, J. et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.
- ZHANG, S. Y. et al. Diversity and abundance of arsenic biotransformation genes in paddy soils from southern China. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 7, p. 4138-4146, 2015.
- ZHANG, S. Y. et al. Land scale biogeography of arsenic biotransformation genes in estuarine wetland. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 2468-2482, 2017.
- ZHANG, S. Y. et al. Microbial mediated arsenic biotransformation in wetlands. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1, 2017.
- ZHANG, S.; RENSING, C.; ZHU, Y. Cyanobacteria-mediated arsenic redox dynamics is regulated by phosphate in aquatic environments. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 2, p. 994-1000, 2014.
- ZHAO, Y. et al. animalcules: Interactive Microbiome Analytics and Visualization in R. **BioRxiv**, 2020.
- ZHBANNIKOV, I. Y. et al. SeqyClean: a pipeline for high-throughput sequence data preprocessing. In: **Proceedings of the 8th ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics**. 2017. p. 407-416.
- ZHU, Y. G. et al. Earth abides arsenic biotransformations. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 42, p. 443-467, 2014.