



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Efeitos tóxicos do cobre sobre a macrófita aquática
Potamogeton pectinatus L. e sua possível utilização
no monitoramento de ambientes contaminados por
este metal.**

Marcela Brandão Costa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila De Martinez Gaspar
Martins

Rio Grande
2014



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Efeitos do Cobre na Macrófita *Potamogeton
pectinatus L.* e sua Possível Utilização o
Monitoramento ou Remediação de Ambientes
Aquáticos Contaminados por este Metal**

Aluno: Marcela Brandão costa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila De Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2014

DEDICATÓRIA

Dedico à todas as pessoas que nasceram com fissura labiopalatina. Nunca desistam dos seus sonhos e levem suas vozes a todos os lugares.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus passos, e me dar força e coragem para realização de mais uma etapa em minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Camila De Martinez Gaspar Martins, não só pela orientação, paciência, oportunidade e disposição, mas principalmente pelo exemplo de dedicação e trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ioni G. Colares, que sempre, me incentivou e me acalmou. Sem a senhora teria sido tudo mais difícil. Obrigada por compartilhar toda a sua experiência sobre macrófitas comigo.

Eu não poderia deixar de agradecer à Prof^a. Dr^a Samantha Martins, por ter me ajudado no estágio docência, sem ela eu não teria conseguido.

Ao Guilherme, ex-técnico do laboratório de Botânica pelas coletas. Aos funcionários dos prédios da Limnologia e Botânica da universidade, mas principalmente, a Kelly, que sempre nos recebe com um sorriso carinhoso. A Edna, que trabalha na limpeza do prédio pela companhia sempre agradável. E a Paula, que trabalhou na portaria da Botânica, e sempre cuidou de mim. Meninas, obrigada por tornarem os dias cansativos de experimentos em momentos mais agradáveis.

À Dani Lima e Francesca, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas da graduação, Eduarda, Tati e Gilson. A Duda, porque mesmo estando longe sempre torce por mim. A Tati, pela amizade e ajuda incansável nos últimos dias dos experimentos e o Gilson, pela ajuda nas coletas. O Vini, é muito sortudo de ter vocês como pais!

Queria agradecer também aos colegas antigos e novos que fiz no mestrado, Fábio Penna, foi massa te reencontrar, obrigada pelos cafezinhos, obrigada, Simone, Brisa e Xênya, é muito bom saber que existem pessoas como vocês, simples, sonhadoras e guerreiras.

Aos grandes amigos, Thiago, Jéssica, Cíntia Ramm e Carol Gibbon, obrigada, pelos longos dias que passamos juntos, fazendo trabalhos, coletas e estudando. Cíntia, valeu pela companhia e amizade e todo carinho de sempre. Carolzinha foi muito bom te conhecer, obrigada pela companhia também. Thiago e Jéssica, o que dizer de vocês e como explicar a importância de vocês nessa caminhada? Thiago, obrigada pelo bom humor de sempre, que sempre fez a diferença nessa trajetória. E Jéssica, minha colombiana preferida!!! Valeu por tudo hermanita

querida! Obrigada pelo carinho, amizade e companhia e por todo conhecimento que recebi ao teu lado sobre o teu país e tua cultura. *Viva la américa! ... Soy América Latina, Un pueblo sin piernas, pero que camina ...*

Ao meu companheiro Juba, pela força, apoio, dedicação, incentivo, compreensão, amor e amizade. E por toda paciência, pelos meus choros e por quando muitas vezes eu pensei em desistir e tu me deu forças para continuar.

Aos meus pais, Vera e Eduardo, pelo amor e apoio.

Às minhas irmãs, Letícia, Luciane, Taís, Silvia, e sobrinhos, pela força e apoio de sempre.

Às minhas amigas, Cauana, Fernanda, Francesca, Lucilene e Milene, com as quais dividi as angústias e expectativas durante esse período.

Aos meus gatinhos Val e Juca, por todo o companheirismo durante o desenvolvimento desta dissertação.

E a todos, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho!

RESUMO

O cobre é um metal essencial para as plantas, porém considerado tóxico quando em elevadas concentrações na água. No caso de macrófitas aquáticas já foi demonstrado que este metal inibe o processo fotossintético e provoca alterações pigmentares. Neste contexto, expusemos (96h) a macrófita aquática *Potamogeton pectinatus* (L.) à diferentes concentrações de cobre 1, 10, 100 e 1000 μM para avaliar o potencial bioacumulador da planta, e às concentrações de 1, 10 e 100 μM de Cu para verificar os possíveis efeitos do metal na taxa fotossintética (24 e 96h) em diferentes intensidades luminosas (17, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), no teor pigmentar (96h) e no crescimento das macrófitas (30 dias). Para os experimentos de bioacumulação mantivemos um grupo de plantas controle (sem adição de cobre no meio), enquanto que para os outros testes mantivemos um grupo controle e um grupo em solução nutritiva de Hoagland 100%, que contem cobre e outros micronutrientes em concentrações ideais para sobrevivência e crescimento de *P. pectinatus*. Nossos resultados mostram que a macrófita *P. pectinatus* é capaz de acumular altas concentrações de cobre, sendo que este acúmulo aumenta com a elevação dos níveis do metal na água. Apesar de basicamente não haver diferença estatística entre a concentração do metal nos diferentes órgãos da planta, as raízes mostraram-se capazes de acumular mais cobre que as folhas e caule com base no fator de bioconcentração. Com relação aos teores de clorofila “a”, “b” e carotenoides, estes foram menores nas folhas das plantas controle em comparação com as plantas em solução de Hoagland, mas esta diferença só foi significativa nas plantas expostas ao cobre, que apresentaram menor concentração dos teores pigmentares já à 1 μM de Cu. Quanto à fotossíntese, em 24h de exposição, novamente observamos um efeito negativo da ausência e presença de cobre nas concentrações de 1, 10 e 100 μM , bem como, um efeito da luminosidade, de forma que as plantas em solução de Hoagland apresentaram maior taxa fotossintética quando em 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Em virtude de um aumento na respiração em 96h, a fotossíntese, quando ocorreu, foi menor que em 24h e não diferiu entre os grupos e luminosidade. Em relação ao crescimento, as plantas perderam biomassa, mas mantiveram seus comprimentos e apenas aquelas em solução de Hoagland aumentaram seu número de folhas. Ainda, verificou-se clorose e necrose nas plantas controle e expostas ao cobre. Diante do exposto, concluímos que a macrófita *P. pectinatus* acumula altas concentrações de cobre, principalmente na raiz, sendo capaz de refletir as concentrações do metal no meio. Esta condição, sugere seu uso no biomonitoramento e fitorremediação de locais contaminados por cobre. Por outro lado, elas mostram-se sensíveis ao metal pela redução no teor pigmentar e fotossíntese, sugerindo estes como mecanismos toxicidade do cobre.

Palavras chave: metal, acumulação, fotossíntese, pigmentos.

ABSTRACT

Copper is an essential metal that can be toxic when in excess in the water. It has been shown that in aquatic macrophytes copper inhibits photosynthesis and affects its pigment levels. In this context, we exposed the aquatic macrophyte *Potamogeton pectinatus* (L.) to copper concentration of 1, 10, 100 e 1000 μM (96h) to evaluate its potential to accumulate this metal and to copper concentration of 1, 10, 100 μM to analyze the effects of copper in photosynthesis (24 e 96h) at different luminosities (17, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), pigment levels and plant growth (30 days). For the accumulation experiment, we kept plants as a control group (without copper in the medium), while for the other tests we kept a control group and plants in 100 % Hoagland nutritive solution, which contains copper and other micronutrients at essential concentration for *P. pectinatus* survival and growth. Our results show that *P. pectinatus* is able to accumulate high levels of copper and this situation enhanced with the raise of copper levels in the water. Despite no statistical difference was observed between metal concentration in the different organs, roots are more efficient in accumulate copper comparing to stems and leaves, based on bioconcentration factor. Regarding chlorophyll "a", "b" and carotenoids, these were lower in leaves form control plants in comparison to plants in Hoagland solution, but this difference was significant just in plants exposed to copper, that presented lesser levels of pigment at 1 μM de Cu. Considering photosynthesis, at 24h test we observed a negative effect of absence and presence of copper at 1, 10 and 100 μM , as well as, an effect of luminosity. In fact, plants at Hoagland solution presented the best performance of photosynthesis at 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Because of an augment of respiration at 96h of experiment, the photosynthesis at this time was lower than 24h and luminosity did not interfered in the process. Concerning plant growth, *P. pectinatus* lost weight but preserved their length and just plants in Hoagland solution increased their number of leaves. Also, clorosis and necrosis were detected in plants form control group and exposed to copper. Take into account the exposed above, we concluded that *P. pectinatus* accumulates high concentrations of copper, mainly in the roots, being able to reflect concentrations this metal in the environment. This condition suggests the use of *P. pectinatus* in biomonitoring and phytoremediation of sites contaminated with copper. On the other hand, this plant is sensitive to copper because of reduction in pigment levels and photosynthesis and we suggest these alterations as mechanisms of copper toxicity.

Key-words: metal, accumulation, photosynthesis, pigments.

SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS	09
2. INTRODUÇÃO GERAL	10
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	15
5. CAPÍTULO 1	20
5.1 INTRODUÇÃO	23
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.2.1 Coleta e aclimação do material biológico	24
5.2.2 Experimento de bioacumulação	25
5.2.3 Experimento para análises de taxa de fotossíntese, teor pigmentar e crescimento	25
5.2.4 Determinação da fotossíntese	27
5.2.5 Determinação do teor pigmentar	27
5.2.6 Análise estatística	28
5.3 RESULTADOS	28
5.4 DISCUSSÃO	30
5.5 CONCLUSÃO	34
5.6 AGRADECIMENTOS	35
5.7 REFERÊNCIAS	35
5.8 LEGENDA PARA AS FIGURAS	40
6. NORMAS DA REVISTA AQUATIC BOTANY	49

1. LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.....	42
Figura 2A e 2B.....	43
Figura 3.....	44
Figura 4.....	45
Figura 5.....	46
Figura 6.....	47
Figura 7.....	48

2. INTRODUÇÃO GERAL

O processo de formação populacional e industrial, geralmente, ocorre próximo às margens de rios e lagoas, bem como, de regiões costeiras e estuarinas, levando, de forma evidente, a problemas de contaminação destes ambientes. Atividades antropogênicas como o despejo de efluentes domésticos e industriais, atividades portuárias e atividades agrícolas têm promovido um aumento considerável na concentração de poluentes no ambiente aquático e, por essa razão, vêm preocupando órgãos ambientais e órgãos relacionados à saúde pública.

Dentre os contaminantes considerados como “preocupantes” estão os metais que apesar de terem fontes naturais advindas, por exemplo, de processos de intemperismos e geoquímicos, também são lançados na água em decorrência de atividades antrópicas. Nos ambientes aquáticos, os metais podem sedimentar ou ficar suspensos na coluna d’água na forma dissolvida ou particulada (Zagatto e Bertolotti, 2006). Quando biodisponíveis, os metais podem ser incorporados pelos organismos e, a partir daí, serem distribuídos nos diferentes compartimentos dos indivíduos e nos diferentes níveis das cadeias tróficas (Baird e Cann 2011).

Geralmente, a absorção dos metais acontece a partir do contato destes com as raízes, que são consideradas como o principal órgão absorptivo das plantas. Segundo Salt e Rauser (1995), duas etapas são importantes no processo de absorção dos metais: a entrada passiva, via apoplasto (extracelular), e a entrada ativa, via simplasto (intracelular). Alguns genes envolvidos na absorção de metais têm sido caracterizados em plantas, tanto nas partes aéreas quanto nas raízes, sendo que estes codificam para proteínas envolvidas no transporte de metais através da membrana plasmática, como por exemplo, os genes da família ZIP (Iron Regulated Transporter Protein), especialmente ZIP-3, que codificam proteínas capazes de transportar zinco, cádmio, cobre e, possivelmente, manganês (Grotz et al., 1998).

Diversos metais servem como micronutrientes essenciais para as plantas e por isto a necessidade de transportadores para os absorverem, no entanto, tais mecanismos de transporte parecem não conseguir evitar a entrada destes elementos em quantidades excessivas e/ou tóxicas (Larcher, 2000) e, provavelmente, também não impedem a entrada de metais não essenciais. Os metais incorporados podem se ligar aos grupos sulfidrila das proteínas, podendo levar à alterações nas estruturas e funções proteicas; além disso, devido a capacidade inerente de alguns deles em produzir espécies ativas de oxigênio, simplesmente por serem metais de transição, podem induzir situação de estresse oxidativo nas plantas (Hall, 2002; Upadhyay e Panda, 2009). Quando absorvidos em altas concentrações, estas ações dos metais ficam exageradas e alteram o estado fisiológico normal dos organismos.

O cobre é um micronutriente essencial que participa de uma série de funções fisiológicas nos organismos (Maksymiec, 1997). Em plantas, ele participa do processo de fotossíntese, respiração mitocondrial, sinalização hormonal, etc (Raven et al., 1999), sendo crucial para o desenvolvimento normal dos vegetais. No entanto, quando em deficiência ou excesso, o cobre pode causar desordens no crescimento dos mesmos (Yruela, 2005).

Tem sido demonstrado que o cobre intervém na síntese e degradação de pigmentos como clorofilas e carotenoides (Mysliwa et al., 2004; Upadhyay e Panda, 2009), sendo que sua ação mais comum em plantas é a inibição da formação dos pigmentos fotossintéticos (Yan e Pan, 2002). O cobre pode substituir o átomo de magnésio da molécula da clorofila levando a perda da eficiência fotossintética da planta, uma vez que as clorofilas substituídas (com cobre ao invés magnésio) perdem a capacidade de absorção e transferência da energia e não mantêm a fotossíntese (Küpper et al., 1998). Neste sentido, a concentração da clorofila é um dos métodos mais utilizados na detecção da toxicidade de alguns metais em plantas (Hadad et al., 2011). Ademais, o cobre também pode causar mudanças na função e estrutura dos cloroplastos tilacóides (e Panda e Choudhury, 2005). No caso de organismos fotossintetizantes, o cloroplasto é um dos locais mais vulneráveis à toxicidade pelo excesso de metais. Por exemplo, quando em excesso, o cobre interfere no complexo de liberação de oxigênio que envolve a doação de elétrons da água para o centro de reação do fotossistema II (Mysliwa et al., 2004). No entanto, as manifestações de fitotoxicidade por metais mais fáceis de se evidenciar são: redução do crescimento, clorose e necrose das folhas e, posteriormente, sintomas típicos de senescência e abscisão (Shaw et al., 2004). Todos os efeitos mencionados até o momento, atingem diretamente a capacidade de fotossíntese da planta e, conseqüentemente, seu crescimento.

De fato, o crescimento das plantas é outro parâmetro bastante utilizado para avaliar a toxicidade dos metais (Köhl e Lösch, 2004). A inibição do crescimento pode ocorrer por desordem metabólica, como um efeito direto ou indireto dos metais sobre a taxa fotossintética das plantas, e/ou diretamente através de interações dos metais com polissacarídeos da parede celular que resultam na redução de sua plasticidade, diminuindo o tamanho das células (Seregin e Ivanov, 2001). Geralmente, o crescimento das raízes é mais afetado, possivelmente, por ser este o local de maior acúmulo de metais na maioria das espécies vegetais (Liao et al., 2000). Zaranyika e Ndapwadza, (1994) observaram a acumulação de vários metais, incluindo o cobre, nas raízes da macrófita *Eichhornia crassipes*. Low e Lee (1990) dizem que, a concentração de metais nas raízes é maior que nas folhas e que o processo de transferência destes para as partes aéreas da planta é, geralmente, lento.

O processo de biocumulação refere-se ao aumento de determinado agente químico nos organismos vivos comparado à concentração desse agente no meio ambiente e é usado como

referência no controle da contaminação da água (Oga e Camargo, 2008). As macrófitas aquáticas são reconhecidas como organismos resistentes à contaminação e que podem acumular concentrações relativamente elevadas de metais, porém a acumulação desses elementos acima de um certo limite pode levar à mudança funcional evidente ou até mesmo a morte da planta, como já mencionado anteriormente (Mikryakova, 2002). Por sua capacidade de acumular metais, as macrófitas podem indicar ou serem utilizadas para monitorar a qualidade do ambiente, além de serem úteis como bioremediadoras em tecnologias de fitorremediação (Valitutto et al., 2006). No entanto, ressaltamos aqui que esse potencial bioacumulador das macrófitas pode ter seu lado negativo, não apenas por poder causar toxicidade à planta, mas uma vez que elas servem de alimento para uma variedade de herbívoros e organismos detritívoros, ao ingerir macrófitas contaminadas, estes animais acabam incorporando, via dieta, os metais acumulados nas plantas e podem sofrer os efeitos maléficos destes compostos (Gerloff, 1975).

A capacidade das macrófitas em acumular metais tem sido utilizada em programas de monitoramento ambiental para detecção ou monitoramento da qualidade ou contaminação do ambiente, uma vez que elas podem refletir em seus órgãos as concentrações destes compostos no meio. Por exemplo, Demirezen e Askoy (2004) encontraram uma correlação de 0,79 entre as concentrações de cobre na macrófita aquática *P. pectinatus* e no sedimento e uma correlação de 0,74 entre a planta e a água, sugerindo esta macrófita como biomonitor para análise da contaminação aquática por cobre.

Ainda, existem alguns estudos de biomonitoramento que exploram o uso biomarcadores em plantas aquáticas. Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente. Existem biomarcadores moleculares, bioquímicos, celulares ou sistêmicos, sendo que alguns deles são mais específicos para determinados poluentes. Dentre os biomarcadores bioquímicos já utilizados em plantas estão análise de pigmentos e taxa fotossintética. Blankenship (2002) afirma que sendo os pigmentos, como as clorofilas, indispensáveis ao metabolismo das plantas, uma mudança em seus níveis poderia ser utilizada como biomarcador sinalizando sintomas de estresse na planta.

Por outro lado, diversos estudos têm sido realizados com plantas aquáticas no intuito de usá-las para fitorremediação de metais (Klumpp et al., 2002; Maine et al., 2004). Esta técnica foi proposta por Chaney (1983) na década de 80 e consiste em cultivar, em áreas contaminadas, plantas que acumulam elementos tóxicos em seus tecidos, tornando-os menos disponíveis no ambiente (Chaney et al., 1997; Accioly e Siqueira, 2000; Clemens et al., 2002). A técnica se fundamenta em distintas estratégias que as plantas utilizam para sobreviver em ambientes contaminados, degradando, extraindo, contendo ou imobilizando contaminantes presentes em

solos e águas (Baker e Walker, 1990). A fitorremediação tem sido considerada uma alternativa inovadora e de baixo custo quando comparada com a maioria das técnicas de tratamento já constituídas para áreas contaminadas (USEPA, 2000). Plantas utilizadas nesse processo são conhecidas como hiperacumuladoras, absorvendo quantidades incomuns de elementos, incluindo metais, em comparação com outras plantas. Entre as técnicas de fitorremediação estão: fito-acumulação ou fito-extração, fito-degradação ou fito-transformação, fito-estabilização, fito-estimulação, fito-volatilização e rizofiltração. A utilização de cada uma delas depende do grupo de contaminantes e capacidade de absorção e tolerância das plantas entre outros fatores (Susarla et al., 2002).

A capacidade de acumular metais, incluindo o cobre, e sua toxicidade, não dependem apenas da concentração de metal no meio, mas de fatores ambientais que podem alterar a biodisponibilidade dos metais e taxa de incorporação dos mesmos. A presença e quantidade de complexantes alteram a biodisponibilidade do cobre no meio e sua toxicidade está relacionada à presença destes complexantes, bem como, à presença de competidores. Em água doce, as variáveis ambientais que mais influenciam a toxicidade de um metal são: pH, quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) e dureza da água. O pH aumenta a biodisponibilidade dos metais na coluna d'água, pelo processo de competição dos íons H^+ pelos substratos aniônicos, já o COD tem alta afinidade por metal, reduzindo a disponibilidade deste. A dureza por sua vez compete com os metais pelos seus sítios de incorporação nos organismos, agindo de forma protectora (DiToro et al., 2001; Santore et al, 2001). Sprenger e McIntosh (1989) mostraram que macrófitas aquáticas que crescem em lagos mais ácidos acumulam mais teores de Pb e Al em seus tecidos, enquanto Demirezen e Askoy (2004), evidenciaram uma correlação direta entre a queda do pH e a quantidade de chumbo e cádmio acumulado na macrófitas *P. pectinatus* e *Typha angustifolia* e a queda no pH.

As macrófitas aquáticas são importantes constituintes dos sistemas aquáticos e atuam como verdadeiros filtros biológicos, o que faz com que pesquisadores queiram compreender suas funções no ambiente aquático e seus mecanismos de tolerância aos metais (Nigam et al., 1998; Di Toppi, 2007). Irgang e Gastal Jr. (1996) descreveram as macrófitas aquáticas como sendo vegetais visíveis a olho nu que tenham suas partes fotossintetizantes ativas permanente ou durante alguns meses do ano, totalmente ou parcialmente submersas em água doce ou salobra. Apesar de ocuparem o ambiente aquático, as macrófitas são taxonomicamente próximas das plantas terrestres (Vardanyan e Ingole, 2006). A longo da sua evolução, as macrófitas voltaram-se do ambiente terrestre para o aquático e por esta razão apresentam ainda várias características de vegetais terrestres, como a presença de cutícula, embora fina, e de estômatos, que na maioria das espécies, não são funcionais. Elas apresentam grande capacidade de adaptação e grande

amplitude ecológica e estão classificadas em diversos grupos: (i) emersas, (ii) flutuantes, (iii) submersas enraizadas, (iv) submersas livres e (v) enraizadas com folhas flutuantes (Esteves, 1998). Possuem um papel de destaque como produtoras primárias em ecossistemas aquáticos continentais, oferecendo habitats e áreas de crescimento e desenvolvimento para muitos outros organismos. Nos últimos anos, sua importância nos processos de avaliação de risco ambiental tem sido reconhecida devido ao seu alto poder bioacumulador (Hoffman et al., 1985).

A macrófita *Potamogeton pectinatus* (L.), família Potamogetonaceae, é uma espécie de macrófita enraizada que cresce totalmente submersa na água e que, geralmente, pronuncia suas estruturas reprodutivas acima do nível da água, é característica de regiões temperadas. A *P. pectinatus* possui folhas finas e alongadas, com ramos delgados e crescimento apical. Desenvolve-se em abundância quando as condições ambientais são favoráveis e apresenta diferentes ciclos de vida, mas as principais formas de reprodução e distribuição se dão por meio da fragmentação de rizomas ou tubérculos subterrâneos (Colares et al., 2007). Possui distribuição pelos sistemas de rios, lagoas e áreas costeiras com baixa salinidade.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar possíveis efeitos da exposição ao cobre na macrófita aquática *Potamogeton pectinatus* (L.) e avaliar sua utilização no biomonitoramento ou fitorremediação de corpos de água contaminados por este metal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade das macrófitas aquáticas submersas *P. pectinatus* em acumular cobre quando expostas agudamente (96h) ao metal;
- Analisar os efeitos do cobre sobre o teor de pigmentos (clorofila e carotenoides), taxa de fotossíntese, crescimento, clorose e necrose das macrófitas *P. pectinatus* expostas ao cobre (96h);
- Avaliar a utilização da espécie *P. pectinatus* para o biomonitoramento e/ou fitorremediação de ambientes contaminados por cobre.

4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Accioly, A.M.A., Siqueira, J.O., 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R.F., Alvarez V., V.H., Schaefer, C.E.G.R., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.1, 299-352.

Baird, C., Cann, M., 2011. Química Ambiental. 4 ed. Porto Alegre: Bookman.

Baker, A.J.M, Walker P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, In: Heavy metal tolerance in plants. (Ed.) Shaw A.J CRC Press. Evolutionary aspects. 155-177.

Blankenship, R.E., 2002. Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science Limited. Londres. 1-34.

Chaney R.L., 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr J.F., Marsh P.B., Kla J.M. (eds.): Land treatment of hazardous wastes. Noyes Data Crop, Park Ridge. 50–76.

Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 279–284.

Clemens, S., Palmgren, M. G., Kraemer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci. 7, 309–315.

Colares, I.G., Batista, T.L., Magalhães, U.A.S., Santos, L.C., Schlee, M.D.B., 2007. Efeito da temperatura e do fotoperíodo no crescimento e nas repostas fotossintéticas de *Potamogeton pectinatus* L. (Potamogetonaceae), em cultivo experimental. Estudos de Biologia. 29, 297-306.

Demirezen, D., Aksoy, A., 2004. Accumulation of heavy metals in *Typha angustifolia* (L.) and *Potamogeton pectinatus* (L.) living in Sultan Marsh (Kayseri, Turkey). Chemosphere. 56, 685-96.

Di Toppi, L.S., 2007. Different compensatory mechanisms in two metal- accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. Chemosphere. 68, 769-780.

DiToro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H., Meyer, J.S., Paquin, P.R. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem.* 20 (10), 2383–2396.

Esteves, F.A., 1998. *Fundamentos de limnologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro, Interciência.

Gerloff, G.G., 1975. *Nutritional Ecology of Nuisance Aquatic Plants*. USA EPA Ecol Res Ser, 78.

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D., 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. USA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7220-7224.

Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 366 ,(53), 1–11

Hadad, H.R., Maine, M.A., Mufarrege, M.M., Del Sastre, M.V., Di Luca, G.A., 2011. Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *J. Hazard. Mater.* 190, 1016–1022.

Hoffman, D.J., B.A., Ratther, G.A., Burton, J., Carins 1985. *Handbook of ecotoxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites*. Lewis Publisher, Florida.

Irgang, B.E., Gastal Jr. C.V.S., 1996. *Macrófitas aquáticas da planície costeira do RS*. Porto Alegre: CPG - Botânica/UFGS, 290.

Jackson, L.J., 1998. Paradigms of metal accumulation in rooted aquatic vascular plants. *Sci. Total Environ.* 219, 223–231.

Klumpp, A., Bauer, K., Frans-gerstein, C., Menezes, M., 2002. Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). *Environ. Internat.* 28, 165-171.

Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthetica Res.* 58, 123-133.

Köhl, K.I., Lösch, R., 2004. Experimental characterisation of metal tolerance. Berlin: Springer-Verlang. 434-453.

Larcher, W., 2000. Ecofisiologia Vegetal, Rima Artes e Textos. São Paulo.

Liao, M.T., Hedley, M.J., Woolley, D.J., Brooks, R.R., Nichols, M.A., 2000. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Rony) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport Plant and Soil. 221, 135-142.

Low, K.S., Lee, C.K., Tan, K.K., 1995. Biosorption of basic dyes by water hyacinth roots. Bioresource Technol. 52, 79-83.

Maine, M. A., Suñe, N. L., Lagers, S. C., 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes, Water Resour. 38, 1494-1501,

Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. Photosynthetica. 34, 321-342.

Mikryakova, T.F., 2002. Accumulation of heavy metals by macrophytes at different levels of pollution of aquatic medium. Water Resour. 292, 30-232.

Mysliwa, B., Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. Springer-verlang. 2, 147-181.

Nigam, K.D.P., Srivastava, R.K., Gupta, S.K., Vasudevan, P., 1998. A mathematical model for metal ions uptake by aquatic plants for Wastewater treatment. Environ Model Assess. 3, 249-258.

Panda, S.K.; Choudhury, I., 2005. Changes in nitrate reductase (NR) activity and oxidative stress in moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc toxicity. Braz. J. Plant Physiol., 17, 191-197.

Santore, R.C., DiToro, D.M., Paquin, P.R. Allen, H.E., Meyer, J.S., 2001, Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *daphnia*. Environ Toxicol Chem. 20 (10), 2397–2402.

Sprenger, M., McIntosh, A., 1989. Relationship between concentrations of aluminum, cadmium, lead, and zinc in water, sediments, and aquatic macrophytes in six acidic lakes. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18, 225-231.

Susarla, S.; Medina, V.F.; Mccutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. Eco. Engine. 647-658.

Oga, S., Camargo, M.M.A., 2008. Fundamentos de Toxicologia. 3^a ed, Atheneu Editora, São Paulo.

Raven, J.A., Evans, M. C., Korb, R.E., 1999. The of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂- evolving organisms. Photosynthesis Res. 60, 111-149.

Salt, D.E., Rauser, W.E., 1995. MgATP-Dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. Plant Physiol. 107, 1293-1 301.

Seregin, I.V., Ivanov, V.B., 2001. Physiological aspects of cadmium and leads toxic effects on the higher plants. Russ. J. Plant Physiol. 48, 606-630.

Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad MNV (ed). 2^a.ed. Heavy metal stress in Plants from biomolecules to ecosystems. Indian: Springer-Verlang. 85-125.

Upadhyay, R.K., Panda, S.K., 2009. Copper induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastrutural alterations in frehly grown water lettuce (*Pistia Stratiotes L.*). Comptes. Rendus. Bio. 332, 623-632.

USEPA, 2000. United States Environmental Protection Agency. Introduction to Phytoremediation. Cincinnati: National Risk Management Research Laboratory. 72.

Valitutto, R.S., Sella, S.M., Silva-Filho, E.V., Pereira, R.G., Miekeley, N., 2006. Accumulation of metals in macrophytes from water reservoirs of a power supply plant, Rio de Janeiro State, Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 102, 178-89.

Vardanyan, L.G., Ingole, B.S., 2006. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environ. Intern.* 32, 208-218.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R. M., Peakall, D.B., 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor e Francis. Londres.

Yan, H., Pan, G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere.* 49, 471-476.

Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1), 145- 156.

Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos.

Zaranyika, M., Ndapwadza, T., 1995. Uptake of Ni, Zn, Fe, Co, Cr, Pb, Cu and Cd by water hyacinth in Mukuvisi and Manyame rivers, Zimbabwe. *J. Environ. Sci. Health.* 30, 157–169.

5. CAPÍTULO 1

Efeitos do Cobre na Macrófita *Potamogeton Pectinatus L.* e sua Utilização no Monitoramento e Fitorremediação de Ambientes Aquáticos Contaminados por este Metal

(Manuscrito a ser submetido para a revista Aquatic Botany)

1 **Efeitos do Cobre na Macrófita *Potamogeton Pectinatus L.* e sua Utilização no**
2 **Monitoramento e Fitorremediação de Ambientes Aquáticos Contaminados por este Metal**

3
4
5 Costa, M.B.^a, Tavares, F.V, Colares, I.G.^{a,b}, Martins, C.M.G.^{a,b}

6 ^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade
7 Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brazil

8 ^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande /
9 RS, Brazil

10

11

12 Costa, M.B., Tec.: marcelabc@hotmail.com.br

13 Tavares, F.V., Tec.: f.valencio.tavares@gmail.com

14 Colares, I.G., PhD.: dmbioni@furg.br

15 Martins, C.M.G., PhD.: camilaos@hotmail.com

16

17

18

19 Corresponding author: Camila De Martinez Gaspar Martins
20 Universidade Federal do Rio Grande - FURG
21 Instituto de Ciências Biológicas
22 Av. Itália km 8 – Campus Carreiros
23 96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil
24 Phone: + 55 53 393-5162
25 FAX: + 55 53 3233-6848
26 E-mail: camilaos@hotmail.com

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36 **Resumo**

37
38 No presente trabalho avaliamos o potencial bioacumulador da macrófita aquática
39 *Potamogeton pectinatus* (L.) em relação ao cobre e os efeitos do metal na fotossíntese, teor
40 pigmentar e crescimento das macrófitas (30 dias). Para os experimentos de bioacumulação
41 mantivemos um grupo de plantas controle sem adição de cobre no meio, enquanto que para os
42 outros testes mantivemos um grupo controle e um grupo em solução nutritiva de Hoagland.
43 Nossos resultados mostraram que a macrófita é capaz de acumular altas concentrações de cobre.
44 Dentre os órgãos analisados, as raízes mostraram-se capazes de acumular mais cobre. O teor de
45 pigmentos foi menor nas plantas controle em comparação com as plantas em solução de
46 Hogland, mas esta diferença só foi significativa nas plantas expostas ao cobre. O melhor
47 desempenho fotossintético foi das plantas em solução nutritiva Hoagland à 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Em
48 virtude de um aumento na respiração em 96h, a fotossíntese, quando ocorreu, foi menor que em
49 24h e não diferiu entre os grupos e luminosidade. As plantas perderam biomassa, mas
50 mantiveram seus comprimentos ao longo dos 30 dias de teste e apenas aquelas em Hoagland
51 aumentaram seu número de folhas. Verificou-se clorose e necrose nas plantas controle e expostas
52 ao cobre. Com base nos resultados, concluímos que a *P. pectinatus*, por ser uma
53 hiperacumuladora de cobre, é passível de ser usada no biomonitoramento e fitorremediação de
54 locais contaminados. Por outro lado, elas são sensíveis ao cobre pela redução no teor pigmentar e
55 taxa fotossintética, sugerindo estes como mecanismos toxicidade do metal.

56
57 **Palavras chave:** metal, acumulação, fotossíntese, pigmentos.

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70

71 **5.1 Introdução**

72
73 O cobre (Cu) é um elemento essencial para as plantas e está envolvido em inúmeros
74 processos fisiológicos nestes organismos (Maksymiec, 1997), no entanto, ele pode se tornar
75 tóxico quando em deficiência ou excesso no meio (Mal, 2002). O cloroplasto, particularmente é
76 um dos locais mais vulneráveis à toxicidade do cobre, que interfere na cadeia transportadora de
77 elétrons, diminuindo as taxas de transferência eletrônica, ao ligar-se à diferentes locais do
78 fotossistema II (Maksymiec, 1997). A toxicidade do cobre ainda pode ser resultante da inibição
79 protéica por sua interação direta com grupos sulfidrilas presentes nas proteínas (Viarengo, 1985).
80 Além disso, sua propriedade redox é capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio,
81 que ao reagir com biomoléculas pode causar danos como, por exemplo, a peroxidação lipídica de
82 membrana (Teisseire e Guy, 2000; Upadhyay e Panda, 2009). Para combater as espécies ativas
83 de oxigênio, as plantas contam com um arsenal antioxidante (enzimático e não enzimático) que
84 deve ser ativado evitando uma condição de estresse oxidativo (Teisseire e Guy, 2000).

85 Outros efeitos decorrentes da presença do cobre são alterações na síntese e degradação de
86 pigmentos envolvidos no processo fotossintético (Yan e Pan, 2002; Mysliwa et al., 2004;
87 Upadhyay e Panda, 2009), com consequente clorose e necrose foliar. O cobre pode substituir o
88 átomo de magnésio da molécula da clorofila levando a perda da eficiência fotossintética da
89 planta, uma vez que as clorofilas substituídas (com cobre ao invés magnésio) perdem a
90 capacidade de absorção e transferência da energia e não mantêm a fotossíntese (Küpper et al.,
91 1998). Ao afetar a fotossíntese, seja por interagir diretamente com os complexos fotossintéticos
92 ou por interferir no teor pigmentar das plantas, o cobre acaba, consequentemente, afetando o
93 crescimento das mesmas. Geralmente, o crescimento das raízes é o mais afetado pelos metais,
94 possivelmente, por este ser o local de maior acúmulo de metais na maioria das espécies vegetais
95 (Liao et al., 2000).

96 Apesar dos efeitos danosos do cobre, muitas plantas são altamente resistentes a este
97 metal, podendo absorvê-lo e acumulá-lo em grandes quantidades. Estudos demonstram que
98 diversas espécies de macrófitas aquáticas, incluindo as do gênero *Potamogeton*, são capazes de
99 acumular metais em seus tecidos em concentrações bem superiores àquelas do ambiente (Jain et
100 al., 1989; Zayed et al., 1998; Miretzky et al., 2004; Demirezen e Askoy, 2004). Esta acumulação
101 de metais pode ser diferenciada quanto aos órgãos da planta e, muitas vezes, a concentração de
102 metais nas raízes é maior que nas folhas, provavelmente por ser a raiz o principal órgão de
103 absorção de substâncias a partir do meio ambiente (Low e Lee, 1990). Dada esta capacidade de
104 acumular metais, o uso de macrófitas aquáticas tem sido sugerido em programas de
105 monitoramento ambiental para indicar a presença ou monitorar os níveis de contaminantes

106 metálicos no ambiente (Demirezen e Askoy, 2004; Zhou et al., 2008). Dentre as macrófitas
107 candidatas ao biomonitoramento está a *Potamogeton pectinatus* L. que é uma espécie de
108 macrófita submersa enraizada, pertencente à família Potamogetonaceae, que cresce totalmente
109 submersa na água e apresenta ampla distribuição pelos sistemas de rios, lagoas e áreas costeiras
110 com baixa salinidade (Colares et al., 2007).

111 Uma outra utilidade para as macrófitas hiperacumuladoras é seu uso em processos de
112 fitorremediação de locais contaminados por metais. Esta técnica foi proposta por Chaney (1983)
113 na década de 80 e consiste em cultivar, em áreas contaminadas, plantas que acumulam elementos
114 tóxicos em seus tecidos, tornando-os menos disponíveis no ambiente (Chaney et al., 1997;
115 Accioly e Siqueira, 2000; Clemens et al., 2002). A fitorremediação tem sido considerada uma
116 alternativa inovadora e de baixo custo quando comparada com a maioria das técnicas de
117 tratamento já constituídas para áreas contaminadas (USEPA, 2000).

118 Tendo em vista o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial bioacumulador de
119 cobre na macrófita aquática *P. pectinatus* (L.), para o cobre e os possíveis efeitos deste metal
120 sobre a taxa fotossintética, teor pigmentar e crescimento da planta.

121

122 **5.2. Material e métodos**

123

124 **5.2.1 Coleta e aclimação do material biológico**

125

126 As macrófitas *Potamogeton pectinatus* utilizadas nesse estudo foram coletadas
127 manualmente na região Área de Proteção Ambiental (APA) da Lagoa Verde (32°07.923.' S e
128 52°10.858.' W), localizada às margens da ERS-734 no sul do Brasil (Rio Grande, RS) As plantas
129 foram medidas, (aproximadamente 15 cm de comprimento da ponta do caule à ponta da raiz),
130 lavadas em água da torneira, depois em água destilada e movidas para incubadora DBO onde
131 foram aclimatadas por 15 dias em aquários de vidro contendo água doce de clorada enriquecida
132 com solução de Hoagland (Hoagland e Arnold, 1950) na proporção de 10 plantas para 1 L de
133 meio. A solução de Hoagland é uma solução nutritiva que contém micronutrientes nas
134 concentrações essenciais para a planta. No período de aclimação, o meio foi renovado a cada
135 três dias para reposição dos nutrientes. O fotoperíodo e temperatura de aclimação foram
136 mantidos em 12 horas de luz e 12 horas de escuro e 23°C, respectivamente. A intensidade
137 luminosa média foi de $114,33 \pm 4,70 \mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$, medida com um sensor de radiação Li-Cor
138 Radiation Sensor LI-1400 Datalogger.

139

140

141 **5.2.2 Experimento de bioacumulação**

142
143 Após aclimação por 15 dias, as plantas *P. pectinatus* foram novamente lavadas em água
144 destilada, medidas ($15,84 \pm 0,72$ cm da ponta do caule à ponta da raiz) e, então, colocadas ($n=5$)
145 em béquers de 1 L, contendo 500 ml de água doce dechlorada com cobre nas seguintes
146 concentrações: 1, 100 e 1000 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde ficaram expostas por 96h. Um grupo
147 controle ($n=5$) foi mantido em água doce dechlorada sem adição de cobre, durante todo o
148 experimento. O experimento foi mantido em incubadora DBO, nas mesmas condições de
149 fotoperíodo, temperatura e luminosidade do período de aclimação. O cobre foi adicionado ao
150 meio (água dechlorada) 24h antes do experimento para pré-equilibrar com o mesmo e o meio foi
151 renovado a cada 24h ao longo de todo o teste. Antes da introdução das plantas e após 24h de
152 teste, uma alíquota de água (10 ml) foi retirada de cada tratamento, incluindo controle, para
153 análise de cobre total, enquanto outra alíquota (10 ml) foi retirada e filtrada ($0,45 \mu\text{M}$) para
154 análise de cobre dissolvido. As amostras de água foram acidificadas (1 % HNO_3) e armazenadas
155 para posterior análise do cobre. Após as 96h de exposição, as plantas foram lavadas em solução
156 de EDTA (12 mM), para remoção do metal adsorvido, e separadas em folhas, caules e raízes. Os
157 órgãos foram individualmente pesados (peso úmido) e colocados em estufa por 4 dias à 60°C
158 para secagem, quando foram novamente pesados (peso seco). Os órgãos secos foram digeridos
159 em HNO_3 (65% - Merck ultra puro) também pelo período de 4 dias e diluídos em água MiliQ
160 para análise de cobre. As amostras tanto de água quanto biológicas foram analisadas em relação
161 ao conteúdo de cobre por espectrofotometria de absorção atômica – modo chama (Avanta 932
162 Plus – GBC, Hampshire, II USA). A quantidade de cobre nas amostras biológicas foi relativizada
163 por grama de massa fresca dos respectivos órgãos.

164 Para verificar se as macrófitas acumularam cobre foi calculado o fator de
165 bioconcentração, expresso pela relação entre a concentração de cobre nos órgãos das macrófitas
166 e a concentração de cobre na água.

167

168 **5.2.3 Experimentos para análises de taxa fotossintética, teor pigmentar e crescimento**

169
170 Para os experimentos de análise de fotossíntese, do teor pigmentar e crescimento, as
171 macrófitas *P. pectinatus* foram medidas da ponta do caule à ponta da raiz e pesadas ($10,83 \pm$
172 $0,040$ cm e $0,71 \pm 0,003$ g de massa fresca); depois foram expostas ao cobre nas concentrações
173 de 1, 10, 100 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em béquers na proporção de 10 plantas para 1 L de água ($n = 10$
174 plantas para as análises de teor pigmentar, $n = 10$ crescimento e $n = 15$ plantas para a
175 fotossíntese). O cobre foi adicionado ao meio nutritivo de Hoagland sem cobre. Ainda, dois tipos

176 de grupos controles foram mantidos ao longo dos testes: um grupo de plantas ficou em solução
177 de Hoagland sem adição de cobre e um grupo em solução nutritiva de Hoagland 100 %, ou seja,
178 com cobre e nas concentrações ideais para sobrevivência e crescimento de *P. pectinatus*. O
179 primeiro grupo denominamos controle e o segundo chamamos de Hoagland. As respostas
180 fotossintéticas foram medidas após 24 e 96h de exposição ao cobre em diferentes condições de
181 iluminação: escuro, 17, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A concentração dos pigmentos carotenoides e
182 clorofila “a” e “b” foi medida após 96h de teste, enquanto que as análises de crescimento foram
183 feitas no decorrer do período de 30 dias. Para cada análise foi conduzido um experimento
184 separado, mas todos em incubadoras DBO, nas mesmas condições de fotoperíodo, temperatura e
185 luminosidade do período de aclimatação. Da mesma forma que para o experimento de
186 bioacumulação, o cobre foi adicionado ao meio 24h antes do início de cada experimento para
187 pré-equilibrar com o mesmo. O meio foi renovado a cada 24h ao longo de todos os testes. Antes
188 da introdução das plantas e após 24h de teste, uma amostra de água (10 ml) foi retirada de cada
189 tratamento, incluindo controle e Hoagland, para análise de cobre total, enquanto outra amostra
190 (10 ml) foi retirada e filtrada (0,45 μM) para análise de cobre dissolvido. Para os testes de
191 fotossíntese e teor pigmentar, as amostras de água foram coletadas diariamente, enquanto que
192 para o experimento de crescimento (30 dias), apesar da renovação diária de água, amostramos o
193 meio nos tempos 0 e 24h apenas no primeiro, sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e
194 trigésimo dia de teste. As amostras de água foram acidificadas (1 % HNO_3) e armazenadas para
195 posterior análise do cobre por espectrofotometria de absorção atômica – modo chama (Avanta
196 932 Plus – GBC, Hampshire, II USA).

197 Para o crescimento consideramos os seguintes parâmetros: biomassa, comprimento
198 longitudinal da extremidade da raiz à extremidade do caule e número de folhas. As plantas
199 tiveram sua biometria registrada (massa fresca, comprimento longitudinal e número de folhas) no
200 início do teste e aos 10, 20 e 30 dias de exposição ao cobre. As macrófitas foram devidamente
201 identificadas com barbantes coloridos amarrados em seus caules para que não houvesse troca de
202 espécimens no momento das análises. Os dados de crescimento com base na biomassa foram
203 expressos considerando-se a variação de crescimento relativizado pelo tempo total de exposição
204 em dias

205 Após 30 dias de teste identificamos o percentual de plantas que apresentavam clorose
206 e/ou necrose foliar. A condição de clorose foi identificada como pontos de coloração amarelada
207 nas folhas e a condição de necrose como pontos de coloração marrom.

208
209
210

211 **5.2.4 Resposta fotossintética**

212
213 A taxa de fotossíntese foi determinada nas macrófitas, após o período de exposição
214 aguda ao cobre (24 e 96h) em diferentes intensidades de iluminação (escuro, 17, 100, 300 e 500
215 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), através da técnica de evolução do oxigênio dissolvido. (2007). Para cada tratamento
216 (controle, Hoagland, 1, 10 e 100 μM de Cu) usamos 15 plantas, sendo estas distribuídas nas
217 diferentes intensidades luminosas, incluindo o escuro. Para efeitos de padronização foram
218 utilizadas apenas as folhas da região apical dos rizomas. Os experimentos foram realizados em
219 garrafas de DBO de 300 ml, preenchidas com água doce dechlorada. As garrafas foram mantidas
220 submersas em uma câmara de incubação com água circulante na temperatura de 20°C por duas
221 horas, e as garrafas foram dispostas e cobertas com filtros conforme às diferentes intensidades
222 luminosas (17, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) medidas com um sensor de radiação Li-Cor Radiation
223 Sensor LI-1400 Datalogger. Leituras da concentração de oxigênio dissolvido foram realizadas
224 antes e logo após a incubação utilizando um oxímetro (Digimed DMO-2). Após as medidas das
225 taxas fotossintéticas, as macrófitas expostas ao cobre por 24 e 96h foram secas por 4 dias à 60°C
226 e pesadas para obtenção do peso seco. As medidas de fotossíntese líquida com base nos valores
227 de evolução do oxigênio foram determinadas utilizando as equações de Strickland e Parsons
228 (1972).

229

230 **5.2.5 Determinação do teor de pigmentos**

231
232 As medidas de clorofila e carotenoides foram analisadas nas macrófitas controles, em
233 solução de Hoagland e expostas à 1, 10 e 100 μM de Cu por 96h, de acordo Lichtenthaler
234 (1987). Para tanto, folhas de *P. pectinatus* foram pesadas. Cerca de 0,5 g de massa fresca desse
235 material foi macerado em 7 mL de acetona 80% e filtrado utilizando um funil forrado com papel
236 filtro umedecido em 2 mL de acetona 80%. Seguindo a filtração do macerado, o resíduo que
237 ficou no papel filtro foi lavado com 4mL de acetona 80% e o volume do filtrado foi completado
238 para 20 mL com acetona 80%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com três
239 comprimentos de onda distintos: 470 nm (carotenoides), 663 nm (clorofila a) e 647 nm (clorofila
240 b).

241

242

243

244

245

246 **5.2.6 Análise estatística**

247
248 Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As diferenças entre os tratamentos
249 para a análises de bioacumulação, taxa fotossintética, teor pigmentar e crescimento foram
250 analisadas por ANOVA-*one way*. Quando houve diferença estatística aplicou-se o teste *a*
251 *posteriori* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($\alpha = 0,05$). A homogeneidade e
252 homocedasticidade das amostras foram previamente testadas antes da aplicação dos testes
253 estatísticos.

254

255 **5.3 Resultados**

256

257 A concentração de cobre nas folhas, caules e raízes das macrófitas *P. pectinatus* é
258 apresentada na Figura 1. Podemos observar que o cobre foi detectado em todos os órgãos e em todas
259 as concentrações testadas, incluindo o controle. De maneira geral, a concentração de cobre nos
260 tecidos aumentou com o aumento dos níveis de cobre no meio, mostrando que as macrófitas são
261 capazes de bioconcentrar o metal. Os fatores de bioconcentração nas folhas, caules e raízes,
262 respectivamente, foram: 258, 90 \pm 20,76, 190,87 \pm 10,92 e 988,44 \pm 406,31 para as macrófitas
263 expostas à concentração de 10 μ M de Cu; 112,55 \pm 9,38, 172,03 \pm 68,43 e 226,38 \pm 43,70 para
264 as expostas à 100 μ M de Cu; e 2086,21 \pm 419, 2791,802 \pm 213,00; e 3931,77 \pm 774,012 para as
265 submetidas à 1000 μ M de Cu. Assim, apesar de a Figura 1 mostrar que praticamente não houve
266 diferença na concentração de cobre entre os diferentes órgãos, os fatores de bioconcentrações
267 calculados com base na relação entre o conteúdo de metal nos órgãos e na água, mostrou que as
268 raízes são capazes de acumular mais metais que as folhas e caule. De fato, uma diferença na
269 concentração organogênica de cobre foi observada apenas nas plantas expostas à 10 μ M, que
270 apresentaram maiores níveis do metal nas suas raízes e folhas em relação aos seus caules. O fator
271 de bioconcentração foi calculado apenas para as concentrações de 10, 100 e 1000 μ M de Cu
272 porque só conseguimos detectar o cobre na água nestes tratamentos devido ao baixo limite de
273 detecção do equipamento (Espectrofotômetro de absorção atômica – modo chama: Avanta 932 Plus
274 – GBC, Hampshire, Il USA). A quantidade de cobre total e dissolvido na água não variou entre 0
275 e 24h de teste, sendo que os valores médios para as concentrações de 10, 100 e 1000 μ M de Cu
276 foram de 15,19 \pm 1,34, 101,80 \pm 3,02 e 1104, 20 \pm 83,3 μ M de Cu total e 16,59 \pm 1,53, 142,87 \pm
277 7,32 e 966,56 \pm 62,28 μ M de Cu dissolvido, respectivamente. É importante ressaltar, que estes
278 valores de cobre no meio são uma média dos valores encontrados no experimento de
279 bioacumulação e nos experimentos para avaliação dos efeitos do metal, onde medimos

280 basicamente a taxa fotossintética, teor pigmentar e crescimento, cujos resultados estão descritos
281 a seguir.

282 As respostas fotossintéticas das plantas em 24h e 96h de experimento são mostradas nas
283 Figuras 2A e 2B, respectivamente. Na Figura 2A, observamos tanto um efeito do cobre (presença
284 e ausência) quanto da intensidade luminosa sobre a taxa de fotossíntese das plantas, sendo
285 que as plantas imersas em solução de Hoagland apresentaram maior taxa fotossintética, seguidas
286 das plantas do grupo controle e depois das plantas expostas à 1 μM do metal. As macrófitas
287 expostas à 10 e 100 μM de Cu não realizaram resposta fotossintética neste tempo experimental
288 (24h). Na Figura 2A, também notamos que a melhor intensidade luminosa para a fotossíntese da
289 *P. pectinatus* é a de 100 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$, enquanto que nas outras intensidades testadas (17, 300 e
290 500 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$) o processo é reduzido. Em 96h (Figura 2B), as plantas que realizaram
291 fotossíntese foram as do grupo controle, submersas em solução de Hoagland e expostas à 100
292 μM de Cu. Podemos observar que a taxa fotossintética não diferiu entre os grupos, exceto para a
293 intensidade de 300 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$, quando as plantas expostas à 100 μM de Cu tiveram um
294 desempenho reduzido em relação às demais. Notamos ainda que as plantas controle mantiveram
295 uma taxa de fotossíntese bem semelhante àquela apresentada em 24h, mas as plantas em
296 Hoagland tiveram sua fotossíntese reduzida em aproximadamente duas vezes. Não houve efeito
297 da intensidade luminosa sobre a taxa de fotossíntese às 96h de experimento. A redução da
298 fotossíntese em 96h coincide com um aumento na respiração das plantas neste tempo, com
299 mostra a Figura 3.

300 A Figura 4 exibe a concentração dos pigmentos (clorofila “a”, clorofila “b” e
301 carotenoides) ao final do experimento (96h). Diferentemente da fotossíntese, medimos o teor dos
302 pigmentos somente às 96h por ser este um parâmetro que depende de síntese e degradação,
303 processos que são mais demorados que a fotossíntese que é uma medida fisiológica imediata.
304 Podemos verificar que o teor pigmentar da planta está diretamente relacionado ao meio em que
305 ela está. As maiores concentrações pigmentares foram detectadas nas *P. pectinatus* em solução
306 nutritiva de Hoagland, que contém cobre nas concentrações ideais para a sobrevivência desta
307 espécie. Já, na ausência total do metal (controle), houve uma redução (não significativa) nos
308 níveis de clorofila “a”, clorofila “b” e carotenoides, mas essa redução foi significativa apenas nas
309 plantas expostas ao cobre (1, 10 e 100 μM Cu). Para clorofila “a” e carotenoides a redução no
310 teor pigmentar foi diretamente proporcional às concentrações de exposição ao metal.

311 A taxa de crescimento mostrada na Figura 5 foi calculada com base na biomassa das
312 plantas, considerando-se a variação de crescimento relativizado pelo tempo total de exposição
313 em dias. Exceto para as macrófitas tratadas com de 10 μM Cu, este experimento teve duração de
314 30 dias, pois as mesmas morreram em 10 dias de teste. Todas as macrófitas tiveram sua taxa de

315 crescimento reduzida, sendo esta redução maior nas plantas expostas à 10 μM Cu (Figura 5). Em
316 relação ao crescimento com base no tamanho da planta, também apenas as *P. pectinatus* expostas
317 à 10 μM Cu tiveram seu comprimento reduzido, as outras permaneceram do mesmo tamanho ao
318 longo do teste, inclusive aquelas que começaram maiores continuaram maiores e vice-versa
319 (Figura 6). Por outro lado, o número de folhas aumentou significativamente para as plantas
320 imersas em solução nutritiva de Hoagland, enquanto que para as controles e expostas à 1 μM de
321 Cu, este número não variou estatisticamente (Figura 7). O número de folhas aumentado nas
322 plantas em solução nutritiva de Hoagland não se refletiu na sua taxa de crescimento, que
323 diminuiu com base na massa fresca, e nem no seu comprimento, que não se alterou. Novamente,
324 na concentração de 10 μM de Cu houve um déficit e as plantas perderam folhas.

325 Quanto à presença de clorose e necrose, observamos que ao final do experimento (30 dias
326 para as plantas controle, em solução de Hoagland e expostas à 1 e 100 μM , e 10 dias para as
327 plantas expostas à 10 μM) 50 % das plantas controles apresentavam clorose e 20 % necrose,
328 enquanto que nenhuma planta em solução de Hoagland apresentou estes sintomas. Na
329 concentração de 1 μM de Cu 100 % das plantas apresentavam clorose e 20 % necrose e nas
330 concentrações de 10 e 100 μM de Cu 100 % das macrófitas apresentaram ambos os sintomas. O
331 grau de clorose ou necrose não foi quantificado, apenas ausência e presença.

332

333 **5.4 Discussão**

334

335 A capacidade das macrófitas aquáticas *P. pectinatus* em acumular cobre foi medida no
336 primeiro experimento deste estudo, quando as plantas foram expostas à diferentes concentrações
337 de cobre e, depois, analisadas quanto à presença e concentração do metal em seus órgãos.
338 Verificamos que todas as plantas possuíam cobre nas raízes, caules e folhas o que se deve ao fato
339 de o cobre ser um micronutriente essencial para estes vegetais. Ainda, constatamos que a partir
340 da concentração de 1 μM de Cu, as plantas passaram efetivamente a acumular o metal em seus
341 tecidos, sendo que esta acumulação não saturou até a maior concentração testada que foi de 1000
342 μM de Cu. De fato, quando expostas à 1000 μM de Cu (63,5 mg/L de Cu) por 96h, as plantas
343 acumularam cerca de 3,5 mg de Cu/g de massa fresca em suas raízes e aproximadamente 2 mg
344 de Cu/g de massa fresca em seus caules e folhas. A capacidade que a *P. pectinatus* tem de
345 acumular cobre é maior do que outras plantas aquáticas submersas como o caso da *Ceratophyllum*
346 *demersum* (Devi e Prasad, 1998), que acumula 315 μg de Cu/g de peso seco quando exposta à
347 250 $\mu\text{g/L}$ de Cu e *Myriophyllum aquaticum* que concentra 156 μg de Cu/g de peso seco nas suas
348 folhas quando em local com altas concentrações de cobre no sedimento (36 $\mu\text{g/g}$) (Cardwell et
349 al., 2002). O enriquecimento de *P. pectinatus* com cobre é similar ao de *Nelumbo nucifera*

350 (Mishra, 2009), *Hydrila verticillata* (Xue et al., 2010) e outras plantas do gênero *Potamogeton*
351 como *Potamogeton malaiianus* (Miq.) (Peng et al., 2008) e *Potamogetum natans* (Fritioff e
352 Greger, 2006). Estudos com *N. nucifera* mostram que esta macrófita é capaz de acumular altas
353 concentrações de cádmio e cobre ao longo de 7 dias de exposição aos metais, sendo que no caso
354 do cobre não se observa saturação até a concentração de 10 mg/L (máxima concentração testada
355 no estudo) (Mishra, 2009). Observou-se ainda, que na concentração de 10 mg/L de Cu, a *N.*
356 *nucifera* acumula 2,42 mg de Cu/g de massa seca (Mishra, 2009); valor aproximadamente 3x
357 vezes menor do que a concentração que encontramos para *P. pectinatus* expostas à 1000 µM ou
358 63,5 mg de Cu/L, relativizada pela massa fresca. Cabe salientar, que o fato de termos
359 relativizado a concentração de cobre nos tecidos por grama de peso úmido, subestima os valores
360 do metal nos órgãos, simplesmente pelo fato de o peso úmido deste cerca de 10 vezes maior do
361 que o peso seco (dados não publicados). Na mesma linha, Xue et al., (2010) verificaram que as
362 macrófitas *H. verticillata* têm capacidade de incorporar e acumular altas concentrações de cobre,
363 principalmente em suas folhas e caule, chegando à 1 mg de Cu/g de peso seco quando expostas
364 por 96h à 5 mg/L do metal. Denga et al. (2004), analisando o potencial bioacumulador de 12
365 diferentes espécies de macrófitas aquáticas para os metais cobre, zinco, cádmio e chumbo
366 concluem que a acumulação de metais por estas plantas varia entre espécies, populações e
367 tecidos. Neste sentido, apesar de não termos observado diferença estatística entre a concentração
368 de cobre nos órgãos (raiz, caule e folhas), exceto para a concentração de 10 µM de Cu; quando
369 levamos em consideração o fator de bioconcentração, vemos que as raízes são as principais
370 concentradoras do metal.

371 Estudos anteriores sobre a acumulação de vários íons metálicos por plantas aquáticas,
372 incluindo as do gênero *Potamogeton*, demonstram que o acúmulo da maioria dos metais é maior
373 nas raízes do que em outras partes das plantas (Cardwell et al., 2002; Demirezen e Askoy, 2004;
374 Fritioff e Greger, 2006; Yabanli et al., 2014). No entanto, Guilizzoni (1991) relata que a
375 absorção de metais pelas folhas de macrófitas submersas torna-se especialmente maior quando as
376 concentrações do metal no ambiente são elevadas, o que pode explicar as altas concentrações de
377 cobre nas folhas e caules de *P. pectinatus*, além das raízes. Fritioff e Greger (2006) verificaram
378 que a macrófita *P. natans* é capaz de incorporar metais tanto pelas folhas, quanto pelos caules e
379 raízes, com maior acúmulo encontrado nas raízes; observaram ainda que em condições de
380 ambientes com elevadas concentrações de metais no meio, a incorporação de cobre pelas raízes,
381 acaba sendo limitada pela competição com outros metais. Segundo Xue et al., (2010), existe uma
382 translocação de cobre nas plantas, tanto do ápice para a base da planta (sugerindo que a
383 translocação decrescente de cobre possa ocorrer através do floema) como da base para o ápice
384 (sugerindo que a translocação ascendente de cobre ocorra através do xilema).

385 O acúmulo de metais não depende apenas da concentração do metal no meio, mas de
386 fatores ambientais que podem alterar sua biodisponibilidade e taxa de incorporação. A presença
387 e quantidade de complexantes alteram a biodisponibilidade do cobre no meio e sua toxicidade
388 está relacionada à presença destes complexantes, bem como, à presença de competidores. Em
389 água doce, as variáveis ambientais que mais influenciam a toxicidade de um metal são: pH,
390 quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) e dureza da água. O pH aumenta a
391 biodisponibilidade dos metais na coluna d'água, pelo processo de competição dos íons H^+ pelos
392 substratos aniônicos, já o COD tem alta afinidade por metal, reduzindo a disponibilidade deste.
393 A dureza por sua vez compete com os metais pelos seus sítios de incorporação no organismo,
394 agindo de forma protectora (DiToro et al., 2001; Santore et al, 2001). Sprenger e McIntosh
395 (1989) mostraram que macrófitas aquáticas que crescem em lagos mais ácidos acumulam mais
396 metais (Pb e Al no caso do estudo) em seus tecidos. Demirezen e Askoy (2004) evidenciaram
397 uma correlação direta entre a quantidade de chumbo e cádmio acumulados nas macrófitas *P.*
398 *pectinatus* e *Typha angustifolia* e a queda no pH.

399 A capacidade das macrófitas em acumular metais tem sido utilizada em programas de
400 monitoramento ambiental para detecção e monitoramento da qualidade do ambiente
401 contaminado por metais. Isto, porque elas podem refletir em seus órgãos as concentrações destes
402 compostos no meio. Por exemplo, Demirezen e Askoy (2004) encontraram uma correlação de
403 0,79 entre as concentrações de cobre na macrófita aquática *P. pectinatus* e no sedimento e uma
404 correlação de 0,74 entre a planta e a água, sugerindo esta macrófita como um bom biomonitor
405 para análise da contaminação aquática por cobre. Outro exemplo utilizando *P. pectinatus* é o
406 estudo realizado por Peng et al. (2008) que verificou correlações positivas entre as concentrações
407 de zinco, cobre e manganês na água e nas folhas de *P. pectinatus* e *P. malaianus*, indicando o
408 uso de ambas as espécies para monitorar estes metais no meio.

409 De acordo com Demirezen e Askoy (2004), dentre as macrófitas do gênero *Potamogeton*,
410 apenas a *P. pectinatus* tolera condições ambientais mais extremas como alta salinidade e
411 alcalinidade, porém não se mantém bem em ambientes com baixo pH e pobre em nutrientes. Esta
412 espécie é bastante tolerante a ambientes aquáticos eutrofizados e pode ser a única espécie de
413 macrófita presente em ambientes altamente poluídos. Entretanto, nossos dados mostram uma
414 sensibilidade relativamente alta da *P. pectinatus* ao cobre, mesmo em concentrações
415 ambientalmente relevantes, como é o caso de 1 μM de Cu. Como visto nas Figuras 2A, na
416 ausência e presença do cobre em concentrações acima das necessárias para a macrófita, houve
417 inibição da fotossíntese, sendo que apenas na concentração de 1 μM de Cu o processo foi
418 detectado. Além disso, outro fator que influencia a fotossíntese é a luminosidade. De fato, a
419 melhor intensidade luminosa para *P. pectinatus* é próxima a 100 $\mu mol/m^2/s$ (Colares et al., 2007),

420 enquanto que as outras intensidades testadas acabam por inibir o processo, sendo que a de 500
421 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ foi a que pode ter causado fotoinibição, pois além de inibir a fotossíntese, intensificou o
422 efeito do cobre, de modo que nenhuma planta exposta ao metal realizou fotossíntese nesta
423 intensidade luminosa. O cobre, quando internalizado pode se ligar à proteínas que são
424 responsáveis pelo transporte de elétrons no fotossistema II (Arellano et al., 1995), inibindo a
425 fotossíntese e, conseqüentemente, a produção de energia pelas plantas. A fotoinibição pode se
426 refletir em déficit na síntese de substâncias e biomassa, o que afeta o crescimento da planta
427 (Maksymiec, 1997). Em 96h de teste (Figura 2B), as plantas que estavam em solução de Hoagland
428 reduziram sua fotossíntese em decorrência de um aumento na taxa respiratória (Figura 3)
429 observada em quase todos os tratamentos. Este aumento na respiração das plantas, pode estar
430 associado à uma condição de estresse devido à manipulação pela troca diária do meio, por
431 exemplo. Também em 96h horas, as macrófitas expostas à 100 μM de Cu parecem ter se
432 recuperado do estresse inicial e conseguiram realizar fotossíntese, enquanto que as plantas
433 expostas a 1 μM de Cu, que realizaram fotossíntese em 24h de teste, tiveram o processo
434 totalmente inibido. Talvez, concentrações mais elevadas de metais no meio ativem um sistema
435 de reparo nas plantas para que estas aumentem sua tolerância e consigam sobreviver em
436 ambientes mais poluídos.

437 Quanto aos pigmentos, vimos na Figura 4 uma diminuição na concentração de
438 carotenoides, clorofilas “a” e “b” nas *P. pectinatus* expostas ao cobre, indicando um efeito tóxico
439 deste metal e, inclusive para carotenoides e clorofila “a”, o efeito foi dose-dependente, uma vez
440 que aumentou conforme elevou-se os níveis de cobre na água. A ausência do metal também
441 parece ser negativa, indicando a essencialidade do cobre, no entanto, os níveis mais baixos de
442 pigmento nas plantas do grupo controle em relação às macrófitas do grupo Hoagland não diferiu
443 estatisticamente. Um dos mecanismos do cobre que afeta a concentração pigmentar da planta é
444 que o cobre pode substituir o átomo de magnésio da molécula da clorofila, danificando a
445 molécula (Küpper et al., 1998). Outros trabalhos também relatam alterações na produção de
446 pigmentos fotossintéticos em plantas aquáticas expostas à metais pesados (Pietrini et al., 2003;.
447 Hou et al., 2007; Sivaci et al., 2008). O fato da redução da clorofila “a” ter sido dose-dependente
448 e da clorofila “b” ocorrer já na menor concentração de 1 μM de Cu e não variar para as outras,
449 pode ser devido a uma relação de degradação mais rápida de clorofila “a” em comparação com
450 clorofila “b” quando as plantas estão sob estresse (Manios, 2003).

451 Outro efeito do cobre que afeta indiretamente a fotossíntese e o teor pigmentar é sua
452 propriedade redox capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, que ao reagir com
453 biomoléculas pode causar danos como, por exemplo, a peroxidação lipídica de membrana
454 (Teisseire e Guy, 2000; Upadhyay e Panda, 2009). Para combater as espécies ativas de oxigênio,

455 as plantas contam com um arsenal antioxidante (enzimático e não enzimático) que deve ser
456 ativado evitando uma situação de estresse oxidativo (Teisseire e Guy, 2000).

457 De qualquer forma, ao afetar a fotossíntese, seja por interagir diretamente com os
458 complexos fotossintéticos ou por interferir no teor pigmentar das plantas, o cobre acaba,
459 consequentemente, afetando o crescimento das mesmas. Geralmente, o crescimento das raízes é
460 o mais afetado pelos metais, possivelmente, por este ser o local de maior acúmulo de metais na
461 maioria das espécies vegetais (Liao et al., 2000). Desta forma, nosso trabalho mostrou uma perda
462 de biomassa em todos os tratamentos, sem variação no tamanho. No entanto, a biomassa foi
463 calculada com base na massa fresca, o que pode estar mascarando este resultado, uma vez que
464 temos que considerar a variação no teor de água das plantas. A concentração de 10 µM de Cu
465 parece ser muito crítica para *P. pectinatus*, pois as plantas submetidas a este tratamento
466 morreram aos 10 dias de teste nas duas vezes que o experimento foi repetido, mas antes disso
467 apresentaram maior queda de biomassa, redução de tamanho e queda foliar. Um efeito negativo
468 do cobre sobre o crescimento de outras macrófitas tem sido relatado por outros autores. Mal
469 (2002) observou redução no crescimento de *Elodea canadenses* expostas ao cobre, enquanto Xue
470 et al., (2010) verificaram uma queda no crescimento de *H. verticillata* a partir da exposição à 10
471 µg/L de Cu, sendo este crescimento próximo a zero em 1000 µg/L do metal. A presença de
472 clorose e necrose observada neste estudo é outro indicativo de senescência precoce das plantas e
473 tais efeitos foram claramente evidenciados após exposição ao metal.

474 Por fim, vale lembrar que as plantas utilizadas neste estudo são plantas jovens e, portanto,
475 o efeito negativo do cobre sobre as mesmas pode afetar sua colonização e estabelecimento no
476 meio ambiente.

477 478 **5.5 Conclusões**

479
480 Com base no exposto, podemos concluir que a *P. pectinatus* é uma macrófita
481 hiperacumuladora de cobre, tendo a raiz como principal órgão bioconcentrador do metal, e, por
482 este motivo, seu uso pode ser indicado tanto para programas de monitoramento ambiental como
483 em metodologias de fitorremediação. Por outro lado, se o objetivo é pensar no estado de saúde
484 da *P. pectinatus*, é importante lembrar que o cobre, inclusive em concentrações ambientalmente
485 relevantes, afeta a fotossíntese e o teor pigmentar desta espécie, podendo influenciar na sua
486 abundância e distribuição e levar à alterações ecológicas.

487
488
489

490 **5.6 Agradecimentos**

491

492 Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA) pelo
493 suporte financeiro. À CAPES pela bolsa concedida à Marcela Brandão Costa.

494

495 **5.7 Referências**

496

497 Accioly, A.M.A., Siqueira, J.O., 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. In:
498 Novais, R.F., Alvarez, V., V.H., Schaefer, C.E.G.R., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa,
499 Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.1, 299-352.

500

501 Arellano, J.B., Lazaro, J.J., Lopez-Gorge, J., Baron, M., 1995. The donor side of Photosystem II
502 as the copper-inhibitory binding site. *Photosynthetic Research*. 50, 698-701.

503

504 Cardwell, A.J., Hawker, D.W., Greenway, M., 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes
505 from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere*. 48, 653–663.

506

507 Chaney R.L., 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr J.F., Marsh P.B., Kla
508 J.M. (eds.): Land treatment of hazardous wastes. Noyes Data Crop, Park Ridge. 50–76.

509

510 Chaney R. L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Angle J.S., Baker A.J.M., 1997.
511 Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol*. 8, 279–284.

512

513 Clemens S., Palmgren M. G., Kraemer U., 2002. A long way ahead: understanding and
514 engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*. 7, 309–315.

515

516 Colares, I.G., Batista, T.L., Magalhães, U.A.S., Santos, L.C., Schlee, M.D.B., 2007. Efeito da
517 temperatura e do fotoperíodo no crescimento e nas repostas fotossintéticas de *Potamogeton*
518 *pectinatus* L. (Potamogetonaceae), em cultivo experimental. *Estudos de Biologia*. 29, 297-306.

519

520 Demirezen, D., Aksoy, A., 2004. Accumulation of heavy metals in *Typha angustifolia* (L.) and
521 *Potamogeton pectinatus* (L.) living in Sultan Marsh (Kayseri, Turkey). *Chemosphere*. 56, 685-
522 96.

523

524 Denga, H., Yea, Z.H., Wong, M.H., 2004, Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by
525 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China
526 Environ. Pollut. 132, 29-40
527

528 Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a
529 free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci. 138, 157–
530 165.
531

532 Fritioff, A.S., Greger, M., 2006. Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd, and Pb in an aquatic
533 plant *Potamogeton natans*. Chemosphere, 63, 220–227.
534

535 Guilizzoni, P., 1991. The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of
536 submersed macrophytes. Aquat. Bot. 41, 87-109.
537

538 Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot.
539 366 ,(53), 1–11
540

541 Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil.
542 Calif. Agric. Exp. Station Circular 347, 1–32.
543

544 Hom, G., 1954. Chlorophyll mutations in barley. Acta. Agric. Scand. 4, 457-461.
545

546 Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C., 2007. Effects of copper and cadmium on
547 heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiol
548 Biochem. 45, 62-69.
549

550 Jain, S.K., Vasudeman P., Jha N.K., 1989. Removal of some heavy metals from polluted water
551 by aquatic plants: studies on duckweed and water velvet. Biol. Wastes. 28, 115-119.
552

553 Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted
554 chlorophylls in water plants. Photosynthetica Res. 58, 123-133.
555

556 Liao, M.T., Hedley, M.J., Woolley, D.J., Brooks, R.R., Nichols, M.A., 2000. Copper uptake and
557 translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon*

558 *esculentum* Mill. Cv. Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and
559 histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil*. 221, 135-142.
560

561 Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic
562 biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.

563

564 Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L., Biernacki, M., Mal, T.K., Lazar, R. 1997. Organic
565 contaminant content and plant species in the Detroit River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2417-
566 2427.

567

568 Low, K.S., Lee, C.K., 1990. Removal of arsenic from Biosorption of basic dyes by water
569 hyacinth roots (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms). *Ibid.* 13, 129-131.

570

571 Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica*.
572 34, 321–342.

573

574 Mal, T.K., Adorjan, P., Corbett, A.L., 2002. Effect of copper on growth of an aquatic
575 macrophyte *Elodea Canadensis*. *Environ. Pollut.* 120, 307–311.

576

577 Manios, M., Stentiford, E.I., Millner, P.A., 2003. The effect of heavy metals accumulation on the
578 chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage
579 sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecol. Eng.* 20, 65-74.

580

581 Mishra, V., 2009. Accumulation of Cadmium and Copper from Aqueous Solutions Using Indian
582 Lotus (*Nelumbo nucifera*). Source: *AMBIO: J. Hum. Environ.* 38 (2), 110-112.

583

584 Miretzky, P., Saralegui A., Cirelli, A.F., 2004. Aquatic macrophytes potential for the
585 simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*. 57, 997–1005.

586

587 Mysliwa, B., Prasad, M.N.V., Strzalka, K., 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants.
588 Springer-verlang. 2, 147-181.

589

590 Pietrini, F., Iannelli, M.A., Pasqualini, S., Massacci, A., 2003. Interaction of Cadmium with
591 glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis*
592 (Cav.) Trin. *Stuedel Plant Physiol.* 133, 829–837.

593
594 Peng, K., Luoc, C., Lou, L., Li, X., Shen, Z., 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the
595 aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. And their potential
596 use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Sci. total environ.* 392, 22 – 29.
597
598 Santore, R.C., DiToro, D.M., Paquin, P.R. Allen, H.E., Meyer, J.S., 2001, Biotic ligand model of
599 the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and
600 *daphnia*. *Environ Toxicol Chem.* 20 (10), 2397–2402.
601
602 Sivaci, A.E., Elmas, F., Gümüs., E.R., 2008. Removal of cadmium by *Myriophyllum*
603 *heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. and its effect on pigments and total phenolic
604 compounds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54(4), 612-618.
605
606 Sprenger, M., McIntosh , A., 1989. Relationship between Concentrations of Aluminum,
607 Cadmium, Lead, and Zinc in Water, Sediments, and Aquatic Macrophytes in Six Acidic Lakes.
608 *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 225-231.
609
610 Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish.*
611 *Research Board Can.* 167,185-99.
612
613 Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds
614 of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science.*153, 65-72.
615
616 Upadhyay, R.K., Panda, S.K., 2009. Copper induced growth inhibition, oxidative stress and
617 ultrastrutural alterations in frehly grown water lettuce (*Pistia Stratiotes* L.). *Comptes Rendus*
618 *Bio.* 332, 623-632.
619
620 USEPA, 2000. United States Environmental Protection Agency. Introduction to
621 Phytoremediation. Cincinnati: National Risk Management Research Laboratory, 72.
622
623 Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 16, 153-158.
624
625 Xia, J., Tian, Q., 2009. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella*
626 *pyrenoidosa* – OJIP chlorophyll *a* fluorescence analysis. *J. Environ. Sci.* 21, 1569–1574.
627

628 Xue, P.Y., Li , G.X., Liu, W.J, Yan, C.Z., 2010. Copper uptake and translocation in a submerged
629 aquatic plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere*. 81, 1098–1103.
630

631 Yan, H., Pan, G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal
632 species. *Chemosphere*, 49, 471-476.

633 Yabanli, M., Yozukmaz, A., Sel, F., 2014. Heavy metal accumulation in the leaves, stem and
634 root of the invasive submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. (Haloragaceae): an
635 example of Kadin Creek (Mugla, Turkey). *Braz. Arch. Boil. Techn.* 57, 434-440.
636

637 Zayed, A., Gowthaman S., Terry N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland
638 plants: I. Duck weed. *J. Environ. Qual.* 27, 715-721.
639

640 Zhou, Q., Zhang, J., Jianjie-Fu, Jianbo-Shi, Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool
641 for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta.* 606, 135–150.
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662

663 5.8 Legendas para as figuras

664

665 **Figura 1.** Concentração de cobre ($\mu\text{g/g}$ massa fresca) em folhas, caules e raízes de *P. pectinatus*
666 expostas agudamente (96h) ao cobre. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

667 Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos para cada órgão e (*) indicam

668 diferenças entre os órgãos no mesmo tratamento (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$).

669

670 **Figura 2.** Taxa de fotossíntese ($\text{mgO}_2/\text{h/g}$ massa fresca) em *P. pectinatus* expostas ao cobre por

671 24h (A) e 96h (B) em diferentes intensidades luminosas. Os dados estão expressos como média \pm

672 erro padrão. Letras maiúsculas indicam diferença entre as diferentes intensidades luminosas para

673 o mesmo tratamento. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma

674 intensidade luminosa. (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$).

675

676 **Figura 3.** Taxa de respiração ($\text{mgO}_2/\text{h/g}$ massa fresca) em *P. pectinatus* expostas ao cobre por

677 24h e 96h em diferentes intensidades luminosas. Os dados estão expressos como média \pm erro

678 padrão. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos na mesma intensidade

679 luminosa. (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$) e (*) indicam diferenças entre os tratamentos nos

680 diferentes tempos. (*Test t*, $p < 0,05$).

681

682 **Figura 4.** Concentração de pigmentos (mg/g massa fresca) em *P. pectinatus* expostas (96h) ao

683 cobre. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam

684 diferenças entre os tratamentos para cada pigmento (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$).

685

686 **Figura 5.** Taxa de crescimento (g de massa fresca/dia) em *P. pectinatus* expostas ao cobre. Os

687 dados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças entre os

688 tratamentos (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$).

689

690 **Figura 6.** Comprimento longitudinal (cm) de *P. pectinatus* expostas ao cobre. Os dados estão

691 expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos

692 no mesmo período (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$) e (*) indicam diferenças entre os mesmos

693 tratamentos nos diferentes períodos. (*Test t*, $p < 0,05$).

694

695 **Figura 7.** Número de folhas em *P. pectinatus* expostas ao cobre. Os dados estão expressos como

696 média \pm erro padrão. Letras minúsculas significam diferenças entre os tratamentos para cada

697 pigmento (ANOVA – *one way*, $p < 0,05$) e (*) indicam diferenças entre os mesmos tratamentos
698 nos diferentes períodos. (*Test t*, $p < 0,05$).

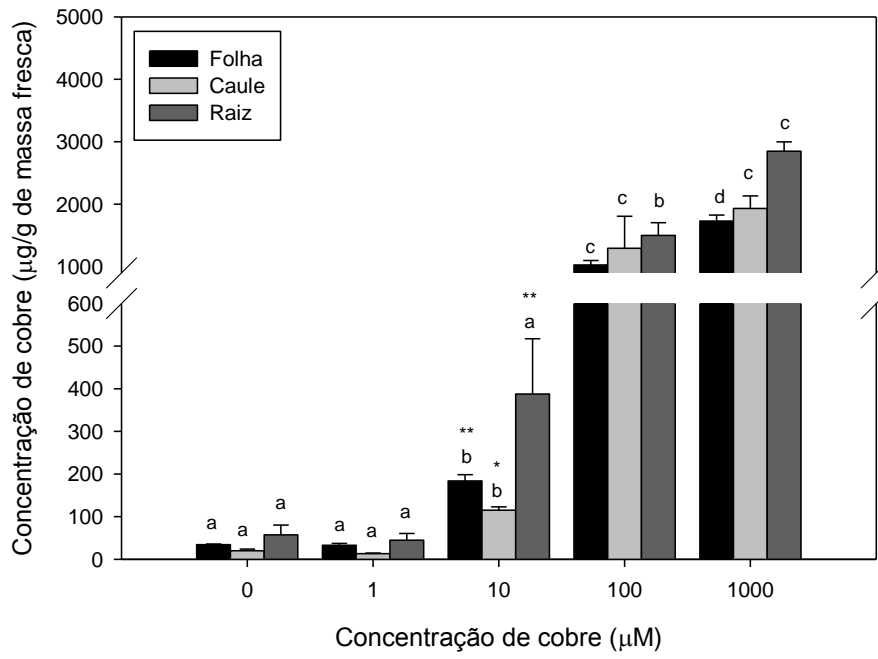


Figura 1

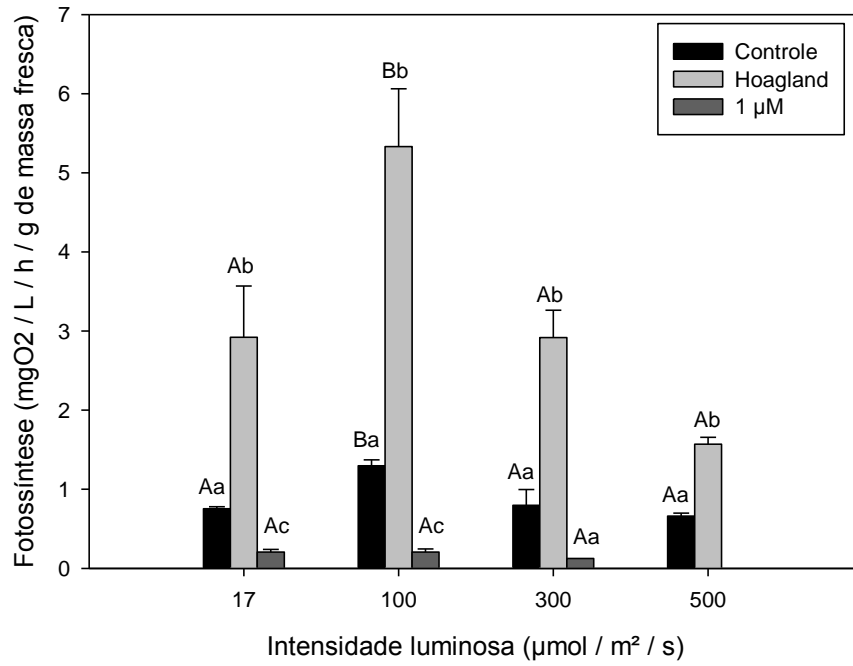


Figura 2A

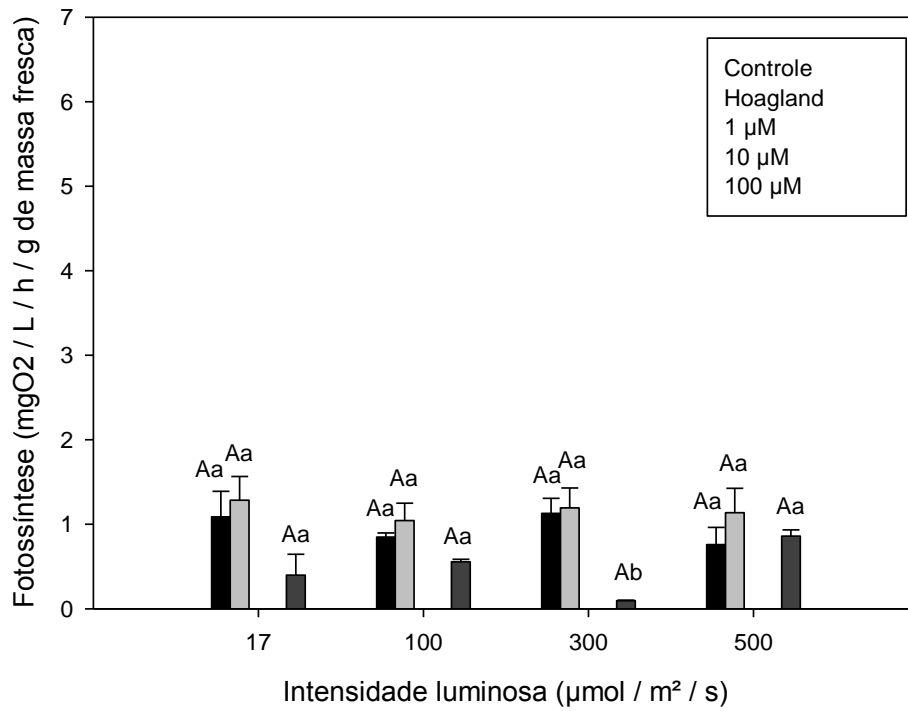


Figura 2B

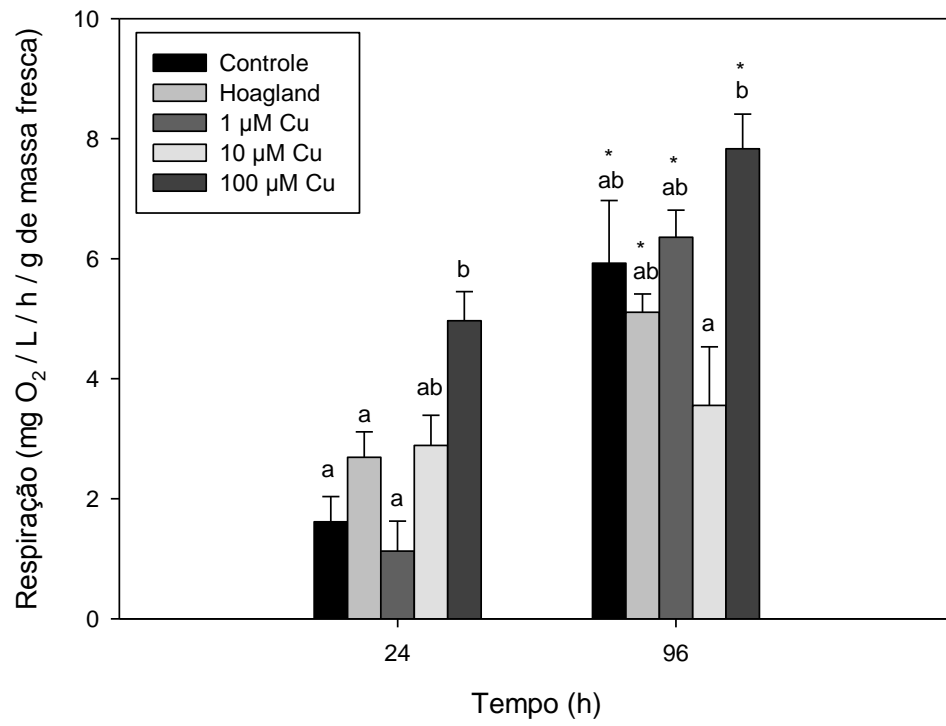


Figura 3

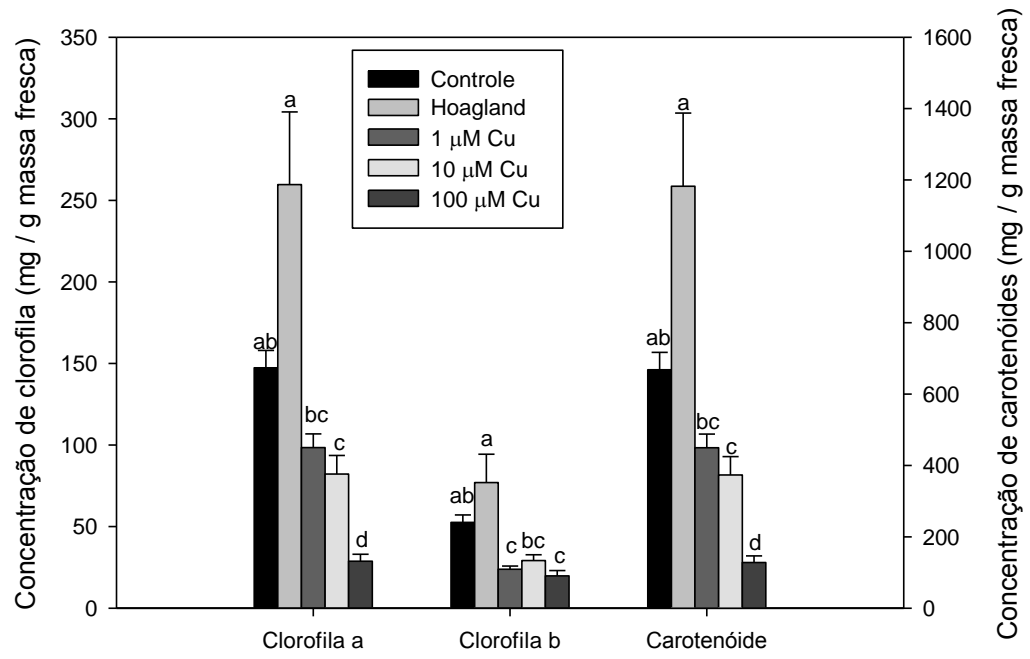


Figura 4

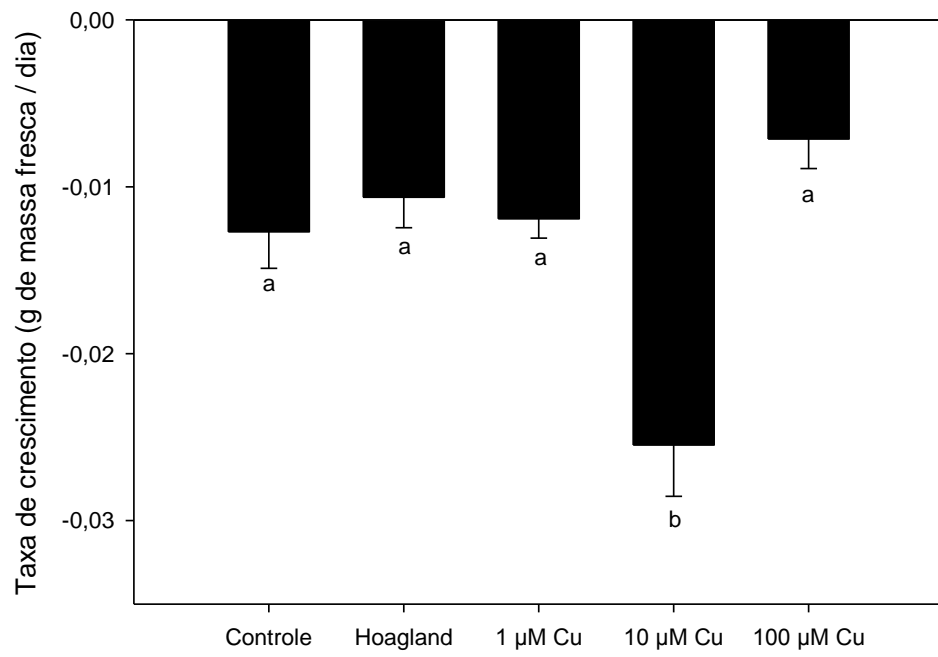


Figura 5

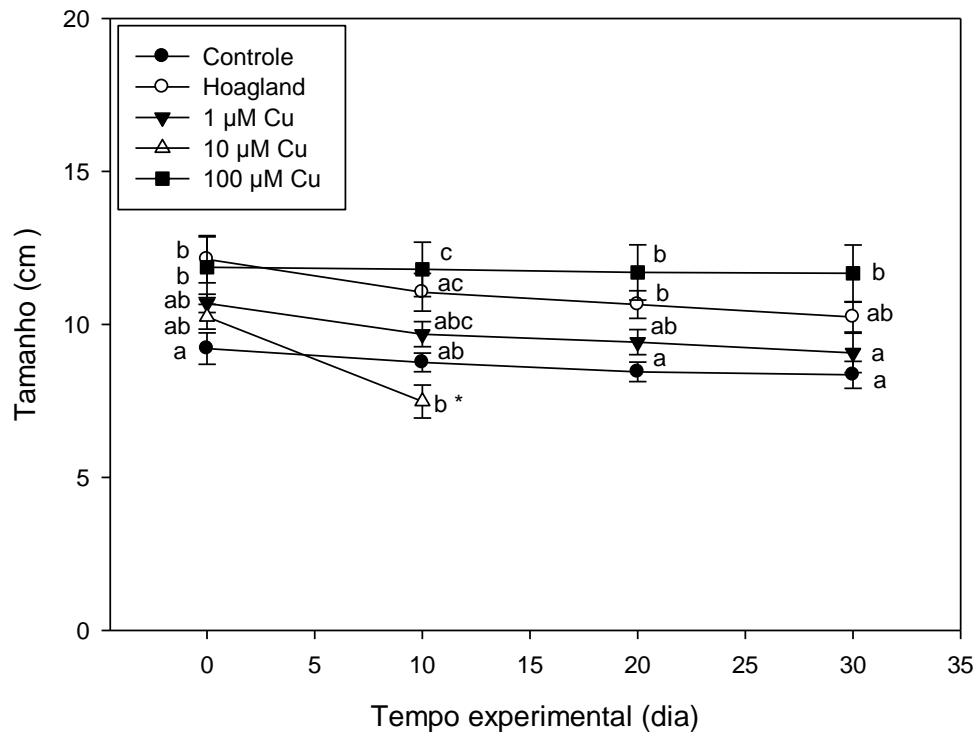


Figura 6

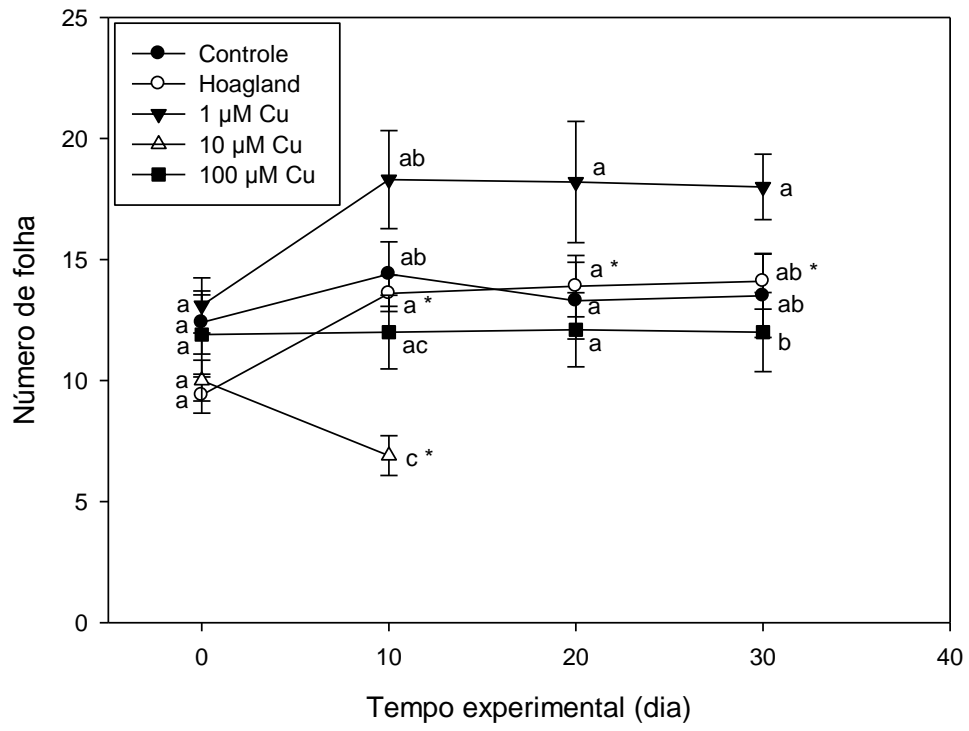


Figura 7

6. NORMAS DA REVISTA AQUATIC BOTANY

AQUATIC BOTANY

An International Scientific Journal dealing with Applied and Fundamental Research on Submerged, Floating and Emergent Plants in Marine and Freshwater Ecosystems

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

DESCRIPTION

Aquatic Botany is concerned with fundamental studies on structure, function, dynamics and classification of plant-dominated aquatic communities and ecosystems, as well as molecular, biochemical and physiological aspects of aquatic plants. It is also an outlet for papers dealing with applied research on plant-dominated aquatic systems, including the consequences of disturbance (e.g. transplantation, influence of herbicides and other chemicals, thermal pollution, biological control, grazing and disease), the use of aquatic plants, conservation of resources, and all aspects of aquatic plant production and decomposition.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our author services. Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Aquatic Botanists, Marine and Freshwater Ecologists.

IMPACT FACTOR

2013: 1.471 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts

BIOSIS

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Marine Science Contents Tables

Ecological Abstracts

Ecology Abstracts

Fisheries Review

Freshwater and Aquaculture Contents Tables

Scopus

EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

J.E. Vermaat, Institutt for miljøvitenskap (IMV), Norges universitet for miljø og biovitenskap (NMBU), Ås, Norway

E.M. Gross, Université de Lorraine, Metz, France

Honorary Editor:

G. Bowes, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Consulting Editor:

C. den Hartog, Nijmegen, Netherlands

Editorial Advisory Board:

Jean Armstrong, Hull, UK

Sven Beer, Tel Aviv, Israel

Irmgard Blindow, Kloster, Germany

Hans Brix, Aarhus, Denmark

John Eaton, Liverpool, UK

Sabine Hilt, Berlin, Germany

Michiel Hootsmans, Nieuwegein, Netherlands

Donald Les, Storrs, Connecticut, USA

Stephen Maberly, Ambleside, UK

Erik-Jan Malta, Cadiz, Spain

Nuria Marba, Esporles (Iles Balears), Spain

Morten Pedersen, Roskilde, Denmark

Gloria Peralta Gonzalez, Puerto Real Cadiz, Spain

Tenna Riis, Risskov, Denmark

Fred Short, Durham, New Hampshire, USA

Brian Sorrell, Aarhus, Denmark

Jorge Terrados, Esporles, Spain

John Titus, Binghamton, New York, USA

Brigitta van Tussenbroek, Ciudad de Mexico, Distrito Federal, Mexico

Li Wei, Wuhan, Hubei, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Aquatic Botany is concerned with fundamental studies on structure, function, dynamics and classification of plant-dominated aquatic communities and ecosystems, as well as molecular, biochemical and physiological aspects of aquatic plants. It is also an outlet for papers dealing with applied research on plant-dominated aquatic systems, including the consequences of disturbance (e.g. transplantation, influence of herbicides and other chemicals, thermal pollution, biological control, grazing and disease), the use of aquatic plants, conservation of resources, and all aspects of aquatic plant production and decomposition.

Types of paper

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Regular papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. A Short Communication Results and discussion can be combined in a short communication, while they should be separate sections in regular papers. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 3500 words including references, 2 figures or 2 tables or one of each Letters to the Editor offering comment or appropriate critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centers endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu)"

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure

as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal

circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No open access publication fee All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor

or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The open access publication fee for this journal is \$3300, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions:

<http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqbot/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and e-mail addresses of 4 potential referees.

Page charges

Aquatic Botany has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. The document must have line numbers inserted. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required, no longer than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts

should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and

present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman,

Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/halftone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style Text:

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;

3. Three or more authors: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed chronologically. List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals Stewart, D.A., Agnew, D., Boyd, R., Briggs, R., Toland, P., 1993. The derivation of changes in Nephrops per unit effort values for the Northern Ireland fishing fleet. *Fish. Res.* 17, 273-292.

b. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical Roberts, R.J., 1993. Ulcerative dermal necrosis (UDN) in wild salmonids. In: Bruno, D.W. (Ed.), *Pathological conditions of wild salmonids*. *Fish. Res.* 17, 3 14.

c. For books Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. For multi-author books Bucke, D., 1989. Histology. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. Wiley, New York, pp. 69-97. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be

published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <http://www.elsevier.com/googlemaps>.

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. For more information please see <http://www.elsevier.com/phylogenetictrees>.

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader© version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us

in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional reprints can be ordered on a reprint order form which will be sent to the corresponding author of the accepted article by the publisher.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

Author's discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.