



LETÚZIA MARIA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DE SAMAMBAIAS PARA
FITORREMEDIÇÃO DE ARSÊNIO**

LAVRAS-MG

2012

LETÚZIA MARIA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DE SAMAMBAIAS PARA FITORREMEDIAÇÃO DE
ARSÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Química do solo, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Roberto Guimaraes Guilherme

LAVRAS-MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Letúzia Maria de.

Potencial de samambaias para fitorremediação de arsênio /
Letúzia Maria de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2012.

116 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. *Pteris vittata*. 2. Química do solo. 3. Arsenato. 4. Arsenito. 5.
Absorção. 6. Fitotoxidez. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 631.41

LETUZIA MARIA DE OLIVEIRA
POTENCIAL DE SAMAMBAIAS PARA FITORREMEDIAÇÃO DE
ARSÊNIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Química do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. Jorge Antônio Gonzaga Santos UFRB

Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares UFSC

Dr. Antônio Chalfun Júnior UFLA

Dra. Ana Rosa Ribeiro Bastos UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

LAVRAS-MG

2012

A Deus, criador de uma belíssima e complexa natureza.

*Aos meus pais, **João Batista e Maria Helena**, pelo amor e apoio, que me permitiram chegar até aqui.*

*A **Luzinaldo, Leonardo, Lavoizier, Batista, Márcio, Luzia, Lêda e Maria**, meus irmãos, pelo apoio, amizade, carinho e compreensão.*

DEDICO

A todos os mestres e doutores desta vida que possuem simplicidade, sinceridade, humildade, respeito e amor ao próximo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso. Os resultados de um trabalho de pesquisa são adquiridos pela cooperação e pelo esforço de outros antes de nós.

Este trabalho não é só meu, portanto, algumas pessoas merecem agradecimentos especiais.

À Deus, por todas as oportunidades e bênçãos recebidas.

Ao meu orientador, professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme, pelo profissionalismo, oportunidade e orientação.

À professora Lena Ma pelos conhecimentos transmitidos e constante motivação.

Aos professores Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Jorge Antônio Gonzaga Santos e Antônio Chalfun Júnior, pelo profissionalismo, valiosas sugestões e colaboração.

Às pesquisadoras Ana Rosa Ribeiro Bastos e Teresa, pela disponibilidade em analisar este material e contribuições.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade e estrutura disponibilizadas,

Ao Departamento de Ciência do Solo, que proporcionou um ambiente para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço, em especial, aos técnicos de laboratório João Gualberto, Roberto e Carlinhos, que auxiliaram na execução das práticas deste trabalho e à secretária da pós-graduação, Dirce, pelo profissionalismo, paciência e amizade.

Gostaria de mencionar a importância da amizade e convívio com pessoas que me ajudaram durante todo esse tempo, em especial, Alba, Cândido, Daniela, Euzi, Évio, Evanise, Enio, Fábio Ono, Fabrício, Geila, Guilherme Lopes, Karine, Regla, Silvio, Veridiana, Vitória, Wesley e a todos que, de alguma forma, me auxiliaram, Muito obrigado.

Aos excelentes professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação.

Ao pessoal da limpeza, em especial Eliane, Cleusa e Fabiana, pela amizade, bom humor contagiante, risadas e momentos de descontração.

À FAPEMIG, o órgão financiador da pesquisa, provedor da bolsa de estudos, respaldando financeiramente minha pesquisa com a aprovação do projeto.

RESUMO GERAL

A contaminação por arsênio (As) tem provocado sérios problemas em várias regiões do mundo, visto que este elemento apresenta elevada toxicidade para os seres humanos. Uma das alternativas para restaurar a funcionalidade e a diversidade dos ecossistemas impactados pela contaminação por As é a técnica de fitorremediação, na qual se utilizam plantas associadas com microrganismos para remover os poluentes do ambiente ou reduzir sua toxicidade. O presente trabalho foi composto por três experimentos. No primeiro, avaliou-se o potencial fitoextrator de *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa* cultivadas em solução nutritiva contendo concentrações crescentes de As. No segundo experimento, avaliou-se o efeito do cromato e do sulfato na absorção e na translocação de As por *Pteris vittata*. No terceiro ensaio, selecionaram-se bactérias presentes na rizosfera de *Pteris vittata*, crescida em solução nutritiva, avaliando-se a tolerância dos isolados ao arsenato e ao arsenito, bem como a capacidade de redução do arsenato e oxidação do arsenito durante o crescimento celular em meio líquido. As concentrações de As utilizadas afetaram o crescimento das duas espécies vegetais do primeiro experimento, alterando a atividade das enzimas SOD e APX. A translocação do As da raiz para a parte aérea foi baixa em ambas as espécies, sendo as plantas consideradas excludoras ao elemento. No segundo experimento, a adição de sulfato aumentou a absorção e a translocação do arsenato em *Pteris vittata*. No entanto, a presença de cromato inibiu a translocação de arsenato, retendo o As nas raízes da planta. Foram isoladas no terceiro experimento as bactérias resistentes C1- *Comamonas testosteroni*, C2- *Flavimonas orhzihabitans*, C3- *Staphylococcus* sp. e C4- *Pseudomonas alcaligenes*. Os isolados C1, C3 e C4 foram resistentes a elevadas concentrações de arsenato e arsenito, sendo eficientes em reduzir e oxidar acima de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$, AsIII ou AsV, em quatro horas.

Palavras-chave: Fitotoxidez, *Pteris vittata*, Arsenato, Arsenito, absorção

GENERAL ABSTRACT

The contamination by arsenic has caused serious problems in several regions of the world, since this element has high toxicity to humans. An alternative to restore functionality and diversity of ecosystems impacted by the contamination is the technique of phytoremediation, in which plants are used in association with microorganisms to remove pollutants from the environment or reduce their toxicity. The aim of this study was to evaluate: a) the potential for As phytoextraction in *Thelypteris salzamannii* and *Dicranopteris flexuosa* grown in nutrient solution containing increasing concentrations of arsenic and to investigate the activity of antioxidant enzymes to neutralize the effect of the element; b) the effect of chromate and sulfate in absorption and translocation of As by *Pteris vittata*; c) arsenite and arsenate resistance of four microbial isolates recovered from the rhizosphere of *Pteris vittata* as well as their ability to express As(III)-oxidizing and As(V)-reducing capabilities under aerobic conditions. The results of first experiment show that the arsenic accumulation in fronds and roots increased with an increase in arsenic concentration in the growth medium. In addition, arsenic accumulation was highest in the roots as compared to its detection in the fronds of both species. Moreover, both ferns responded differently to arsenic exposure in terms of anti-oxidative defense. Higher levels of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were observed in *Thelypteris salzamannii* than in *Dicranopteris flexuosa*, showing their active involvement in the arsenic detoxification mechanism. In the second experiment, *P. vittata* effectively took up Cr but was ineffective in Cr translocation. Unlike chromate and arsenate, addition of sulfate increased the uptake and translocation of both chromate and arsenate. However, the presence of chromate inhibits the translocation of arsenate, which was retained in the roots of the plant. This work demonstrated that chromate and arsenate inhibited the uptake of each other, whereas sulfate enhanced uptake and translocation of both chromate and arsenate by *P. vittata*. Four bacteria, C1- *Comamonas testosteroni*, C2- *Flavimonas orhzihabitans*, C3- *Staphylococcus* sp. and C4- *Pseudomonas alcaligenes* were isolated in the third experiment. The isolates C1, C3 and C4 were resistant to high concentrations of arsenite and arsenate. All microbial isolates displayed resistance up to 1 mM As(III) and 40 mM As(V) as well as an ability to oxidize As(III) and reduce As(V) in aerobic conditions.

Keywords: *Dicranopteris flexuosa*, *Thelypteris salzamannii*, antioxidative enzymes, arsenic

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	11
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1	Arsênio e a saúde humana	
2.2	Disponibilidade do arsênio no meio ambiente	
2.2.1	Comportamento do arsênio no solo e fitodisponibilidade	
2.2.2	Arsênio nas plantas	
2.3	Resposta das plantas ao estresse do arsênio	
2.3.1	Fitorremediação de As por samambaias hiperacumuladoras .	
2.3.2	Resposta antioxidativas das plantas ao estresse do arsênio ..	
3	REFERÊNCIAS	
	CAPÍTULO II- ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE ARSÊNIO EM DUAS ESPÉCIES TROPICAIS DE PTERIDÓFITAS	
1	INTRODUÇÃO	
2	MATERIAL E MÉTODOS	
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4	CONCLUSÕES	
5	REFERÊNCIAS	
	CAPÍTULO III- EFFECTS OF CHROMATE AND SULFATE ON ARSENIC UPTAKE AND TRANSLOCATION BY <i>PTERIS VITTATA</i> L.	
1	INTRODUCTION	
2	MATERIALS AND METHODS	
3	RESULTS AND DISCUSSION	
4	CONCLUSIONS	
5	ACKNOWLEDGEMENTS	
	CAPÍTULO IV- ARSENIC RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF ARSENIC HYPERACCUMULATOR <i>PTERIS VITTATA</i> L	
1	INTRODUCTION	
2	MATERIALS AND METHODS	
3	RESULTS	
4	DISCUSSION	
5	REFERENCES	

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A alta toxicidade do arsênio (As) para homens, plantas e animais tem tornado crescente a preocupação com a contaminação do meio ambiente provocada por este elemento. É neste contexto que a remediação de solos e corpos d'água contaminados com As tem se tornado de grande interesse, como ferramenta de proteção da vida humana e do meio ambiente. Existe hoje necessidade de adequar tecnologias para amenizar esse passivo ambiental dentro de uma concepção de desenvolvimento sustentável. A fitorremediação, que é uma técnica emergente, simples, de baixo custo e que gera o mínimo de perturbação ao solo e na paisagem, quando comparada com técnicas de tratamento físico e químico, é uma alternativa promissora. A fitorremediação utiliza plantas (ao necessariamente e os microrganismos associados) para remover os poluentes do ambiente ou reduzir sua toxicidade.

A descoberta de plantas com capacidade de acumular grandes quantidades de elementos-traço (hiperacumuladoras) resultou em avanços para o emprego desta técnica na remediação de solos contaminados (BAKER et al., 1994). Para ser hiperacumuladora de As, a planta deve ter habilidade para absorver e reter, na parte aérea, no mínimo, $1.000 \text{ mg As kg}^{-1}$ (GONZAGA et al., 2006; MA et al., 2001). Poucas plantas são capazes de translocar grande quantidade de As das raízes para a parte aérea (RAHMAN; HASEGAW, 2011). A primeira espécie vegetal descrita como hiperacumuladora de As, a samambaia *Pteris vittata* L. (MA et al., 2001), tem grande potencial fitoextrator (GONZAGA et al., 2006), acumulando alta quantidade de As na parte aérea e boa produção de biomassa. Algumas outras samambaias foram descritas como hiperacumuladoras de As, como *Pteris biaurita*, *P. cretica* e *P. logifolia* (SRISVASTAVA et al., 2006). Entretanto, a maioria das espécies estudadas é de

clima temperado, sendo escassas e necessárias as informações a respeito desta característica para espécies tropicais. Estudos que identifiquem espécies tolerantes e ou hiperacumuladoras de As, que se adaptem às áreas contaminadas encontradas em regiões tropicais; o entendimento dos mecanismos fisiológicos relacionados com a acumulação de As e as interações do As com outros elementos são de grande importância para o aperfeiçoamento da técnica de fitorremediação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arsênio e a saúde humana

A cada dois anos, a Agência para Substâncias Tóxicas do Departamento de Saúde dos Estados Unidos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR, 2012) classifica as substâncias mais perigosas para a saúde humana. Desde 1997, o arsênio (As) é o primeiro da lista. De ocorrência natural, normalmente ocorre em baixas concentrações nos solos e rochas, não representando, em condições naturais, risco para os seres humanos.

Concentrações elevadas de As no solo e na água são normalmente resultante de fontes antropogênicas (GONZAGA et al., 2006). Concentrações aceitáveis de As em águas potáveis situam-se entre 10 e 50 $\mu\text{g de As L}^{-1}$ (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 2002). No entanto, valores cerca de dez vezes superiores a estes têm sido reportados em águas de superfície no entorno de áreas de mineração no Brasil (MATSCHULLAT, 2000) e em diversos estudos realizados em países do sul da Ásia (SMITH et al., 2000), principalmente Índia e Bangladesh, os quais apresentam os problemas mais sérios de contaminação de As, em âmbito mundial, com milhares de pessoas intoxicadas, apresentando hiperqueratoses e desenvolvimento de cânceres.

Assim como no caso da água, a contaminação do solo por As representa também um risco ecológico e ou para a saúde humana, podendo ainda comprometer a produtividade agrícola e a sustentabilidade do ecossistema.

2.2 Disponibilidade do arsênio no meio ambiente

2.2.1 Comportamento do arsênio no solo e fitodisponibilidade

O As é um metaloide de ocorrência natural, componente de mais de 245 minerais (MANDAL; SUZUKI, 2002). Elemento calcofílico, tem grande afinidade por sulfetos (ALLOWAY, 1990) e, nesses, aparece juntamente com cobre, níquel, chumbo, cobalto e outros elementos-traço (MANDAL; SUZUKI, 2002). A concentração média na crosta terrestre é de 2 mg de As kg⁻¹ (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2003).

O As está presente em rochas magmáticas em concentrações que variam de 0,5-2,6 mg kg⁻¹ e em sedimentares de 1,0-13 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). O intemperismo das rochas converte o sulfeto de As em trióxido de As, o qual entra no ciclo geoquímico na forma de pó ou pela dissolução em águas pluviais, fluviais ou de subsuperfície (MANDAL; SUZUKI, 2002).

O As no solo pode ser originário de fontes naturais, como intemperismo de rochas, atividade vulcânica, aerossóis de água do mar e volatilização microbiana (NRIAGU; PACYNA, 1988); de fontes antropogênicas, como pesticidas, herbicidas, fertilizantes e de fundição do ouro, chumbo, cobre e níquel, além da produção de ferro e aço e da combustão de carvão (BAIRD, 2002; SMITH et al., 1998), sendo liberado no ambiente durante a exploração mineradora e a irrigação com água contaminada (ROYCHOWDHURY et al., 2002).

O As tende a concentrar-se nos horizontes superficiais, devido à deposição atmosférica e à reciclagem da vegetação (ALLOWAY, 1990), bem como à presença de óxidos e da matéria orgânica. A concentração de As em solos ditos não contaminados pode variar entre 1 a 20 mg kg⁻¹ (COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BASICO DO ESTADO DE SAO PAULO - CETESB, 2005; FITZ; WENZEL, 2002), mas, em solos agrícolas contaminados, esse valor pode chegar a 600 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

No Brasil, tem sido relatada a ocorrência de contaminação de As em águas (até 0,36 mg L⁻¹), solos (até 860 mg kg⁻¹) e sedimentos (até 3.200 mg kg⁻¹) nas proximidades de áreas industriais ou de mineração (CANTONI, 2010; MAGALHÃES et al., 2001; MAGALHÃES; PFEIFFER, 1995; MATSCHULLAT et al., 2000). Os primeiros registros de análise da concentração de As em solos brasileiros foram efetuados por Curi e Franzmeier (1987). Esses autores encontraram teores de As em Latossolo Roxo variando de 6 a 10 mg kg⁻¹, enquanto, para Latossolo Ferrífero, o teor foi de 36 mg kg⁻¹. Em outro estudo (MARQUES, 2000), por meio do uso de uma microsonda de raios X, uma técnica semiquantitativa, foram detectados teores de até 38 mg As kg⁻¹ em Latossolos sob vegetação de Cerrado.

O comportamento biogeoquímico e a toxicidade de As no solo e na água são dependentes das espécies prevalentes de As, os quais são influenciados pelo pH e o potencial redox do ambiente (Figura 1). Em condições óxicas, o As é encontrado na forma arsenato As (V), enquanto o arsenito As (III) é encontrado em condições anóxicas e consiste na forma reduzida (HAYES; TRAINA, 1998; MCBRIDE, 1994; SMITH et al., 1998). O controle da solubilidade do As na solução do solo em condições aeróbias é feita pelas formas Ca₃(AsO₄)₂, Mg₃(AsO₄)₂ e As₂O₅; já em condições anaeróbias, esse controle é feito pelas formas As, As₂S₃ e As₂O₃ (HAYES; TRAINA, 1998).

O comportamento do arsenato no solo assemelha-se ao do fosfato e do vanadato (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011). O arsenato é adsorvido por óxidos de ferro e alumínio, aluminossilicatos não cristalinos e, em menor extensão, em argilossilicatos. O arsenato é o ânion do ácido H_3AsO_4 , que tem valores de pKa de 2,24, 6,94 e 11,5, sendo adsorvido efetivamente em pH entre 4 e 7 (MCBRIDE, 1994). Os ânions AsO_2^- , AsO_4^{3-} , HAsO_4^{2-} e H_2AsO_3^- são formas móveis de As, sendo sorvidos em pH entre 7 e 10 (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2011).

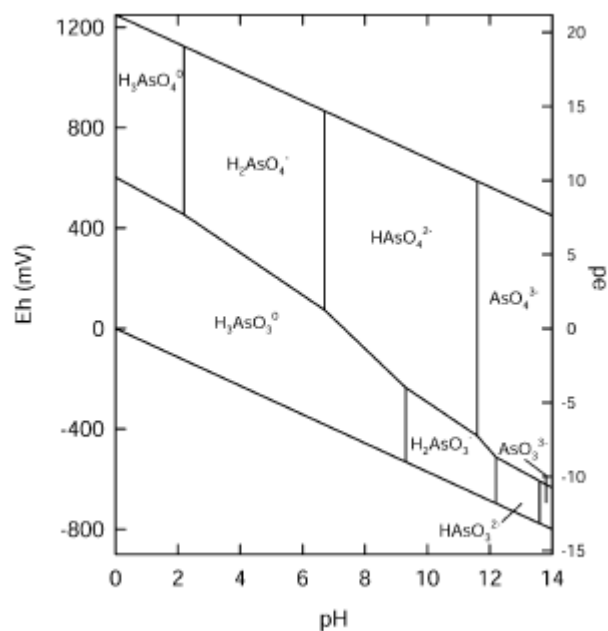


Figura 1 Diagrama Eh/pH para as várias formas de arsênio (SMEDLEY; KINNIBURG, 2002).

A concentração total de As no solo não necessariamente determina sua disponibilidade para as plantas (ADRIANO, 2001), pois, à semelhança do fósforo, o As é altamente adsorvido a óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês, bem como à matéria orgânica. Vários parâmetros do solo afetam a biodisponibilidade de As, como as características físicas, químicas e biológicas, porém, a textura do solo, associada à fonte de As (se inorgânica ou orgânica), é a principal (SHEPPARD, 1992).

No Brasil, ainda são poucos os relatos de contaminação de solo e corpos d'água por As, no entanto, isso pode estar ligado à ausência de um programa de levantamento das possíveis áreas contaminadas no território nacional. A contaminação antropogênica está principalmente associada à mineração de ouro, ferro, cobre e zinco. Considerando a produção histórica desses minerais no Brasil, existe grande probabilidade de muitas áreas no território nacional terem sido contaminadas, colocando em risco a saúde de muitas comunidades e a qualidade ambiental.

2.2.2 Arsênio nas plantas

As plantas comportam-se de forma diferenciada sob condições de estresse, como na presença de metais e metaloides, como o As, não essenciais às plantas, e que possuem altíssima toxicidade. Plantas altamente sensíveis, como as leguminosas, em contato com o As, apresentam vários sintomas de fitotoxicidez (DIAS et al., 2010; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), podendo chegar à morte, enquanto outras espécies vegetais dispõem de mecanismos que lhes permitem se adaptar a diferentes condições do meio (HARTLEY; LEPP, 2008), a exemplo das samambaias *Pteris vittata* e *Pitirogramma calomelanos*, entre outras que são hiperacumuladoras de As. A maioria das plantas tolera concentrações de As no solo na faixa de 1 a 50 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS;

PENDIAS, 2001; MASCHER et al., 2002), enquanto hiperacumuladoras crescem em solo com até $1.000 \text{ mg As kg}^{-1}$ (TU; MA, 2003).

A capacidade das plantas em absorver o As varia em função da concentração, da disponibilidade e da especiação desse elemento no solo (BURLÓ et al., 1999), bem como da presença de outros elementos, como o fosfato (Figura 2). Na solução do solo, o As é absorvido pelas raízes das plantas por fluxo de massa (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), sendo pouco translocado para a parte aérea, após a absorção pelas raízes (MARIN et al., 1993).

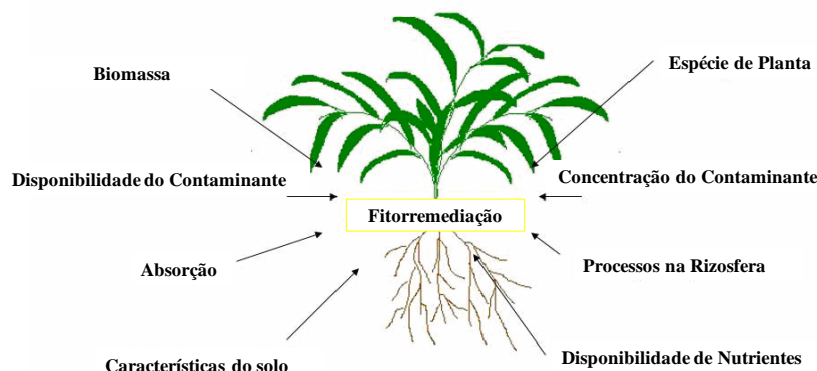


Figura 2 Fatores que influenciam a absorção de As pelas plantas. Adaptado de GONZAGA (2006).

Espécies hiperacumuladoras e tolerantes absorvem preferencialmente As na forma dominante em solos aeróbicos, arsenato (FRANSCESCONI et al., 2002; TU et al., 2004). Devido à sua similaridade com o fosfato, supõe-se que o arsenato compete pelo mesmo sistema de transporte do fosfato no plasmalema das raízes (MEHARG; MACNAIR, 1992). A absorção do arsenito ocorre passivamente via aquagliceroporinas, ou canais que permitem o movimento de água e solutos neutros, nas raízes. No entanto, o fósforo não compete com a

absorção do arsenito, logo, o arsenito não compartilha o mesmo sistema de transportadores de fosfato (WANG et al., 2002).

A fitotoxicidade do As ocorre devido a atuação do elemento na inibição do metabolismo das plantas (DIAS et al., 2010; MEHARG; MACNAIR, 1992). Mais especificamente, o arsenato pode prejudicar a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (GONZAGA et al., 2006; MEHARG; MACNAIR, 1992), bem como competir com o fósforo em várias reações (ZHANG et al., 2002). Sob altas concentrações de As disponível no solo, a maioria das plantas apresenta sintomas de fitotoxicidade, que são: murchamento e necrose das folhas, crescimento lento das raízes e parte aérea e cor arroxeadas, podendo chegar à morte (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

O As tende a se concentrar mais nas raízes das plantas e nas folhas mais velhas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), encontrando-se em menores concentrações nas folhas mais novas e caules e em concentrações ainda mais baixas nas sementes e frutos (HARTLEY; LEPP, 2008). A toxicidade provocada por As tem sido identificada em várias espécies de plantas, incluindo *Eucalyptus grandis*, *Ricinus communis* e *Brachiaria decumbens* (ARAUJO et al., 2011; MELO, E. et al., 2009; MELO, R. et al., 2009).

As espécies vegetais que apresentam tolerância ao As, mesmo quando expostas a altas concentrações, possuem mecanismos que reduzem a sua absorção (SHAW, 1989). A diminuição da absorção do elemento pode ser devido às modificações nos mecanismos de transporte de fósforo/arsênio, visto que o metaloide entra nas plantas pelo mesmo sistema de transporte do fósforo (MEHARG; MACNAIR, 1992). Em plantas tolerantes e hiperacumuladoras, quando as necessidades da planta ao fósforo são satisfatórias, o funcionamento deste mecanismo é reduzido, impedindo a assimilação de As (BURLÓ et al., 1999). Uma vez absorvido, existem espécies vegetais capazes de metabolizá-lo a formas menos tóxicas, promovendo o seu sequestro pela planta. sem apresentar

sintomas de fitotoxicidade (MEHARG; HARTLEY-WHITAKER, 2002), como ocorre, por exemplo, com as hiperacumuladoras de As (TRIPATHI et al., 2007).

Os mecanismos de destoxificação usados por espécies de samambaia hiperacumuladoras de As incluem quelação, compartimentalização, biotransformação e reparo celular (SALT et al., 1998). Há evidências de que a maior facilidade de redução do arsenato para arsenito dentro da planta seja uma estratégia das hiperacumuladoras para acumular grande quantidade de As sem desenvolver sintomas de toxidez (TRIPATHI et al., 2007; TU et al., 2004; ZHANG et al., 2002). Embora o arsenito seja mais tóxico do que o arsenato, uma vez ocorrida a redução, o arsenito torna-se menos tóxico, devido à complexação por complexos arsenito-tiol (-SH) e ou fitoquelatina-As (MEHARG, 2003), e posterior sequestro vacuolar (PICKERING et al., 2000). Em experimento de especiação de As, conduzido por Tu et al. (2004), na biomassa da *P. vittata* L., 90% do As nas raízes estavam na forma de arsenato, enquanto nas folhas predominou o arsenito (94%) e nenhum composto orgânico contendo As foi detectado. Francesconi et al. (2002) encontraram que 95% do As na raiz da *P. calomelanos* estava na forma de arsenato, enquanto na parte aérea, de 60% a 72% do As estava na forma de arsenito, o que se assemelha ao relatado para *P. vittata*, por Tu et al. (2004).

2.3 Resposta das plantas ao estresse do As

2.3.1 Fitorremediação de As por samambaias hiperacumuladoras

O uso de plantas e da microbiota associada para remover, imobilizar ou tornar os contaminantes inofensivos ao ecossistema é conhecido como fitorremediação. Essa técnica tem sido reconhecida como emergente para descontaminação ambiental (LINDBLOM et al., 2006; SUN et al., 2011), devido

ao seu baixo custo e por causar menos mobilização do solo, quando comparada com outras técnicas (HENRY, 2000).

A fitorremediação prevê vários mecanismos de despoluição, sendo que para áreas contaminadas com As destacam-se a fitoestabilização e a fitoextração. A fitoestabilização é o ramo da fitorremediação em que as plantas são utilizadas para diminuir a mobilidade e a disponibilidade do contaminante no solo. Esse mecanismo é aplicado em situações em que o solo possui elevada contaminação e apenas plantas tolerantes são capazes de se estabelecer. As espécies tolerantes, geralmente, possuem raízes com grande biomassa, capazes de adsorver, precipitar e acumular os elementos-traço na raiz sem translocá-los para a parte aérea. Apesar de os contaminantes não serem removidos do local, a fitoestabilização permite a redução do risco de erosão e a lixiviação dos poluentes, evitando a contaminação dos lençóis freáticos, além de reduzir o risco da entrada do As na cadeia alimentar, evitando, assim, possíveis contaminações ao homem e ao meio ambiente (ZHAO et al., 2009).

A fitoextração consiste na absorção e na acumulação do elemento-traço na parte aérea das plantas (SANTOS et al., 2010). A planta ideal para a fitoextração de arsênio deve ser tolerante a elevadas concentrações na parte aérea planta, ter alta taxa de crescimento, boa produção de biomassa e ter sistema radicular abundante (GARBISU; ALKORTA, 2001). A obtenção de plantas com capacidade de hiperacumulação de metais e metaloides é, provavelmente, o maior desafio a ser vencido dentro da técnica de fitorremediação (ZHAO et al., 2009). A hiperacumulação de metais e metaloides é um fenômeno raro em plantas terrestres superiores. Até o ano de 2011, foram identificadas 450 plantas hiperacumuladoras (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011).

Para ser considerada hiperacumuladora de As, a planta deve ter habilidade para absorver e reter na parte aérea (caule e folhas), no mínimo, 1.000 mg As kg⁻¹ (GONZAGA et al., 2006; MA et al., 2001). É desejável, ainda, que

tais plantas possuam alta taxa de acumulação, mesmo em baixas concentrações do contaminante, acumulem diversos contaminantes concomitantemente, apresentem alta taxa de crescimento e produção de biomassa, resistência a pragas e doenças e tolerância ao contaminante (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000; SUNDARAM et al., 2008). Outros fatores também são utilizados para caracterizar a hiperacumulação de As por plantas, como o fator de translocação (FT) e o fator de bioacumulação (FB). O FT demonstra a eficiência da planta em transportar um elemento da raiz para a parte aérea. Já o FB avalia a eficiência da planta em acumular o elemento, levando em consideração a concentração deste no meio. Quanto maior o FB, maior será a transferência do elemento do solo ou da solução nutritiva para a planta e, conseqüentemente, maior será também a capacidade do vegetal em retirar o As do meio. Ambos os fatores, quando superiores a 1, confirmam a característica de hiperacumulação da planta (MA et al., 2001).

Poucas plantas têm a habilidade de translocar grande quantidade de As das raízes para a parte aérea (RAHMAN; HASEGAW, 2011). A primeira planta descrita como hiperacumuladora de As, a samambaia *Pteris vittata* L. (MA et al., 2001), tem grande potencial como fitoextratora (GONZAGA et al., 2006), acumulando alta quantidade de As na parte aérea e boa produção de biomassa. Tu e Ma (2003) relataram concentração na biomassa de 2,3%, quando a *Pteris vittata* L. foi cultivada em solo com 500 mg de As kg⁻¹. Zhao et al. (2002) identificaram outras samambaias da ordem Pteridales com características semelhantes quanto à absorção de As, como *Pteris cretica*, *Pteris longifolia* e *Pteris umbrosa*. Srivastava et al. (2006) observaram que uma nova espécie de samambaia, *Pteris biaurita* L., acumulou uma quantidade de As semelhante àquela de *P. vittata*, quando as duas espécies foram cultivadas em 50 µg As L⁻¹. Wang et al. (2007) encontraram outra samambaia, *Pteris fauriei*, que acumulou mais de 1.000 mg As kg⁻¹ na parte aérea. Xie et al. (2009) listaram várias

espécies de plantas que hiperacumulam As. A maioria das espécies estudadas é de clima temperado, sendo escassas e necessárias as informações a respeito de estudos relacionados à tolerância de espécies de clima tropical.

2.3.2 Resposta antioxidativas das plantas ao estresse do arsênio

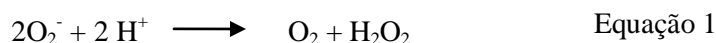
As plantas possuem dois sistemas antioxidantes de defesa e proteção (ODJEGBA; FASIDI, 2007), sendo um enzimático e outro não enzimático. Esses mecanismos permitem, de maneira eficiente, o controle das espécies reativas de oxigênio (EROs), evitando a produção e a degradação dessas moléculas (LYUBENOVA et al., 2009; NOUAIRI et al., 2009; SCHICKLER; CASPI, 1999), como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio, (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), que são produzidos continuamente pelo metabolismo vegetal (FOYER; NOCTOR, 2005) por diferentes tipos de estímulos, e.g., devido à presença de elementos tóxicos (MOLLER, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem, entre outros, ascorbato, glutathione (GSH), flavonoide, alcaloides, compostos fenólicos, aminoácidos não proteicos, tocoferóis e carotenoides. A glutathione, um tripeptídeo hidrofílico, além de participar do ciclo ascorbato-glutathione, é capaz consumir, quando reduzida, alguns EROs (HIDEG, 1996), bem como participar da síntese de fitoquelatinas (PC). As PCs constituem três aminoácidos cisteínas, glicina e glutamato arranjados, geralmente, na mesma conformação, que podem ser rapidamente sintetizadas em respostas a níveis tóxicos de metais pesados (SCHMOGER et al., 2000).

Além do sistema de defesa não enzimático, o sistema enzimático é de fundamental importância para as células, o qual é composto por enzimas antioxidantes que atuam em sincronia, como superóxido dismutase (SOD),

catalase (CAT), glutathione redutase (GR), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidase (GPX) (RADIC et al., 2010).

Dentro da célula, a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é a primeira linha de defesa contra as EROs (VALKO et al., 2006), sendo responsável pela redução de O_2 nas plantas pela conversão do O_2^- em H_2O_2 (Equação 1). O peróxido de hidrogênio produzido é facilmente difundido, mas tóxico para as células, sendo então degradado por CAT, GPX e APX (LYUBENOVA et al., 2009).



Três tipos de isoformas da SOD são encontrados nas plantas, os quais se distinguem pelos diferentes cofatores (Mn, Fe e Cu/Zn). O Mn atua em mitocôndrias e peroxissomos, Fe em cloroplastos e Cu/Zn no citosol, peroxissomos e cloroplastos. A resposta da SOD a elementos-traço varia com a espécie, o tecido, o tipo de metal, a concentração e o tempo de exposição (GRATÃO et al., 2005; LYUBENOVA et al., 2009).

A enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma enzima importante no processo de fotorrespiração, pois promove a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Equação 2) e está localizada, principalmente, nos peroxissomos (MITTLER, 2002), sendo produzida por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados e metaloides (GRATÃO et al., 2005). A CAT, assim como a SOD, também é eficiente no sistema antioxidante, pois suas ações combinadas reduzem a ação tóxica e altamente reativa dos radicais hidroxil (OH^-) (SCANDALIOS, 1993).



As enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) degradam o H_2O_2 em água e em um composto oxidado, que depende do tipo de peroxidase atuante. São

encontradas no citossol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular, no apoplasto, nas mitocôndrias e nos peroxissomos (MITTLER, 2002). A POX predominante é a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), que catalisa a oxidação do ascorbato em peróxido de hidrogênio, gerando o desidroascorbato. A APX está presente no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no apoplasto e nos cloroplastos (MITTLER, 2002). A APX participa, juntamente com a glutathione redutase, do ciclo ascorbato-glutathione.

Sob altas concentrações de elementos-traço as espécies hiperacumuladoras mantêm seu sistema antioxidante ativo, o que as protege de possíveis danos causados por elementos que podem estar disponíveis em suas formas iônicas (ZHOU et al., 2010). O aumento das doses de elementos-traço na planta promove o aumento da atividade de pelo menos uma enzima antioxidante, o que não ocorre em espécies não hiperacumuladoras (WOJCIK et al., 2006).

Apesar de muitos estudos sobre a tolerância de plantas ao As, ainda não existem informações suficientes para entender os mecanismos de absorção e transporte deste elemento nas plantas, bem como a interação do As com outros metais.

Diante desse conhecimento, destaca-se a importância de estudos para a identificação de espécies hiperacumuladoras de As, assim como seus mecanismos fisiológicos relacionados à acumulação deste elemento nas plantas.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer, 2001. 879 p.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Health and human services**. Disponível em:
<<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. Glasgow: Black Academic & Professional, 1990. 339 p.

ARAÚJO, A. S. A. et al. Fitorremediação de solos contaminados com arsênio (As) utilizando braquiaria. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 84-91, jan./fev. 2011.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 621 p.

BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 41-49, Mar. 1994.

BURLÓ, F. et al. Arsenic species: effects on accumulation by tomato plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 3, p. 1247-1253, Mar. 1999.

CANTONI, M. **Arsênio em solos do Estado de São Paulo: método analítico, concentração e sorção**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2010.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório do estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2012.

CURI, N.; FRANZMEIER, D. P. Effect of parent rocks on chemical and mineralogical properties of some Oxisols in Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 51, n. 1, p. 153-158, Feb. 1987.

DIAS, L. E. et al. Growth seedlings of pigeon pea, (*Cajanus cajan* (L.) Millesp), wand riverhemp (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (Lem.) de wit) in an arsenic-contaminated soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, n. 2, p. 975-983, mar./abr. 2010.

FITZ, W. J.; WENZEL, W. W. Arsenic transformations in soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 259-278, Nov. 2002.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, July 2005.

FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potencial phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **The Science of the Total Environment**, Oxford, v. 284, n. 1, p. 27-35, 2002.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 229-236, May 2001.

GONZAGA, M. I. S. **Effects of soil and plant on arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulation *Pteris vittata* L.** 2006. 146 p. Thesis (Ph.D. in Crop Science) - University of Florida, Gainesville, 2006. Disponível em: <<http://lqma.ifas.ufl.edu/Publication/MG-06.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

GONZAGA, M. I. S. et al. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. **Environmental Pollution**, Barking, v. 143, n. 2, p. 254-260, Apr. 2006.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, n. 6, p. 481-494, July 2005.

HARTLEY, W.; LEPP, N. W. Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 35-44, 2008.

HAYES, K. F.; TRAINA, S. J. Metal ion speciation and its significance in ecosystem health. In: ADRIANO, D. C.; LOGAN, T. J.; CHECKAI, R. T. (Ed.). **Soil chemistry and ecosystem health**. Madison: SSSA Special, 1998. p. 45-85.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**. Washington: EPA, 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.clu-in.org>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

HIDEG, G. Free radical production in photosynthesis under stress condition. In: PESSAROKLI, M. (Ed.). **Handbook of Photosynthesis**. Abingdon: Taylor & Francis, 1996. p. 911-930.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

LINDBLOM, S. D. et al. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 726-733, Apr. 2006.

LYUBENOVA, L. et al. Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 573-581, July 2009.

MA, L. Q. et al. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, London, v. 409, n. 1, p. 579, Feb. 2001.

MAGALHÃES, V. F. et al. Arsenic contamination and dispersion in the Engenho Inlet, Sepetiba Bay, SE, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 129, n. 1, p. 83-90, Jan. 2001.

MAGALHÃES, V. F.; PFEIFFER, W. C. Arsenic concentration in sediments near a metallurgical plant: Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 175-181, June 1995.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, London, v. 58, n. 2, p. 201-235, Apr. 2002.

MARIN, A. R. et al. Soil redox-pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice. **Plant and Soil**, The Hague, v. 152, n. 2, p. 245-253, Sept. 1993.

MARQUES, J. J. G. S. M. **Trace element distributions at the landscape and micrometer scales**. 2000. 183 p. Thesis (Ph.D. in Crop Science) - Purdue University, West Lafayette, 2000.

MASCHER, R. et al. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science**, Limerick, v. 163, n. 5, p. 961-969, Nov. 2002.

MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere: a review. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 297-312, Apr. 2000.

MATSCHULLAT, J. et al. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 193-202, Apr. 2000.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

MEHARG, A. A. Variation in arsenic accumulation: hyperaccumulation in ferns and their allies. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, n. 1, p. 25-31, Jan. 2003.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 154, n. 1, p. 29-43, Jan. 2002.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 519-524, Apr. 1992.

MELO, E. E. et al. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 30, n. 168, p. 479-483, Feb. 2009.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 455-465, mar./abr. 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MOLLER, I. M. et al. Oxidizing modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

- NOUAIRI, I. et al. Antioxidant defense system in leaves of *Indian mustard* (*Brassica juncea*) and *rape* (*Brassica napus*) under cadmium stress. **Acta Physiology Plant**, Minneapolis, v. 31, n. 2, p. 237-247, Dec. 2009.
- NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. **Nature**, London, v. 333, n. 4, p. 134-139, May 1988.
- ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **Revista Biologia Tropical**, San José, v. 55, n. 3/4, p. 815-823, 2007.
- PICKERING, I. J. et al. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n. 4, p. 1171-1177, Apr. 2000.
- RADIC, S. et al. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 3, p. 336-342, Mar. 2010.
- RAHMAN, M. A.; HASEGAW, H. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophyte. **Chemosphere**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 633-646, Apr. 2011.
- RASCIO, N.; NAVARI-IZZ, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it?: and what makes them so interesting? **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 1, p. 169-181, Jan. 2011.
- ROYCHOWDHURY, T. et al. Arsenic and other heavy metals in soils from an arsenic-affected area of West Bengal, India. **Chemosphere**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 605-618, Nov. 2002.
- SALT, D. E. et al. Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, n. 4, p. 1427-1433, Dec. 1995.
- SANTOS, J. A. G. et al. Optimum P levels for arsenic removal from contaminated groundwater by *Pteris vittata* L. of different ages. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 26-66, Jan. 2010.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCHICKLER, V.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 1, p. 39-44, Jan. 1999.

SCHMOGER, M. E. V. et al. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n. 3, p. 793-802, Mar. 2000.

SHAW, A. J. **Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects**. New York: CRC, 1989. 355 p.

SHEPPARD, S. C. Summary of phytotoxic levels of soil arsenic. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 64, n. 3/4, p. 539-550, Sept. 1992.

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

SMITH, A. H. et al. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 78, n. 9, p. 1093-1103, Sept. 2000.

SMITH, E. et al. Arsenic in the soil environment: a review. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 64, n. 1, p. 149-195, Jan. 1998.

SRISVATAVA, M. et al. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 364, n. 1, p. 24-31, Jan. 2006.

SUN, Y. et al. Phytoremediation for co-contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals using ornamental plant *Tagetes patula*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 186, n. 3, p. 2075-2082, Feb. 2011.

SUNDARAM, S. et al. Arsenate-activated glutaredoxin from the arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. regulates intracellular arsenite. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, n. 10, p. 6095-6101, Mar. 2008.

TRIPATHI, R. D. et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 158-164, Mar. 2007.

TU, C.; MA, L. Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.

TU, S. et al. Arsenic absorption, speciation and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* in the presence of phosphorus. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 51, n. 1, p. 121-131, Jan. 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Arsenic treatment technologies for soil, waste and water**: report EPA-542-R-02-004. Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidantes in oxidative stress induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar. 2006.

WANG, J. et al. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 3, p. 1552-1561, Nov. 2002.

WANG, H. B. et al. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 225-233, Jan. 2007.

WOJCIK, M. A. et al. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 48, n. 1, p. 145-155, Feb. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria series: arsenic**. Washington, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/pcs/pcs/ehc/summaries/ehc_224.htm>. Acesso em: 12 jan. 2012.

XIE, Q. E. et al. The arsenic hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, n. 22, p. 8488-8495, Oct. 2009.

ZHANG, W. et al. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 300, n. 1, p. 167-177, Feb. 2002.

ZHAO, F. J. et al. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 181, n. 4, p. 777-794, Mar. 2009.

ZHOU, Y. et al. Enhancement of recombinant enzyme activity in cpxA-deficient mutant of Escherichia coli. **Journal Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 110, n. 4, p. 403-407, Oct. 2010.

**CAPÍTULO II- ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE ARSÊNIO EM DUAS
ESPÉCIES TROPICAIS DE PTERIDÓFITAS**

RESUMO

A fitoextração é uma técnica remediadora importante para áreas contaminadas por arsênio (As). Estudos da tolerância de espécies vegetais tropicais cultivadas em níveis crescentes de contaminação, relacionados com a sua fisiologia, apresentam grande relevância para o emprego da fitoextração em áreas contaminadas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o potencial fitoextrator de As das espécies *Thelypteris salzmannii* (Fée) C. V. Morton e *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) e investigar a atividade de enzimas antioxidantes para neutralização do efeito do As nessas espécies. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva, em casa de vegetação. Testaram-se as concentrações 0, 10, 25, 40 e 50 mg As L⁻¹. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizados, com quatro repetições. Os resultados mostraram que o aumento das concentrações na solução nutritiva afetou a produção de matéria seca e a atividade enzimática da SOD e APX, de maneira distinta entre as espécies. O aumento das concentrações de As testadas proporcionou um maior teor de As nas raízes. A proporção da concentração de As da parte aérea pela concentração do elemento em solução foi maior que 1 em todos os tratamentos. Já o índice de translocação para parte aérea foi, no máximo, de 77% na espécie *Dicranopteris flexuosa*.

Palavras-chave: arsênio, fitorremediação, samambaia

ABSTRACT

Phytoextraction is an important technique used for decontamination of areas polluted by arsenic. Consequently, an understanding of the physiological responses to tolerance of tropical species subjected to increasing levels of contamination is fundamental before considering their use as phytoextractors in contaminated areas. The objective of this study was to assess the arsenic (As) uptake and the tolerance of *Thelypteris salzmannii* (Fée) C. V. Morton e *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) and to investigate the activity of antioxidant enzymes to neutralize the effect of the element. The plants were cultivated in nutrient solution in a greenhouse under controlled conditions. Arsenic was tested at concentrations of 0, 10, 25, 40 and 50 mg L⁻¹. The experimental set-up was a block design, with four replicates. The results showed that increasing As concentrations in the nutrient solution affected the dry matter production and the activity of the enzymes superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. Increasing concentrations of As provided greater content of this element in the roots. The ratio of As shoot concentration over the available concentration was greater than 1 in all treatments. Nevertheless, the rate of translocation to shoots was at a maximum of 77% in *Dicranopteris flexuosa*.

Key words: arsenic, phytoremediation, fern

1. INTRODUÇÃO

A poluição do solo tem merecido atenção especial, nos últimos anos, por apresentar sérios riscos à saúde humana e à qualidade do ambiente. Isso ocorre devido ao crescente desenvolvimento da agricultura, dos centros urbanos, das atividades industriais e de mineração, que promovem o aumento na produção de resíduos, os quais podem vir a constituir fontes de contaminação ambiental, devido à possível presença de elevadas concentrações de elementos-traço, como o arsênio (As), que é introduzido no ambiente por meio de processos geológicos e antropogênicos.

O As encontra-se exposto à superfície do solo sofrendo alterações em sua forma, podendo ser disseminado pela água e pelo ar, entrando na cadeia trófica. A acumulação do As por plantas é uma maneira promissora removê-lo, em ambientes poluídos. Nos últimos anos, o acúmulo e a redistribuição de As nas plantas têm sido investigados, bem como os mecanismos fisiológicos relacionados a essa acumulação (KERTULLIS-TARTAR et al., 2009). A fitorremediação tem sido reconhecida como uma técnica promissora para descontaminação ambiental (LINDBLOM et al., 2006; SUN et al., 2011), de baixo custo e que gera o mínimo de perturbação ao solo, quando comparada com outras técnicas (HENRY, 2000). Consiste no uso de plantas para remover, imobilizar ou tornar os contaminantes inofensivos ao ecossistema.

A planta adequada para o processo de fitoextração de As deve ser tolerante a altos níveis deste elemento, acumular grandes quantidades na parte aérea, em relação às raízes ter alta taxa de crescimento, sistema radicular abundante e produzir muita biomassa (GARBISU; ALKORTA, 2001). Infelizmente, a maioria das plantas hiperacumuladoras de elementos-traço tem baixa produção de biomassa (REEVES; BAKER, 2000).

A descoberta de plantas com capacidade de acumular grandes quantidades de elementos-traço resultou em avanços no uso de plantas na

remediação de solos contaminados (BAKER et al., 2000). Logo, muitos estudos têm sido conduzidos para identificar plantas capazes de acumular elevadas concentrações de As em sua biomassa.

Ma et al. (2001) identificaram a primeira planta hiperacumuladora de As, a samambaia *Pteris vittata* L., cuja concentração de As na parte aérea alcançou de 23 a 1000 mg As kg⁻¹. Zhao et al. (2009) identificaram outras samambaias da ordem Pteridales com características semelhantes quanto à absorção de As, como *Pteris cretica*, *Pteris longifolia* e *Pteris umbrosa*. Srivastava et al. (2006) observaram que uma nova espécie de samambaia, *Pteris biaurita* L., acumulou quantidade de As semelhante àquela de *P. vittata*, quando as duas espécies foram cultivadas em 50 µg As L⁻¹. Wang et al. (2007) encontraram outra samambaia, *Pteris fauriei*, que acumulou mais de 1.000 mg As kg⁻¹ na parte aérea. Depois disso, Xie et al. (2009) listaram várias espécies de plantas que hiperacumulam As. A maioria das espécies estudadas é de clima temperado, sendo escassas as informações a respeito desta característica para espécies tropicais.

Apesar da existência de pesquisas em que tem sido demonstrada a atuação das enzimas antioxidantes no processo de tolerância vegetal ao As, são desconhecidas informações destes mecanismos em samambaias tropicais a este metaloide. Sabe-se que as plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes. O As, assim como metais e outros metaloides, parecem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que tendem a potencializar os efeitos tóxicos dos poluentes (MASHER et al., 2002). O sistema antioxidativo em plantas inclui a ação de mecanismos enzimáticos, como aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), entre outras.

A capacidade de absorção e acumulação de As dessas novas espécies vegetais cultivadas sob elevados teores de As ainda é desconhecida, bem como

sua produção de biomassa e adequabilidade para uso em projetos de fitorremediação. Este estudo foi conduzido com o objetivo de determinar o efeito do arsenato (As^{+5}) no crescimento, na absorção e na translocação do As por *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa*, bem como o efeito do As sobre as enzimas antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As espécies de samambaias utilizadas nesse estudo *Thelypteris salzmannii* (Fée) C.V. Morton e *Dicranopteris flexuosa* (Schrader) foram coletadas no Parque Quedas do Rio Bonito, nos municípios de Carrancas e Lavras, MG, respectivamente. Estas espécies foram multiplicadas em casa de vegetação por meio da germinação *in vivo*, utilizando-se vasos plásticos contendo um extrato composto por 1/3 da capacidade total, em sua porção inferior, de pedras de aquário, 1/3 de areia grossa lavada e 1/3 de substrato (pó de xaxim). Após a germinação, as samambaias foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato Plantmax. Nestes, as plantas permaneceram até o momento de serem utilizadas em experimentos para avaliar o potencial fitorremediador.

As plantas com peso semelhantes (5 g) foram utilizadas para o transplântio em sistema hidropônico. Os experimentos para fitoextração de As por *Thelypteris salzmannii* (Fée) C.V. Morton e *Dicranopteris flexuosa* (Schrader) foram realizados em diferentes períodos.

As plântulas permaneceram, por duas semanas, em solução de Hoagland e Arnon (1950) 20% da força iônica para adaptação sob aeração constante. As soluções foram trocadas semanalmente, mantendo-se o pH da solução em 5,5, com adição de NaOH ou HCl 0,1 mol L⁻¹, quando necessário e renovando-se as concentrações de As.

Cinco tratamentos constituídos de concentrações crescentes de As, 0, 10, 25, 40 e 50 mg L⁻¹ foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, totalizando 20 parcelas para cada espécie vegetal. O As foi fornecido como Na₂HAsO₄·7H₂O.

As plantas foram coletadas 15 dias após a exposição às doses de As e a parte aérea e as raízes foram separadas. As raízes foram lavadas abundantemente, em água de torneira, depois imersas em solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl e, por fim, lavadas em água destilada para a remoção do As aderido superficialmente às raízes (TU et al., 2004). As raízes e a parte aérea foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, até peso constante. Após o registro das massas da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), o material vegetal foi triturado em moinho tipo Wiley.

O material vegetal foi digerido pelo protocolo do método 3051 A USEPA (2002), utilizando-se 0,5 g de material vegetal em 10 mL de HNO₃ concentrado em forno de micro-ondas com tubos de Teflon® PTFE, à pressão de 0,76 MPa por dez minutos, à temperatura de, aproximadamente, 175°C e à pressão de 0,76 MPa. Após a digestão, o material digerido foi filtrado e seu volume completado para 20 mL, com água destilada. Para fins de controle da precisão e exatidão das análises, para cada grupo de 10 amostras analisadas, havia uma amostra de material de referência do NIST (SRM 1547 - Peach Leaves) com teor de As conhecido e uma amostra em branco. O teor de As foi, então, determinado por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite, em equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800. A recuperação média obtida para As no material de referência foi de 89%.

O fator de translocação (FT) e o fator de bioacumulação (FB) foram estimados da seguinte maneira (MA et al., 2001; SRIVASTAVA et al., 2005):

$$FT = \frac{\text{concentração do elemento na parte aérea}}{\text{concentração do elemento na raiz}}$$

$$FB = \frac{\text{concentração do elemento na planta}}{\text{concentração do elemento na solução}}$$

Para verificar os efeitos da absorção do As nos mecanismos bioquímicos das plantas, foram analisadas enzimas do estresse oxidativo vegetal, sendo catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX).

A CAT foi determinada segundo método de Havir e McHale (1987), em que uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo fosfato de potássio 200 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mmol L⁻¹, incubado a 28°C. A atividade desta enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio.

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O meio de reação adicionado ao extrato enzimático foi composto por: tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8) metionina 14 mmol L⁻¹, EDTA 0,1 μmol L⁻¹, NBT 75 μmol L⁻¹ e riboflavina 2 μmol L⁻¹. Os tubos contendo o meio de incubação mais a amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W, por 10 minutos. Foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra como controle. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima)/(A560 controle sem enzima) x 100. Uma unidade da SOD foi definida pela quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da APX foi realizada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato

de potássio 50 mmol L^{-1} , pH 6,0, ácido ascórbico $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e H_2O_2 1 mmol^{-1} . O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 290 nm, a 25°C . A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e expressa em μmol de ácido ascórbico $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003). As equações de regressão foram determinadas pelo melhor ajuste, por meio do programa SigmaPlot (version 12.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do arsenato no crescimento e na atividade enzimática das plantas

Durante o experimento, as plantas apresentaram lesões e necroses marginais a partir da primeira semana de exposição a 50 mg As L^{-1} (Figura 1). As plantas toleraram o estresse causado pelo As durante todo o período experimental, pois não foi observada a morte das plantas.



Figura 1 Crescimento da parte aérea da *Thelypteris salzmannii* (A) e *Dicranopteris flexuosa* (B), na concentração de 50 mg As L⁻¹. Foto obtida no 10º dia após a exposição ao As

A adição de As influenciou a produção de matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), em ambas as espécies vegetais (Figura 2A e 2B). A

MSPA da *D. flexuosa* do tratamento controle (3g vaso^{-1}) reduziu cerca de 50%, comparada com a do tratamento 50 mg As L^{-1} ($1,6\text{ g vaso}^{-1}$). Nenhuma variação significativa da MSPA foi observada além da dose de 50 mg As L^{-1} (Figura 2A). Em contraste, a MSR reduziu linearmente do controle ($1,4\text{ g vaso}^{-1}$) para a dose 40 mg As L^{-1} ($0,6\text{ g vaso}^{-1}$) (Figura 2A). As plantas de *D. flexuosa* apresentaram redução de 62% e 57%, para MSPA e MSR, respectivamente (Figura 2A), em relação às plantas-controle, na maior dose de As. A redução do sistema radicular da *D. flexuosa*, devido à presença de doses crescentes de As, limitou a absorção de água e nutrientes com reflexo no crescimento da MSPA, um dos principais componentes na seleção de plantas para a fitorremediação de As.

A MSPA *T. salzmannii* variou de 2,7 (controle) para 2,3 (10 mg As L^{-1}), para $1,8\text{ g vaso}$ (nos tratamentos $25, 40$ e 50 mg As L^{-1}), redução de 15% e 33%, respectivamente, quando comparada com a do controle. Essa redução mais gradual observada para a MSPA de *T. salzmannii* pode, em grande parte, ser explicada pela redução gradual da MSR (Figura 2B). A MSR variou de 0,9 (controle) para 0,7 (10 mg As L^{-1}), para $0,6\text{ g vaso}$ (nos tratamentos $25, 40$ e 50 mg As L^{-1}). O menor efeito do As no sistema radicular de *T. salzmannii* resultou em redução mais gradual de MSPA e MSR da planta. *T. salzmannii* apresentou redução na MSPA em 55% e na MSR, em 22% (Figura 2B).

O resultado deste estudo indica que as duas espécies estudadas reduziram a produção de biomassa com o aumento da dose de As na solução de crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, demonstrando que o aumento na concentração de As no meio de crescimento pode diminuir o crescimento e o desenvolvimento da planta (LIU et al., 2007).

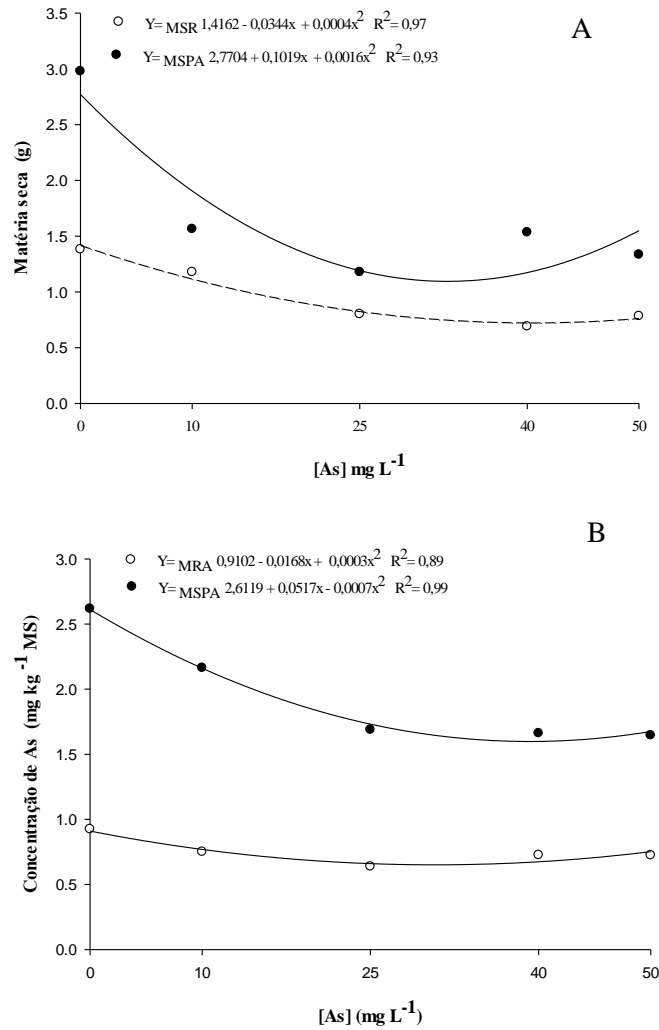


Figura 2 Produção de matéria seca de raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) de *Dicranopteris flexuosa* (A) e de *Thelypteris salzmannii* (B) cultivadas em solução nutritiva contendo concentrações crescentes de arsênio

3.2 Teor de As nas raízes e parte aérea

A concentração de As na raiz e na parte aérea das duas espécies vegetais aumentou com o aumento das doses de As em solução (Figuras 3 A-B). Ambas as espécies apresentaram maior concentração de As nas raízes do que na parte aérea. Resultados semelhantes foram encontrados com outras espécies vegetais não acumuladoras, como *Brassica juncea* (SRIVASTA et al., 2010), *Thelypteris palustris* e *Boston fern* (TU; MA, 2003), aveia e azevém (MELO, E. et al., 2009; MELO, R. et al., 2009). Esses resultados são opostos àqueles relatados para as espécies hiperacumuladoras, como a *Pteris vittata* (MA et al., 2001) e *Pityrogramma calomelanos* (FRANCESCONI et al., 2002), as quais apresentam maior concentração de As na parte aérea. Isso demonstra que as espécies vegetais utilizadas neste estudo não possuem a estratégia de hiperacumulação (Figuras 3A e 3B), evidenciando, assim, pouca translocação da raiz para a parte aérea. Esse comportamento também foi constatado por outras samambaias do gênero *Pteris* (TU; MA, 2003). Essa diferença de comportamento entre as espécies pode ter base genética ou fisiológica, como a possível existência de fitoquelatinas nas raízes, capazes de complexar e transportar o As para o vacúolo, evitando, assim, a translocação para a parte aérea (MA et al., 2001).

Em solos não contaminados, teores entre 0,009 e 1,0 mg As kg⁻¹ de matéria seca são comumente apresentados por plantas (KABATAS-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Wang et al. (2007) observaram que a espécie hiperacumuladora de As *Pteris vittata* apresentou concentrações superiores a 2.000 mg As kg⁻¹, quando exposta a 50 mg As kg⁻¹, em solo. Já *Pteris ensiformis*, espécie não hiperacumuladora de As, apresentou a concentração de aproximadamente 100 mg As kg⁻¹ de As na matéria seca, quando exposta à mesma concentração de As.

A espécie *Dicranum flexuosa* utilizada neste trabalho, apesar de não ser hiperacumuladora, apresentou teor elevado de As na parte aérea, sendo de 780,76 mg As kg⁻¹, quando exposta a 50 mg As L⁻¹ em solução nutritiva, em comparação a *Pteris ensiformis*, que acumulou, na parte aérea, 377 mg As kg⁻¹, quando exposta à mesma concentração de As em solução nutritiva (SRIDOKCHA et al., 2005).

Acredita-se que a capacidade que algumas plantas apresentam de sobreviver em locais contaminados com As esteja relacionada a alguns mecanismos de tolerância ao metaloide e ou de destoxificação desse elemento, mecanismos estes que incluem produção de quelatos, compartimentalização, biotransformação e reparo celular (GONZAGA et al., 2006).

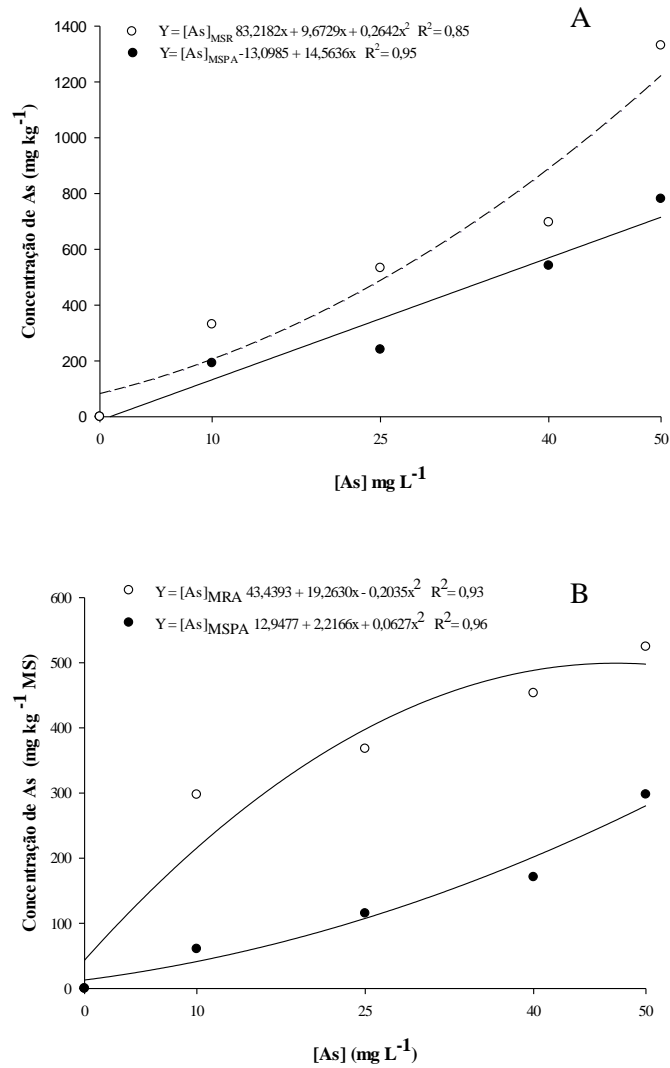


Figura 3 Concentração de As na parte aérea e raízes de As em *Dicranum flexuosa* (A) e *Thelypteris salzmanni* (B) cultivadas sob concentrações crescentes de As em solução nutritiva

3.3 Efeito do arsênio na atividade enzimática das plantas

A exposição das plantas ao As pode perturbar a homeostase celular e aumentar a produção de diversas espécies ativas de oxigênio, designadas como espécies reativas de oxigênio (EROS), como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio, (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), que são produzidos continuamente pelo metabolismo vegetal (FOYER; NOCTOR, 2005). As plantas têm um sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático que permite a detoxificação das EROs e a proteção das células vegetais de danos oxidativos (GRATÃO et al., 2005). A exposição das plantas ao As pode prejudicar ou estimular as enzimas envolvidas nos processos de detoxificação. Baixos níveis de EROS sugerem respostas adaptativas, enquanto altas concentrações de EROS causam danos severos, iniciando a morte celular (BENAVIDES et al., 2005).

A destruição eficiente das EROs requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o ascorbato peroxidase (APX).

Em experimentos envolvendo tolerância de samambaias a estresse com As em solução nutritiva, tem-se observado aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidativo, devido ao aumento na produção de EROs (SINGHE et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2006, 2010). A SOD é uma enzima que faz parte de um grupo responsável pela eliminação destes radicais livres formados. A SOD é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo nas células. Essa enzima catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido (O_2^-) (GRATAO et al., 2005). A elevação dessa atividade indica ter ocorrido aumento na produção de O_2^- , após exposição das plantas ao As.

A exposição das plantas ao As aumentou a atividade da SOD. Em *Dicranopteris flexuosa*, a atividade da SOD variou de 0,40 U g⁻¹ MF (controle) a 0,80 U g⁻¹ MF (50 mg As L⁻¹). A atividade da SOD aumentou 35%, 65%, 95% e 100%, nos tratamentos 10, 25, 40 e 50 mg As L⁻¹, respectivamente, quando

comparado com o controle (Tabela 1). Em *T. salzmannii*, a atividade da SOD variou de 0,63 U g⁻¹ MF (controle) a 1,59 U g⁻¹ MF (40 mg As L⁻¹). O aumento na atividade da SOD na parte aérea foi de 33%, 95%, 152% e 17%, nos tratamentos 10, 25, 40 e 50 mg As L⁻¹, respectivamente, comparado ao controle (Tabela 1). A maior eficiência da *T. salzmannii* em eliminar radicais livres explica, em parte, por que a redução da MSR e MSPA foi mais gradual nessa espécie do que em *Dicranopteris flexuosa*. Esses resultados confirmam a importância dessa enzima como parte do mecanismo de defesa antioxidante, o que confere às plantas maior tolerância ao As.

De modo semelhante ao observado neste trabalho, o aumento da atividade da SOD tem sido relatado por diversas espécies vegetais expostas ao As. *Pteris vittata*, hiperacumuladora de As. Cultivada com 0, 150 e 300 µmol As L⁻¹ (0, 11,25 e 22,5 mg As L⁻¹) em solução nutritiva, aumentou a atividade da SOD, com a elevação da concentração de As no meio (SRIVASTAVA et al., 2006). Felipe et al. (2009), em estudo com *Crotalaria spectabilis*, obtiveram o mesmo comportamento.

A atividade isolada da SOD não é suficiente para a manutenção da homeostase celular frente à produção de EROS, já que o subproduto de sua ação é o H₂O₂, também considerado tóxico as plantas. Portanto, faz-se necessária a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o H₂O₂ (APEL; HIRT, 2004). A CAT, enzima antioxidante produzida por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados e metalóides, é responsável pela metabolização do H₂O₂ em H₂O e O₂ (GRATÃO et al., 2005).

A concentração da CAT nos tratamentos 10, 25, 40 e 50 mg As L⁻¹ foi 79%, 655%, 302% e 47% maior do que a do controle em *D. flexuosa*; e 26,0 e 37,4 maior e 7,6% e 54% menor do que o controle em *Thelypteris salzmannii*, respectivamente. Como a atividade da CAT é complementar à da SOD, esperava-se que, nos tratamentos em que houve maior produção de SOD,

também houvesse maior concentração de CAT e isso não aconteceu, para as duas espécies avaliadas.

Na literatura são encontradas espécies que aumentam a atividade dessa enzima, que a mantêm constante ou que diminuem na presença de elementos-traço (GRATÃO et al., 2005). Em espécies hiperacumuladoras e não hiperacumuladoras de As foram obtidos resultados semelhantes aos aqui encontrados para o comportamento da CAT na parte aérea. Cao et al. (2004), trabalhando com *Pteris vittata* exposta a cinco diferentes concentrações de As, observaram que a atividade da CAT sofreu aumentos apenas em baixas concentrações, tendo sua atividade reduzida em concentrações maiores do metaloide. Assim, fica evidente que a CAT tem sua atividade aumentada em espécies de samambaias em baixas concentrações de As.

Vários fatores podem afetar a atividade da CAT, como tipo de metal ou metaloide, sua concentração, o tempo e a época de exposição e a espécie vegetal, o que, de certa forma, pode fazer com que a atividade da enzima sofra grandes variações (PATRA et al., 2004). Tais observações ficam evidentes em diversos trabalhos, como no de Wu et al. (2003), em que houve aumento na atividade da catalase quando quatro genótipos de cevada foram expostos ao cádmio. No entanto, Carvalho (2010) não observou variações na atividade da CAT ao expor *Gomphrena elegans* em diferentes concentrações de cádmio e zinco.

A destoxificação do H_2O_2 pelas plantas é realizada de forma mais eficiente pelo ascorbato (NOCTOR; FOYER, 1998). A enzima ascorbato peroxidase (APX) utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir o H_2O_2 a H_2O , gerando duas moléculas de desidroascorbato. Das muitas funções atribuídas ao ascorbato, relativamente poucas são bem caracterizadas. Porém, está claro que o ascorbato é o principal antioxidante primário reagindo diretamente com o OH, H_2O_2 e O_2^- , assumindo importante função na fitoproteção e na regulação da fotossíntese (NOCTOR; FOYER, 1998).

A atividade da APX aumentou significativamente com o aumento das concentrações de As na solução de cultivo (Tabela 1). As espécies de plantas utilizadas no estudo apresentaram padrão de resposta diferente (Tabela 1). A atividade da APX nos tratamentos em que o As estava presente foi sempre maior do que nas plantas controle, para ambas as espécies estudadas. A atividade de APX na parte aérea de *Dicranopteris flexuosa* foi de 691,8; 2095,2; 2240; 7; 3.464,3 e 3.964,3 ($\mu\text{mol ascorbato g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$), enquanto em *Thelypteris salzmannii*, foi de 666,7, 976,2, 1.888,9, 1.982,1 e 2.577,4 ($\mu\text{mol ascorbato g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$), para as doses de 0, 10, 25, 40 e 50 mg As L⁻¹, respectivamente. Essa diferença de valores pode ser atribuída ao maior grau de estresse das raízes de *D. flexuosa*, quando comparado ao de *T. salzmannii*. Há evidência da existência de um sinal de estresse oxidativo transportado das raízes para as folhas (VITORIA et al., 2001). Tal mecanismo de sinalização foi reportado, por Karpinski et al. (1999), como sendo responsável pelo aumento da transcrição da APX em folhas.

Devido à importância dessa enzima na defesa antioxidante das plantas, o aumento de sua atividade tem sido apresentado por várias espécies, quando expostas a diferentes agentes tóxicos. Como observado em *Dicranopteris flexuosa* e *Thelypteris salzmannii*, neste trabalho, *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* submetidas a diferentes doses de As apresentaram incremento na atividade da APX, em todas as concentrações estudadas (FELIPE et al., 2009).

A atividade dessas enzimas é essencial em espécies hiperacumuladoras e não hiperacumuladoras. A atuação dessas enzimas depende da espécie estudada, dos elementos e de suas concentrações, bem como do tempo de exposição (GRATÃO et al., 2005).

Tabela 1 Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (c) em *Dicranopteris flexuosa* e *Thelypteris salzmannii* sob concentrações crescentes de As (desvio padrão em parênteses)

Tratamentos	SOD	CAT	APX
As (mg L ⁻¹)	(U g ⁻¹ MF)	($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ MF min ⁻¹)	($\mu\text{mol Ascorbato g}^{-1}$ MF min ⁻¹)
..... <i>Dicranopteris flexuosa</i>			
0	0,40 (0,10)	33,33 (1,71)	691,80 (184,09)
10	0,54 (0,06)	59,90 (3,13)	2095,24 (291,85)
25	0,66 (0,07)	251,66 (4,01)	2240,74 (268,60)
40	0,78 (0,14)	134,00 (5,88)	3464,28 (303,57)
50	0,80 (0,15)	49,00 (7,93)	3964,29 (376,71)
..... <i>Thelypteris salzmannii</i>			
0	0,63 (0,03)	105,98 (4,00)	666,67 (83,62)
10	0,84 (0,04)	134,00 (12,52)	976,19 (33,67)
25	1,23 (0,08)	145,66 (20,88)	1888,89 (172,31)
40	1,59 (0,35)	99,00 (16,03)	1982,14 (272,85)
50	0,74 (0,01)	48,76 (4,32)	2577,38 (244,12)

Os resultados de atividade enzimática permitem a concluir que a atividade da SOD em *T. salzmannii*, na ausência de As (0,63 (U g⁻¹ MF)), é 157% maior do que a apresentada por *D. flexuosa* (0,40 U g⁻¹ MF). Essa concentração naturalmente mais alta de antioxidante SOD em *T. salzmannii* garante a essa espécie a capacidade de reduzir de oxigênio livre no tecido

vegetal, diminuindo o estresse da planta. A concentração de APX nas duas espécies aumentou com a dose de As presente na solução. Contudo, a concentração de APX na espécie mais estressada *D. flexuosa* foi maior do que na espécie menos estressada *T. salzmanntil*.

3.4 Fator de translocação e de bioacumulação

As plantas diferem na sua habilidade em retirar, acumular e tolerar o As, podendo ocorrer diferenças marcantes entre espécies, variedades de uma mesma espécie e, também, nos tecidos da planta.

Plantas capazes de absorver e reter o metaloide na parte aérea e que apresentam concentrações maiores que $1.000 \text{ mg As kg}^{-1}$ são consideradas hiperacumuladoras de As (GONZAGA et al., 2006; MA et al., 2001).

Para que uma espécie vegetal possa ser identificada como tolerante e ou hiperacumuladora, além da concentração de As (SRIVASTANA et al., 2006; WANG et al., 2007; WEI; WANG, 2006), são utilizados outros fatores que caracterizam melhor este comportamento, como o fator de translocação (FT) e o fator de bioacumulação (FB). O FT demonstra a eficiência da planta em transportar um elemento da raiz para a parte aérea. Já o FB avalia a eficiência da planta em acumular o elemento em relação à concentração do meio (NASCIMENTO; XING, 2006). Ambos os fatores, quando superiores a 1, confirmam a característica de hiperacumulação da planta (MA et al., 2001).

Os fatores de translocação e bioacumulação para *Thelypteris salzmanii* e *Dicranopteris flexuosa* são apresentados na Tabela 2.

O FT de *Thelypteris salzmanii* e *Dicranopteris flexuosa* não foi superior a 1 em nenhuma concentração, ou seja, houve certa restrição na translocação do As para a parte aérea, pois a concentração de As na raiz foi maior que na parte aérea.

Tabela 2 Fatores de translocação e bioacumulação (parte aérea e raiz) para As em plantas de *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa* expostas a concentrações crescentes de As em solução nutritiva (desvio padrão em parênteses)

Tratamentos As (mg L ⁻¹)	Fator		
	Translocação	Bioacumulação	
		Parte aérea	Raiz
..... <i>Dicranopteris flexuosa</i>			
10	0,580 (0,13)	19,210 (2,29)	33,120 (6,34)
25	0,450 (0,15)	8,282 (1,36)	21,314 (3,14)
40	0,770 (0,14)	11,156 (3,48)	17,413 (1,23)
50	0,586 (0,21)	15,615 (0,65)	26,614 (5,09)
..... <i>Thelypteris salzmannii</i>			
10	0,204 (0,01)	6,059 (0,56)	29,748 (0,41)
25	0,310 (0,06)	4,605 (1,06)	14,714 (0,42)
40	0,370 (0,08)	4,271 (1,00)	11.335 (0,8)
50	0,567 (0,06)	5,954 (0,53)	10,932 (0,35)

Srisvastava et al. (2006), em estudo com diferentes hiperacumuladoras de As, verificaram que, em todas as concentrações estudadas, *P. vittata*, *P. biruata* e *P. cretica* apresentaram maior concentração na parte aérea que nas raízes, o que resultou em FT foi maior que 1. A alta concentração de As na parte aérea indica eficiência em translocar As da raiz para a parte aérea, o que é uma característica de plantas hiperacumuladoras.

Arsênio e fósforo (P) são análogos quimicamente no solo (SCHMÖGER et al., 2000; TRIPATHI et al., 2007; TU; MA, 2003), porém, na planta, eles têm

comportamento diferenciado (TU; MA, 2003). Wang et al. (2002) observaram que, com o aumento do suprimento de P, a absorção de As diminui bastante, sendo esse efeito mais pronunciado na parte aérea. O mesmo aconteceu com o aumento do suprimento de As, que ocasionou decréscimo na concentração de P nas raízes, mas não na parte aérea. O efeito da inibição é mais aparente quando as concentrações de P e As na solução nutritiva são comparáveis.

Os resultados mostram que, para *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa* na maior concentração de As na solução de cultivo (50 mg L^{-1}), o FT foi de 0,57 e 0,59, respectivamente, ou seja, $\text{FT} < 1$. Os resultados deste trabalho encontram concordância com o de outros estudos, nos quais também de observou FT abaixo de 0,99. Isso revela a grande capacidade dessas espécies em reter o As absorvido nas raízes, o que está relacionado à restrita produção de matéria seca de raízes observada (Figuras 2a e 2b).

As plantas desenvolveram algumas estratégias para sobreviver quando expostas a altas concentrações de elementos-traços (MEMON et al., 2009). Por meio da exclusão, por exemplo, a planta pode minimizar a absorção e, mesmo que apresente alta concentração do elemento nas raízes, pode restringir a sua translocação para parte aérea. Os vacúolos são os principais sítios de sequestro de elementos-traço nas células das raízes.

De acordo com Padmavathiamma et al. (2009), a eficiência de plantas para serem usadas como fitoestabilizadoras é determinada pela retenção do metal nas raízes e uma menor translocação. Dessa forma, a planta continua crescendo, produzindo biomassa e dificultando sua dispersão (ERNEST, 2005; GARDEA-TORRESDEY et al., 2005; WONG, 2003), bem como a entrada na cadeia trófica (FRANCESCONI et al., 2002; FRENCH et al., 2006).

O FB das raízes foi maior que o da parte aérea, em *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa*. Em ambas as espécies, os fatores de

bioacumulação (raízes e parte aérea) foram maiores na menor concentração de As.

A espécie *Dicranopteris flexuosa*, na dose de 50 mg As L⁻¹, apresentou elevada concentração de As na parte aérea (781 mg kg⁻¹), com valores 150 vezes maiores que as concentrações normalmente encontradas nas plantas. Essa espécie também demonstrou alta capacidade de bioacumulação de As na parte aérea. O conjunto dessas características permite a classificação dessa espécie como tolerante ao As, assim como sua indicação para programas de fitorremediação de áreas contaminadas com esse elemento.

4. CONCLUSÕES

1. As duas espécies de pteridófitas não apresentaram características de plantas hiperacumuladoras de As, pois a concentração de As na parte aérea não excedeu 1.000 mg kg⁻¹. Além disso, estas espécies apresentaram baixa eficiência em translocar o As para a parte aérea.
2. O aumento na concentração de As na solução nutritiva reduziu a produção de matéria seca de raízes e da parte aérea em *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa*.
3. A adição de As em plantas de *Thelypteris salzmannii* e *Dicranopteris flexuosa* resultou no aumento na atividade enzimática da SOD e APX.

REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BAKER, A. J. M. et al. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal polluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis, 2000. p. 85-107.
- BENAVIDES, P. M. et al. Cadmium toxicity in plant. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.
- CAO, X. et al. Antioxidative responses to arsenic the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L). **Environmental Pollution**, Barking, v. 128, n. 3, p. 317-325, Feb. 2004.
- CARVALHO, M. T. V. F. **Fitoextração de Cd e Zn e atividades enzimáticas antioxidantes em ecótipos de *Gomphrena elegans***. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- FELIPE, R. T. A. et al. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 245-254, mar./abr. 2009.
- FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA, 2003. Software.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, July 2005.
- FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potencial phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **The Science of the Total Environment**, Oxford, v. 284, n. 1, p. 27-35, 2002.
- FRENCH, C. J. et al. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. **Environmental Pollution**, Barking, v. 141, n. 3, p. 387-395, June 2006.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 229-236, May 2001.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. et al. Phytoremediation of heavy metal and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 249, n. 17, p. 1797-1810, Sept. 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 11, p. 309-314, Oct. 1977.

GONZAGA, M. I. S. et al. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. **Environmental Pollution**, Barking, v. 143, n. 2, p. 254-260, Apr. 2006.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, n. 6, p. 481-494, Feb. 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**. Washington: EPA, 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.clu-in.gov>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007. 550 p.

KARPINSKI, S. et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. **Science**, New York, v. 284, n. 5414, p. 654-657, Apr. 1999.

KERTULIS-TARTAR, G. M. et al. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 10, p. 960-965, Oct. 2009.

LINDBLOM, S. D. et al. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 726-733, Apr. 2006.

LIU, L. et al. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 465-473, June 2007.

MA, L. Q. et al. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, London, v. 409, n. 1, p. 579, Feb. 2001.

MASHER, R. et al. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science**, Shannon, v. 163, n. 5, p. 961-969, Nov. 2002.

MELO, E. E. et al. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 30, n. 168, p. 479-483, Feb. 2009.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 455-465, mar./abr. 2009.

MEMON, A. R. et al. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science Pollution**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 162-175, Jan. 2009.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 299-311, 2006.

PADMAVATHIAMMA, P. K. et al. Phytoremediation of metal-contaminated soil in temperate humid regions of British Columbia, Canada. **Journal Phytoremediation**, London, v. 11, n. 6, p. 579-590, Mar. 2009.

PATRA, M. et al. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 52, n. 1, p. 199-223, Feb. 2004.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M. Metal-accumulating plants. In: RASKIN, H.; ENSLEY, B. D. (Ed.). **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment**. London: J. Wiley, 2000. p. 193-230.

SCHMOGER, M. E. V. et al. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n. 3, p. 793-802, Mar. 2000.

SINGH, N. et al. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**, Shannon, v. 16, n. 2, p. 274-282, Feb. 2006.

SUN, Y. et al. Phytoremediation for co-contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals using ornamental plant *Tagetes patula*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 186, n. 3, p. 2075-2082, Feb. 2011.

SRIVASTAVA, M. et al. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 415, p. 1335-1342, May 2005.

_____. Comparison of arsenic accumulation in 18 fern species and four *Pteris vittata* accessions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 8, p. 2691-2699, Apr. 2010.

_____. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 364, n. 1, p. 24-31, Jan. 2006.

TRIPATHI, R. D. et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 158-164, Jan. 2007.

TU, C.; MA, L. Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.

TU, S. et al. Arsenic absorption, speciation and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* in the presence of phosphorus. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 51, n. 1, p. 121-131, Jan. 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Arsenic treatment technologies for soil, waste and water: report EPA-542-R-02-004**.

Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

VITORIA, A. P. et al. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 57, n. 5, p. 701-710, July 2001.

WANG, H. B. et al. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 225-233, Jan. 2007.

WEI, C. H.; WANG, C. Arsenic accumulation by ferns: a field survey in southern China. **Environmental Geochemistry Health**, Berlin, v. 29, n. 3, p. 169-177, June 2006.

WONG, M. H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 775-780, Feb. 2003.

WU, F. et al. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 67-78, Jan. 2003.

XIE, Q. E. et al. The arsenic hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, n. 22, p. 8488-8495, Oct. 2009.

ZHANG, W. et al. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 300, n. 1, p. 167-177, 2002.

ZHAO, F. J. et al. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 181, n. 4, p. 777-794, Mar. 2009.

CAPÍTULO III- Effects of chromate and sulfate on arsenic uptake and translocation by *Pteris vittata* L.

(Normas da revista Journal of Hazardous Materials)

ABSTRACT

The effects of chromate and sulfate on the uptake and translocation of arsenate in *Pteris vittata* L. plants were investigated. *P. vittata* plants were grown in the presence of arsenate and chromate or sulfate for two weeks in hydroponic system. The concentrations of the three oxyanions were 0.05, 0.25 and 1.25 mmol L⁻¹. *P. vittata* accumulated 4,598 and 1,159 mg kg⁻¹ As in the fronds and roots, in the presence of 0.05 mmol L⁻¹ As respectively; however, addition of 0.05 mmol L⁻¹ chromate significantly reduced As uptake and translocation, with their concentrations being reduced to 330 and 1,394 mg kg⁻¹. *P. vittata* accumulated 234 and 12,631 mg kg⁻¹ Cr in the fronds and roots in the presence of 0.05 mmol L⁻¹ Cr; however, addition of 0.05 mmol L⁻¹ As significantly reduced Cr uptake and translocation, with their concentrations being reduced to 46 and 8,073 mg kg⁻¹ Cr. *P. vittata* effectively took up Cr but was ineffective in Cr translocation. Unlike chromate and arsenate, addition of sulfate increased the uptake and translocation of both chromate and arsenate. This work demonstrated that chromate and arsenate inhibited the uptake of each other, whereas sulfate enhanced uptake and translocation of both chromate and arsenate by *P. vittata*.

Keywords: *P. vittata*, hyperaccumulator, arsenic, chromium, sulfur

1 Introduction

Arsenic (As) and chromium (Cr) are highly toxic elements naturally occurring in minerals and released into the environment through anthropogenic sources, including industrial mining, agricultural and forestry activities [1,2]. Petroleum refineries [3] are also a major source of As and Cr, which can accumulate to toxic levels in the environment [4].

Arsenic is a ubiquitous contaminant of global concern, because of its persistency and toxicity at low concentration. It is classified as a Group A carcinogen to humans by the USEPA. Approximately 52,000–112,000 t of arsenic are released annually to soil from anthropogenic sources [5], as it is widely used in the production of pesticides, herbicides, and wood preservatives [6,7]. Chromium poses a significant risk to human health because of its mutagenic and carcinogenic properties [8]. Cr compounds are used in chrome plating, dyes, pigments, tanning of animal skins, dyes and wood preservatives [9, 10]. It is estimated that a million ton of chromium is released into the environment [11].

As and Cr are present in the environment in various chemical forms that differ in biological properties and toxicity. Both elements predominate in inorganic forms with different valence states. As (V) and Cr (III) are less soluble and more stable in the environment, whereas As (III) and Cr(VI) are highly soluble and mobile in the environment [12], posing a higher health risk to humans. In addition, they can be bioaccumulated by plants, though not necessarily causing phenotypic symptoms of toxicity [13,14]. Arsenic-contaminated sites often include higher levels of other heavy metals such as Cr, Cu, Pb, Cd and Zn [15,16]. Moreover, the use of chromate in the wood preservative also results in widespread contamination of As and Cr in soil and water.

Phytoremediation employs plants to mine, transfer, stabilize and remove heavy metal from polluted soils and water systems. It has received much attention because it is cost-effective and environmentally friendly [17,18,19]. *P. vittata* can accumulate large amounts of As in the biomass (up to 2%), with > 90% of the accumulated As in the fronds [20, 21]. Often soil and groundwater are co-contaminated with several metals. The potential of *P. vittata* in phytoremediation of multiple toxic metals has been investigated [22]. However, the interactive effects of As and Cr on *P. vittata* has not been examined.

Sulfur is an essential nutrient for plants and is predominantly taken up by the roots as sulfate [23]. After uptake, most of the inorganic sulfur is incorporated into organic molecules via the sulfate assimilation pathway. It is activated by ATP sulfurylase to form adenosine phosphosulfate, followed by a reduction by APS reductase to form free sulfite, which is coupled to O-acetylserine to form cysteine [24]. Cysteine can be incorporated into proteins, further metabolized to methionine and its derivatives, or used for the production of the antioxidant glutathione (GSH), and the phytochelatins (PCs) [25]. These compounds can improve the tolerance of plants to metals and metalloids through complexation and/or further sequestration of toxic forms inside cellular vacuoles [26, 27, 28].

Sulfate enhances arsenic accumulation by *P. vittata* [29, 30]. Wei and Ma [30] examined the effects of sulfate on arsenic uptake by *P. vittata*. They observed that sulfate at 15 or 30 mg L⁻¹ As enhanced arsenic uptake and translocation by *P. vittata*. However, [30] tested the influence of sulfur on arsenic accumulation in rice, and concluded that sulphur deprivation in rice increased As translocation from roots to shoots. On the other hand, a competitive uptake between sulfate and chromate has been shown in plants [31, 32, 33]. As Cr is not an essential element, plants may not have evolved a specific uptake system for it. While Cr(III) is supposed to passively enter into cells, the transport of Cr(VI) is mediated by the sulfate carrier but with lower affinity [34] and

immediately converted to Cr (III) once in the roots, possibly by the Fe^{3+} reductase enzyme [35]. Kleinman [33] showed that strongly inhibited chromate uptake by wheat plants, implying possible sharing of transporter. Furthermore, chromate uptake was shown to be stimulated after pre-cultivation on plants in sulfate-limited nutrient media.

The interactions between sulfate and chromium and/or arsenic must be considered when plants are going to be employed for the remediation of metal-contaminated sites, as the accumulation of contaminants in plant tissues might be altered by the sulfate concentration in the substrate where plants grow. The objective of this study was to determine the effects of chromate and sulfate on the uptake and translocation of arsenate by the arsenic hyperaccumulator *P. vittata*. The results from this research will provide important information about arsenate behavior in a hydroponic system and permit modeling of the uptake by *P. vittata* in the presence of chromate and sulfate at environmentally realistic concentrations.

2 Materials and methods

2.1. Experiment setup

P. vittata ferns cultivated in our lab were used. Efforts were made to ensure that plants used in experiment were uniform and of similar size. The plants were acclimatized in 0.2 strength Hoagland nutrient solution (HS) at pH 5.7 with 1 mM KOH-MES buffer for 4 weeks.

The acclimated plants were transferred to opaque containers containing 1 L of modified HS (S- and P-free) spiked with different concentrations of As, Cr and S. Three sets of experiments were conducted: 1) with Cr at 0.05 mM and arsenic concentrations at 0, 0.05, 0.25, and 1.25 mM ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 2) With As at 0.05 mM and Cr concentrations at 0, 0.05, 0.25, and 1.25 mM ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$); and 3) with As or Cr at 0.05 mM and S concentrations at 0, 0.25 and 1.25 mM (Na_2SO_4) (Sigma, St. Louis, MO). Each treatment was replicated four times. The

solution was aerated continuously and renewed twice a week during the experiment. The water loss via transpiration was replenished by frequent additions of deionized water to maintain a constant volume.

The plants were kept in a controlled room with 14-h light period at light intensity of $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ day/ night temperature and 60-70% relative humidity. Plants were harvested 14 d after the treatments.

2.2 Arsenic, chromium and sulfur analysis in plants

The harvested plants after 2 weeks of growth were separated into fronds and roots. To remove adsorbed arsenic on the roots, *P. vittata* roots were placed under running distilled water, rinsed with ice cold phosphate buffer (1 mM Na_2HPO_4 , 10 mM MES and 0.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pH 5.7) and washed once again with distilled water. The samples were oven-dried (65°C for 2 d), ground (20-mesh), digested with concentrated HNO_3 (1:1, v/v), and followed by 30% H_2O_2 (USEPA method 3050). Arsenic, chromium and sulfur in the solution were determined by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS; AA240Z, Varian Inc., CS), atomic absorption spectrometry and inductively-coupled plasma spectrometry (ICP; PerkinElmer 5300DV, Waltham, MA) via EPA Method 2007.

To determine the amounts of Cr/As precipitating on root surfaces, plant roots (0.2 g) were washed in 50 mL 1:1 v/v HNO_3 and water for 20 min and the Cr concentrations in the supernatants were determined using ICP.

2.3 Phosphorus analysis in plants

Plant samples were digested using the $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ method [36]. Because arsenate interferes with P determination using the molybdenum blue method, P was determined using a modified method of [37]. Briefly, the pH of the digestion solution was adjusted to ~5 with NaOH and HCl. Ten milliliters of the

solution was pipetted into a 20-ml glass test tube, and to this 0.5 ml of L-cysteine (5% w/v in 0.6 M HCl) was added. The test tube was capped tightly to allow arsenate reduction for 5 min at 80°C. The solution was cooled to room temperature, and P was determined by the molybdenum blue method.

2.4 Arsenic speciation in plants

For arsenic speciation, fresh samples were flash-frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. The samples were ground using liquid N₂ and extracted twice with methanol:water (1:1 v/v) under sonification for 4 h at 60°C ([38] Zhang et al., 2002). The two extracts were decanted into a 50-ml volumetric flask and diluted to 50ml with deionized water. Arsenate and arsenite were separated using an arsenic speciation cartridge (Waters SPE cartridge), which retains arsenate. Arsenic analysis was determined by GFAAS. The accuracy of arsenic speciation using the cartridges in plant tissues was determined by spiking 1.3 µM AsIII or AsV to plant methanol/water extract. There was no arsenic complexation within the cartridge and no change in redox status, since recovery of the spiked arsenic was 100% [39]. In addition, standard reference materials from the National Institute of Science and Technology (Gaithersburg, MD) and appropriate reagent blanks, internal standards and spikes were used to ensure method accuracy and precision, which was within 100 ± 10% of the expected quality control checks.

2.5. Lipid peroxidation

The amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBAR) was determined following the methods of [40] to determine lipid peroxidation in *P. vittata* fronds and roots. About 0.3 g of frozen-tissues was cut into small pieces and homogenized, using a cold mortar and pestle in ice bath with 1.5 ml of 5% (wt/v) trichloroacetic acid (TCA) solution. The homogenate was transferred into

fresh tubes and centrifuged at 10,000 x g for 10 min at room temperature. To 1 ml of the aliquot of the supernatant, 1 ml of 20% (w/v) TCA containing 0.5% (w/v) TBA and 100 μ l 4% butylated hydroxytoluene in ethanol were added. The mixture was heated at 95°C for 30 min and then quickly cooled on ice. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm and 600 nm. The TBARS content was calculated using an extinction coefficient of 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.6. Statistical methods

Treatments effects were determined by analysis of variance according to the general linear model procedure of the Statistical Analysis System [41].

3 Results and Discussion

This study determined the effects of chromate (CrVI), arsenate (AsV) and sulfate (S) on plant growth, and uptake and translocation of As and Cr by *P. vittata*. The plants were grown for two weeks in 0.2-strength Hoagland solution (S- and P-free) containing different levels of AsV (0, 0.05, 0.25, and 1.25 mM), CrVI (0, 0.05, 0.25, and 1.25 mM) and sulfate (0, 0.25 and 1.25 mM). Biomass and concentrations of As, Cr, S and P in *P. vittata* were determined.

3.1. Effects of arsenate, chromate and sulfate on *P. vittata* growth

After growing in 0.2-strength P- and S-free HS for 2 wks, *P. vittata* accumulated 2.44 and 0.93 g in the fronds and roots (Table 1). The presence of As or Cr significantly reduced the plant biomass. For instance, 0.05 mM Cr and 0.05 mM As reduced the frond biomass by 59 and 28% and root biomass and 64 and 52%. Apparently, Cr was more toxic to *P. vittata* (PV) than As at 0.05 mM. The most likely explanation for the reduction on PV biomass is the decreased the uptake of K, Mg, P, Fe and Mn in the roots as it has been reported for soybean [42].

Uptake and accumulation of Cr by various crops indicate that Cr(VI) uptake depends on metabolic energy [43]. The PV plants showed some degree of toxicity, e.g., yellowing and falling of pinna (data not shown). Cr(III) is sparingly soluble and less toxic while Cr(VI) is more soluble, mobile in solution and highly toxic to animals and plants due to its high solubility, mobility, toxicity as well as carcinogenic and mutagenic properties [43]. The biotoxicity of Cr(VI) to biological membranes due to its great oxidizing capabilities and its interference with electron transport and respiration and photosynthesis.

Despite the reduced PV biomass in the presence of As or Cr at 0.05 mM As, addition of 0.05–1.25 mM Cr improved the PV biomass, especially the fronds from 1.01 to 1.25–1.71 g (Table 1). Since the presence of Cr(VI) in the solution may inhibit the uptake of some ions, including K, the increment of K in the solution may improve the plant biomass production. At 0.05 mM Cr, addition of 0.05–1.25 mM As improved the PV biomass even more from 0.89 to 1.33–1.89 g for the fronds and from 0.45 to 0.67–0.88 g for the roots. There are several studies showing that the presence of small concentration of As in the growing solution improves the biomass production, which is in agreement with the observed improvement of PV biomass in the co-presence of As and Cr.

The biomass of PV acclimated in S-free HS, responded to S, a plant nutrient (Table 2). The typical S concentration in 0.2-strength HS is 0.4 mM, but S-free HS was used in the experiment. At 0.05 mM As, addition of 0.25 mM S increased both frond (14%) and root (53%) biomass. Increase of S from 0.25 to 1.25 mM did not seem to help plant growth. This is consistent with that *P. vittata* showed no visible toxicity symptoms when S was added to the growth medium (data not shown). However, this is not the case when 0.2–0.8 mM sulfate was added to HS containing 0, 0.2 and 0.4 mM AsV as PV biomass remained the same[29].

Several parameters have been used to indicate the metabolic stress caused by the uptake and translocation of Cr VI, such as activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase [45]. In this study, thiobarbituric acid reacting substances (TBAR) were used to determine the impact of As and Cr stress on plants. In the absence of Cr or As, the TBAR in the fronds was $12.2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ (Fig. 5a). The presence of 0.05 mM As or Cr increased TBAR to $32.4\text{--}33.0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$, indicating both caused oxidation stress in PV fronds. However, though under stress, the co-presence of As and Cr increased frond biomass by 32–49% (Table 1).

In the presence of 0.05 mM As and Cr, TBAR further increased to $40.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$, again indicating additional stress to PV. However, addition of 0.25–1.25 mM Cr didn't change TBAR. This may attribute poor Cr translocation as most of the Cr remained in the roots (Fig. 2). Unlike Cr, addition of 0.25–1.25 As further increased TABR to $54\text{--}61 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$, As concentrations in the fronds was positively correlated with TBAR ($r=0.97$).

At Cr = 0.05 mM, addition of 0.25 mM S increased the frond biomass (127%) but addition of 1.25 mM S increased both frond (139%) and root (73%) biomass compared to the control. Since Cr was more toxic to PV than As as indicated by biomass reduction (Table 1), it seemed make sense that more S was needed to alleviate Cr toxicity. However, the exact mechanism of how S alleviated As and Cr were unknown.

3.2. Chromium effect on Cr and As uptake and translocation by *P. vittata*

In the absence of Cr, little Cr was accumulated by PV, being $<20 \text{mg kg}^{-1}$ (Fig. 1a). However, after exposing to 0.05–1.25 mM Cr for 2 weeks, PV accumulated substantial amounts of Cr, with most of the Cr being concentrated in the roots (>95%). The data indicate that PV was effective in taking up Cr, but it was ineffective in translocating it to the fronds. For example, at Cr= 0.05 mM,

the roots accumulated 129 times more Cr than the fronds (6,040 vs. 47 mg kg⁻¹). The root concentrations increased to 19,188–42,653 mg kg⁻¹ when the external Cr concentration increased to 0.25–1.25 mM. To determine if the Cr was accumulated on the root surface, the roots were washed with dilute HNO₃ for 20 minutes. It seemed that most of the Cr (89–98%) was transported inside the roots (Table 3). The fact that PV accumulated 19,188–42,653 mg kg⁻¹ Cr in the roots indicates its effectiveness in Cr uptake. This was especially impressive because it was achieved in the presence of 0.05 mM As. [46] also examined the impact of Cr on As uptake by *P. vittata*. After growing for 2 wk in a hydroponic solution containing 1.9 mM Cr(VI), PV accumulated 17,427 mg kg⁻¹ Cr in the roots 1,551 mg kg⁻¹ Cr in the fronds, which was substantially less than Cr uptake in our experiment. Compared to *P. vittata* and under similar condition, *G. pseudochina* was less effective in Cr uptake, with 823 and 788 mg kg⁻¹ being accumulated in the leaves and stems [47]. Diwan [48] reported that Indian Mustard accumulated 1,680 mg Cr kg⁻¹ in the roots after growing in a hydroponic system containing 0.1 mM Cr(VI) 100 µg L⁻¹). Hence, *P. vittata* was more efficient in Cr uptake than other plants.

Cr is a toxic and nonessential element, hence plants may not possess a specific mechanism for Cr transport. Low Cr translocation observed in our experiment is consistent with literature [46, 49]. Zeng et al. [50] observed poor Cr translocation in rice as most of the Cr remained in the roots. Vacuole has been suggested to be the major site of heavy metal accumulation [51]. Zeng et al. [50] working with subcellular distribution and chemical forms of Cr in rice, suggested that vacuolar compartmentalization is an important detoxification mechanism for rice plants. In our study, the reason for the high accumulation of Cr observed in roots, could be due to the reduction of Cr(VI) to Cr(III) in roots, and the consequent Cr(III) sequestration in the root cell vacuoles and/or retention in the cell wall [52, 53, 54]. Additionally, many plants species have

low mobility of Cr (VI) due to barriers or lack of a suitable transport mechanism for Cr [55].

In the absence of Cr and 0.05 mM As, PV effectively took up As and translocated it to the fronds, with translocation factor (TF) being 26 (Fig. 1b). However, the presence of Cr significantly inhibited As translocation by PV, reducing the frond As from 4,211 to 330–439 mg kg⁻¹, >90% reduction.

It is known that PV preferentially translocates AsIII over AsV from the roots to fronds [38]. In the absence of Cr, PV translocated 1,217 mg kg⁻¹ As (fw) to the fronds, with 72% being AsIII (Fig. 4a). Addition of 0.25–1.25 mM Cr significantly reduced As translocation, with 192–94.8 mg kg⁻¹ being in the fronds and 50–63% being AsIII. So Cr reduced not only the total As in the fronds but also proportionally less AsIII was present in the fronds. Similar to fronds data, Cr reduced root uptake of As, reducing from 111 to 72.1–91 mg kg⁻¹ As. In the control, 82% of the As being AsV compared to 96% in the presence of Cr. Again, Cr reduced total As uptake, but increased the concentration of AsV in the roots, which may be partially responsible for low As translocation .

Different from the fronds, root As increased with Cr concentrations (Fig. 1b). In other words, as more Cr was accumulated in the roots (from 6,040 to 42,653 mg kg⁻¹), so did As (from 1,394 to 3,615 mg kg⁻¹). It was unclear why Cr uptake would enhance As uptake. It was possible that As entered the roots passively with Cr. Plants may passively take up large amounts of metal at phytotoxic levels through broken cell membranes. It is reported that CrVI caused plasmolysis in peripheral cells on root surfaces of bush beans, indicating that CrVI damages the plasmalemma and resulting in an increase in Cr uptake[56].

3.3 Arsenic effect on As and Cr uptake and translocation by *P. vittata*

In the absence of As, little As was accumulated by PV, < 2.02 mg kg⁻¹ (Fig. 2a). In the presence of 0.05 mM As, PV accumulated 4,211 and 160 mg kg⁻¹ As in the fronds and roots (Fig. 1b). The significant As transport of arsenic to the fronds is typical of arsenic hyperaccumulators. As discussed previously, addition of 0.05 mM Cr significantly reduced arsenic translocation, with As in the fronds and roots being 330 and 1,394 mg kg⁻¹ (Fig. 1b). The data indicates that Cr reduced both As uptake and translocation, with the impact being more significant on the latter.

With increasing external As, as expected both root and frond As concentrations increased (Fig 2a). However, PV was ineffective in translocating As in the presence of Cr. With As concentrations increasing from 0.05 to 1.25 mM, the frond (330 to 1,248 mg kg⁻¹) and root (1,394 to 3,769 mg kg⁻¹) As both increased, with TF being 0.24 to 0.33 (Fig. 2a).

The presence of Cr significantly inhibited As uptake and translocation, similarly As also reduced Cr uptake by PV (Fig. 2b). The presence of As at 0.05–1.25 mM reduced Cr from 234 to 47–110 mg kg⁻¹ in the fronds and from 11,370 to 4,965–6,040 mg kg⁻¹ in the roots.

Exposing to 0.05 mM As, PV accumulated 4,211 and 160 mg kg⁻¹ As in the fronds and roots (Fig. 1b), indicating that PV was effective in taking up and translocating As (~96%). Exposed to 0.05 mM Cr, PV accumulated 234 and 11,370 mg kg⁻¹ in the fronds and roots (Fig. 2b). Though PV was effective in taking up Cr, it was ineffective in translocating it to the fronds (~2%). Taking plant biomass into consideration (Table 1), PV accumulated 4.3 g As and 5.3 g Cr per plant. On a unit root biomass basis, then PV accumulated 7.2 g As and 11.8 g Cr per g root, demonstrating that PV was more effective in taking up Cr than As.

At 0.05mM Cr and As, PV accumulated 47 and 6,040 mg kg⁻¹ Cr (Fig. 2b) and 330 and 1,394 mg kg⁻¹ As in the fronds and roots, respectively (Fig. 1b). On per plant basis (Table 1), PV accumulated 1.2 g As and 2.8 g Cr. The reduced As (7.2 to 1.2 g or 83%) and Cr (11.8 to 2.8 g or 76%) uptake indicate that As and Cr interfered with each other's uptake by PV. However, increasing Cr from 0.05 to 1.25 mM increased root As from 1,394 to 3,615 mg kg⁻¹ (Fig. 1b). On the other hand, increasing As from 0.05 to 1.25 mM reduced root Cr from 6,040 to 4,965 mg kg⁻¹ (Fig. 2b).

This may be explained by the fact that chemical precipitation induced by roots in *P. vittata*. The observation of roots of *P. vittata* with an electron microscope revealed the formation of precipitates on the surface of roots treated with 0.05mM As and 1.25 mM Cr. The SEM X-ray microanalysis of that area showed that only elements present were: Al, S, K, Fe and Cr (Fig.5).

3.3 Sulfate effect on As and Cr uptake and translocation by *P. vittata*

As a nutrient, S helped with PV growth (Table 1). Similar to the study of Wei and Ma [29], addition of S increased As uptake and translocation by PV (Fig.3a). The S concentration in 0.2-strength HS is 0.2 mM. For example, addition of 1.25 mM S enhanced As concentrations by 28% in the fronds and by 68% in the roots (Fig. 3a)

Similar data were obtained for Cr, i.e., S addition increased both root and frond Cr concentrations (Fig. 3b). However, Schiavon et al. [31] observed negative effect of sulfate on Cr uptake by *B. juncea* for 2 d in presence of 1mM S and 2 mM Cr in hydroponic experiments. This difference indicated that uptake of Cr not only depend on the genus and species of individual plant.

4 Conclusions

Chromate and arsenate inhibited the uptake of each other, whereas sulfate enhanced uptake and translocation of both chromate and arsenate by *P. vittata*.

The addition of sulfate helped arsenic translocation from the roots to the fronds without changing arsenic speciation.

P. vittata effectively took up Cr but was ineffective in Cr translocation.

5 Acknowledgements

This research is supported in part by University of Florida, FAPEMIG and CNPq, Brazil.

6 References

- [1] X. He, M.G. Chen, G.X. Lin, L.Q. Ma. Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23620–23631.
- [2] M.J. Martínez-Sánchez, S. Martínez-López, M.L. García-Lorenzo, L.B. Martínez-Martínez, C. Pérez-Sirvent. Evaluation of arsenic in soils and plant uptake using various chemical extraction methods in soils affected by old mining activities, *Geoderma*. 160 (2011) 535-541.
- [3] A.K. Jha, A. Bose, J.P. Downey. Removal of As(V) and Cr(VI) from aqueous solution using a continuous, hybrid field-gradient magnetic separation device, *Separ. Sci. Technol.* 41 (2006) 3297–3312.
- [4] M.B.B. Sridhar, F.X. Han, S.V. Diehl, D.L. Monts and Y. Su, Monitoring the effects of arsenic and chromium accumulation in Chinese brake fern (*Pteris vittata*), *Int. J. Remote Sens.* 28 (2007) 1055-1067.
- [5] J.O. Nriagu, J.M. Pacyna, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature* 333 (1988) 134-139.

- [6] ATSDR. 2000b. Toxicological profile for chromium. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- [7] F.X. Han, W.L. Kingery, H.M. Selim, P.D. Gerard, M.S. Cox, J.L. Oldham, Accumulation and solubility of arsenic in poultry wastes and waste-amended soils, *Sci. Total Environ.* 320 (2004) 51-61.
- [8] United States Environmental Protection Agency, October, 2000, In Situ Treatment of Soil and Groundwater Contaminated with Chromium, EPA/625/R-00/00
- [9] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2001 <http://www.atsdr.cdc.gov/>
- [10] F.X. Han, A. Banin, Y. Su, D.L. Monts, M.J. Plodinec, W.L. Kingery, G.B. Triplett, Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere, *Naturwissenschaften* 89 (2002) 497-504.
- [11] J.B. Alimonti, L. Shi, P.K. Bajjal, A.H. Greenberg, Granzyme B induces BID-mediated cytochrome *c* release and mitochondrial permeability transition, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6974–6982.
- [12] X. Dong, L.Q. Ma, Y. Li, Characteristics and mechanisms of hexavalent chromium removal by biochar from sugar beet tailing, *J. Hazard. Mater.* 190 (2011) 909-915.
- [13] M. Patra, N. Bhowmik, B. Bandopadhyay, A. Sharma, Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance, *Environ. Exp. Bot.* 52 (2004) 199–223.
- [14] A.K. Shanker, C. Cervantes, H. Loza-Tavera, S. Avudainayagam, Chromium toxicity in plants, *Environ. Int.* 31 (2005) 739-753.
- [15] S.N. Groudev, I.I. Spasova, P.S. Georgiev, In situ bioremediation of soils contaminated with radioactive elements and toxic heavy metals, *Int. J. Miner. Process.* 62 (2011) 301-308.
- [16] M.J. Kim, K.H. Ahn, Y. Jung, S. Lee, B.R. Lim, Arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, and zinc contamination in mine tailings and nearby

streams of three abandoned mines from Korea, B. Environ. Contam. Tox. 70 (2003) 942–947.

[17] T. Luongo, L.Q. Ma, Characteristics of arsenic accumulation by *Pteris* and non-*Pteris* ferns, Plant Soil 277 (2005) 117-126.

[18] N. Singh, L.Q. Ma, M. Srivastava, B. Rathinasabapathi, Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L, Plant Sci. 170 (2006) 274-282.

[19] A. Shanker, B. Venkateswarlu, Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations, first ed., InTech, Rijeka, 2011.

[20] L.Q. Ma, K.M. Komar, C. Tu, W. Zhang, Y. Cai, E.D. Kennelley, A fern that hyperaccumulates arsenic, Nature 409 (2001) 579.

[21] M.I.S. Gonzaga, J.A.G. Santos, L.Q. Ma, Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils: Repeated harvests and arsenic redistribution, Environ. Pollut. 154 (2008) 212-218.

[22] S. Sundaram, S. Wu, L.Q. Ma, B. Rathinasabapathi, Expression of a *Pteris vittata* glutaredoxin PvGRX5 in transgenic *Arabidopsis thaliana* increases plant arsenic tolerance and decreases arsenic accumulation in the leaves, Plant Cell Environ. 32 (2009) 851-858.

[23] H. Marschner, Mineral nutrition of higher plants, Academic Press, San Diego, 1995.

[24] A. Setya, M. Murillo, T. Leustek, Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase, P. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 13383-13388.

[25] S.D. Lindblom, S.E. Abdel-Ghany, B.R. Hanson, S. Hwang, N. Terry, E.A.H. Pilon-Smits, Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation, J. Environ. Qual. 35 (2006) 726-733.

[26] C. Xiang, D.J. Oliver, Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*, Plant Cell 10 (1998) 1539-1550.

- [27] C. Cobbett, P. Goldsbrough, Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002) 159-182.
- [28] J.L. Hall, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1–11.
- [29] S. Wei, L.Q. Ma, U. Saha, S. Matheus, S. Sundaram, B. Rathinasabapath, Q. Zhou, Sulfate and glutathione enhanced arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1530-1535.
- [30] Z. Fanrong, W. Zhou, B. Qiu, S. Ali, F. Wu, G. Zhang, Subcellular distribution and chemical forms of chromium in rice plants suffering from different levels of chromium toxicity, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174 (2011) 249–256.
- [31] M. Schiavon, M. Wirtz, P. Borsa, S. Quaggiotti, R. Hell, M. Malagoli, Chromate Differentially Affects the Expression of a High-Affinity Sulfate Transporter and Isoforms of Components of the Sulfate Assimilatory Pathway in *Zea mays* (L.), *Plant Biol.* 9 (2007) 662-671.
- [32] K.J. Appenroth, A. Luther, G. Jetschke, H. Gabrys, Modification of chromate toxicity by sulphate in duckweeds (*Lemnaceae*), *Aquat. Toxicol.* 89 (2008) 167-171.
- [33] I.D. Kleiman, D.H. Cogliatti, Uptake of chromate in sulfate deprived wheat plants, *Environ. Pollut.* 97 (1997) 131-135.
- [34] R.A. Skeffington, P.R. Shewry, P.J. Peterson, Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.), *Planta* 132 (1976) 209-214.
- [35] A. Zayed, C.M. Lytle, J.-H. Qian, N. Terry, Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops, *Planta* 206 (1998) 293-299.
- [36] J.B. Jones, B. Wolf, H.A. Mills, *Plant Analysis Handbook*, Micro-Macro Publication, Athens, 1991.

- [37] L.H.M. Carvalho, T.D. Koe, P.B. Tavares, An improved molybdenum blue method for simultaneous determination of inorganic phosphate and arsenate, *Ecotox. Environ. Restor.* 1 (1998) 13-19.
- [38] W. Zhang, Y. Cai, C. Tu, L.Q. Ma, Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant, *Sci. Total Environ.* 300 (2002) 167-177.
- [39] S. Mathews, B. Rathinasabapathi, L.Q. Ma, Uptake and translocation of arsenite by *Pteris vittata* L.: effects of glycerol, antimonite and silver, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 3490-3495.
- [40] M.D. Groppa, M.L. Tomaro, M.P. Benavides, Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs, *Plant Sci.* 161 (2001) 481-488.
- [41] SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- [42] M.A. Turner, R.H. Rust, Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35 (1971) 755-758.
- [43] R.A. Skeffington, P.R. Shewry, P.J. Petersen, Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeum vulgare*, *Planta* 132 (1976) 209-14.
- [44] J. Kotaś, Z. Stasicka, Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation, *Environ. Pollut.* 107 (2000) 263-283.
- [45] Z.-Z. An, Z.-C. Huang, M. Lei, X.-Y. Liao, Y.-M. Zheng, T.-B. Chen, Zinc tolerance and accumulation in *Pteris vittata* L. and its potential for phytoremediation of Zn- and As-contaminated soil, *Chemosphere*, 62 (2006) 796-802.
- [46] S. Kalve, B.K. Sarangi, R.A. Pandey, T. Chakrabarti, Arsenic and chromium hyperaccumulation by an ecotype of *Pteris vittata* – prospective for phytoextraction from contaminated water and soil, *Current Sci.* 100 (2011) 888-894.

- [47] B. Mongkhonsin, W. Nakbanpote, I. Nakai, A. Hokura, N. Jearanaikoon, Distribution and speciation of chromium accumulated in *Gynura pseudochina* (L.) DC., *Environ. Exp. Bot.* 74 (2011) 56-64.
- [48] H. Diwan, A. Ahmad, M. Iqbal, Genotypic variation in the phytoremediation potential of Indian mustard for chromium, *Environ. Manage.* 41 (2008) 734-741.
- [49] L.B. Paiva, J.G. Oliveira, R.A. Azevedo, D.R. Ribeiro, M.G. Silva, A.P. Vitória, Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr^{3+} and Cr^{6+} , *Environ. Exp. Bot.* 65 (2009) 403-409.
- [50] F. Zeng, W. Zhou, B. Qiu, S. Ali, F. Wu, G. Zhang, Subcellular distribution and chemical forms of chromium in rice plants suffering from different levels of chromium toxicity, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174 (2011) 249-256.
- [51] J. Liu, C. Duan, X. Zhang, Y. Zhu, X. Lu, Potential of *Leersia hexandra* Swartz for phytoextraction of Cr from soil, *J. Hazard. Mater.* 188 (2011) 85-91.
- [52] C. Cervantes, J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán, R. Moreno-Sánchez, Interactions of chromium with microorganisms and plants, *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001) 335-347.
- [53] A.M. Zayed, N. Terry, Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, *Plant Soil*, 249 (2003) 139-156.
- [54] M.V. Aldrich, J.L. Gardea-Torresdey, J.R. Peralta-Videa, J.G. Parsons, Uptake and reduction of Cr(VI) to Cr(III) by mesquite (*Prosopis* spp.): chromate-plant interaction in hydroponics and solid media studied using XAS, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1859-1864.
- [55] V.K. Mishra, B.D. Tripathi, Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 1059-1063.

[56] A.K. Shanker, M. Djanaguiraman, R. Sudhagar, C.N. Chandrashekar, G. Pathmanabhan, Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv CO 4) roots, *Plant Sci.* 166 (2004) 1035–1043.

Fig.1. Effects of chromium on chromium (A) and arsenic (B) uptake and translocation by *P. vittata* after exposing to different concentrations of chromium and arsenic for 2 weeks. As = 0.05 mM for all treatments.

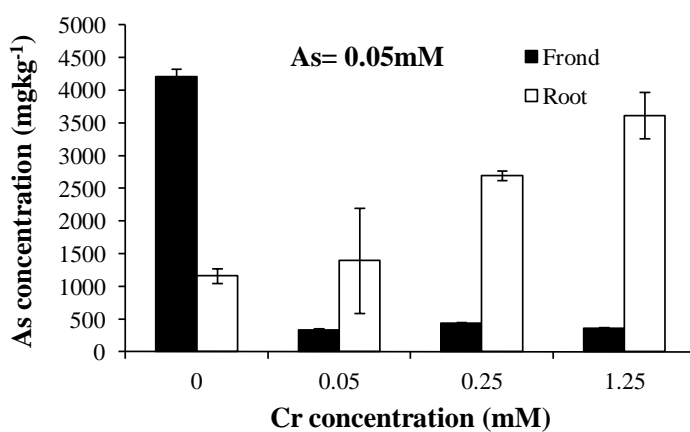
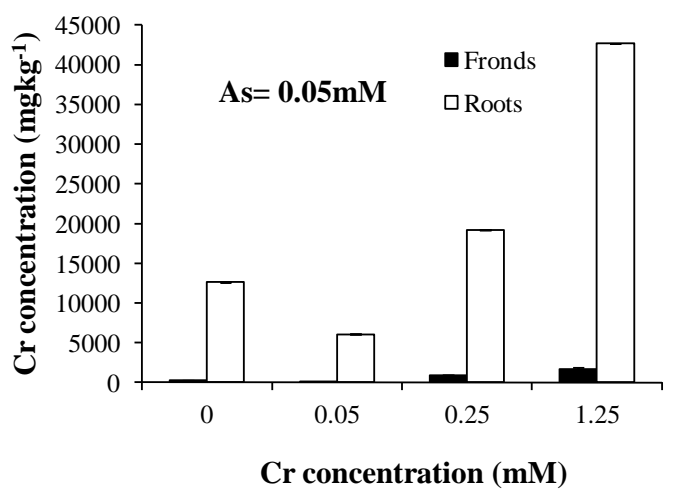


Fig.2. Effects of arsenic on As and Cr uptake and translocation by *P. vittata* after 2 weeks of growth. Cr = 0.05 mM in all treatments.

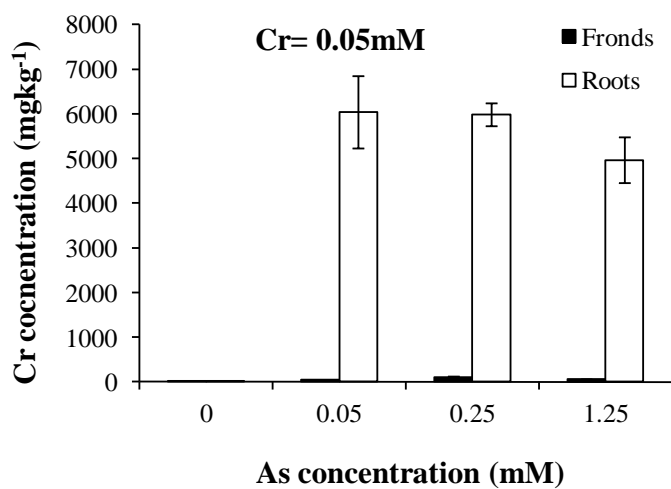
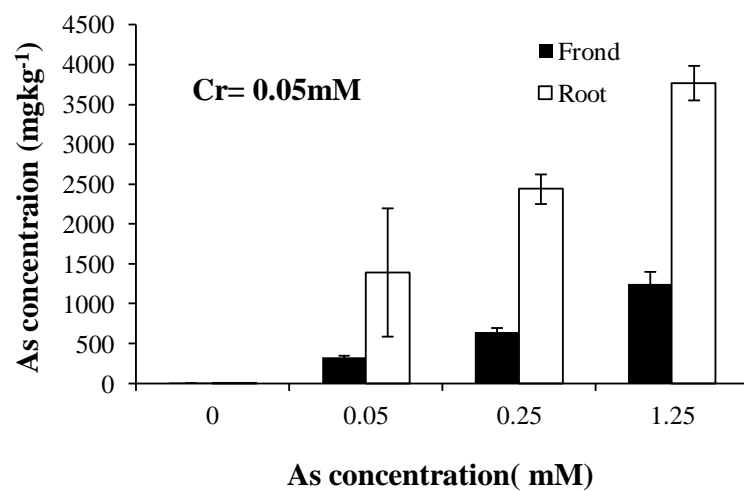


Fig.3. Effects of sulfate on arsenic and chromium uptake and translocation by *P. vittata* after exposing to different concentrations of chromium and arsenic for 2 weeks.

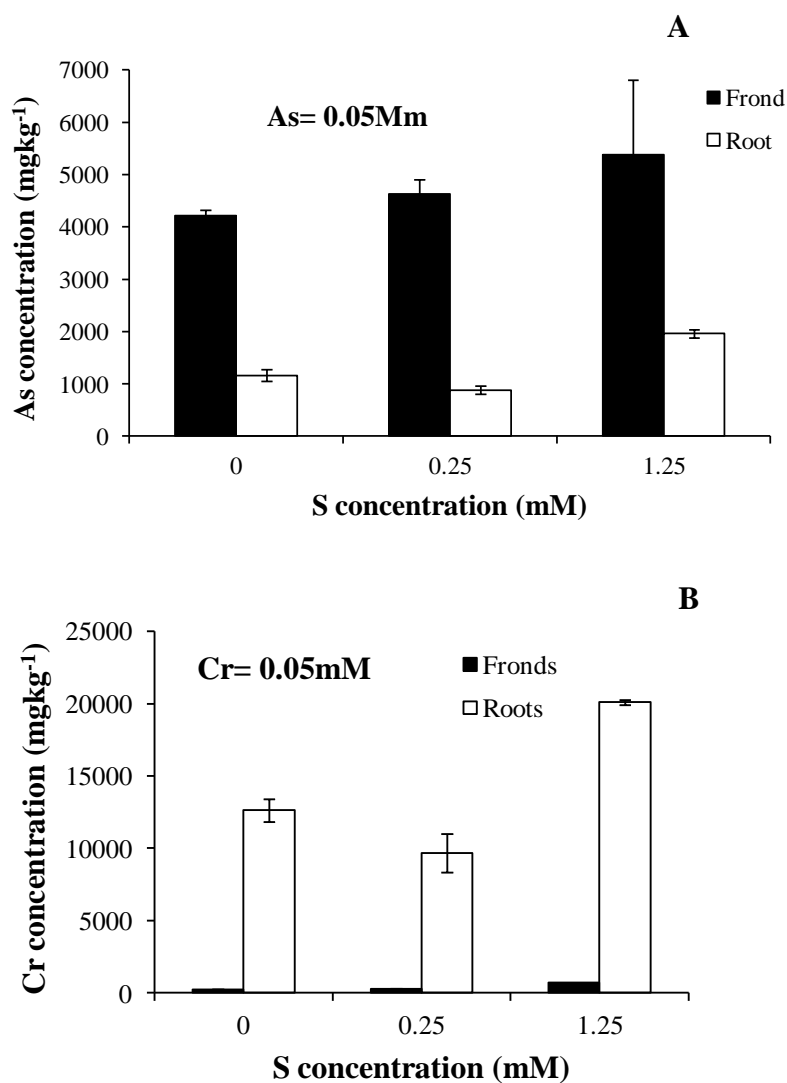


Fig. 4- Effect of arsenate and chromate on arsenic speciation in fronds and roots of *P. vittata*. As = 0.05 mM in all treatments

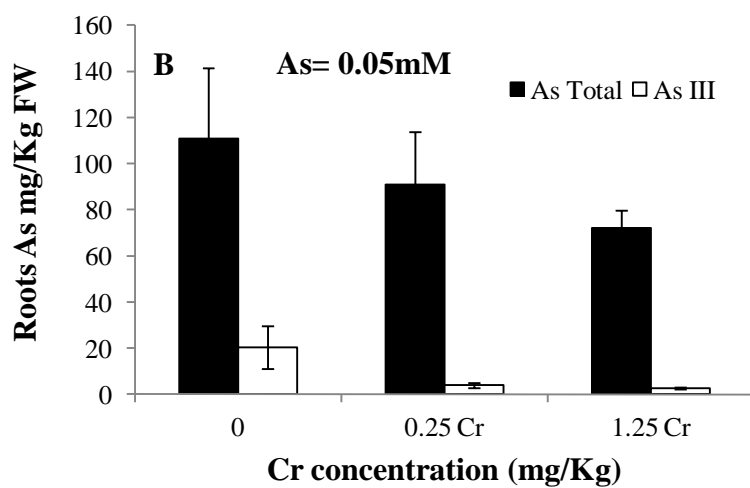
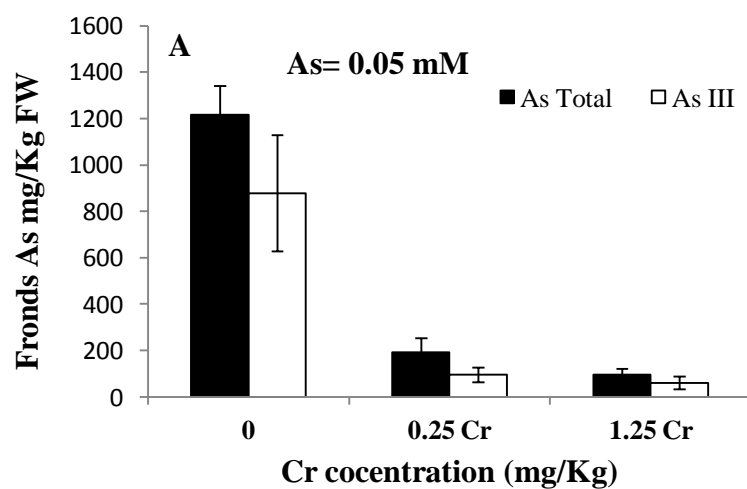


Fig.5- Effect of arsenate and chromate on lipid peroxidation (μmol malondialdehyde g^{-1} fresh weight) in the fronds and roots of *P. vittata*. As=0.05 mM (A) and Cr=0.05 mM except for the control where both As and Cr = 0.

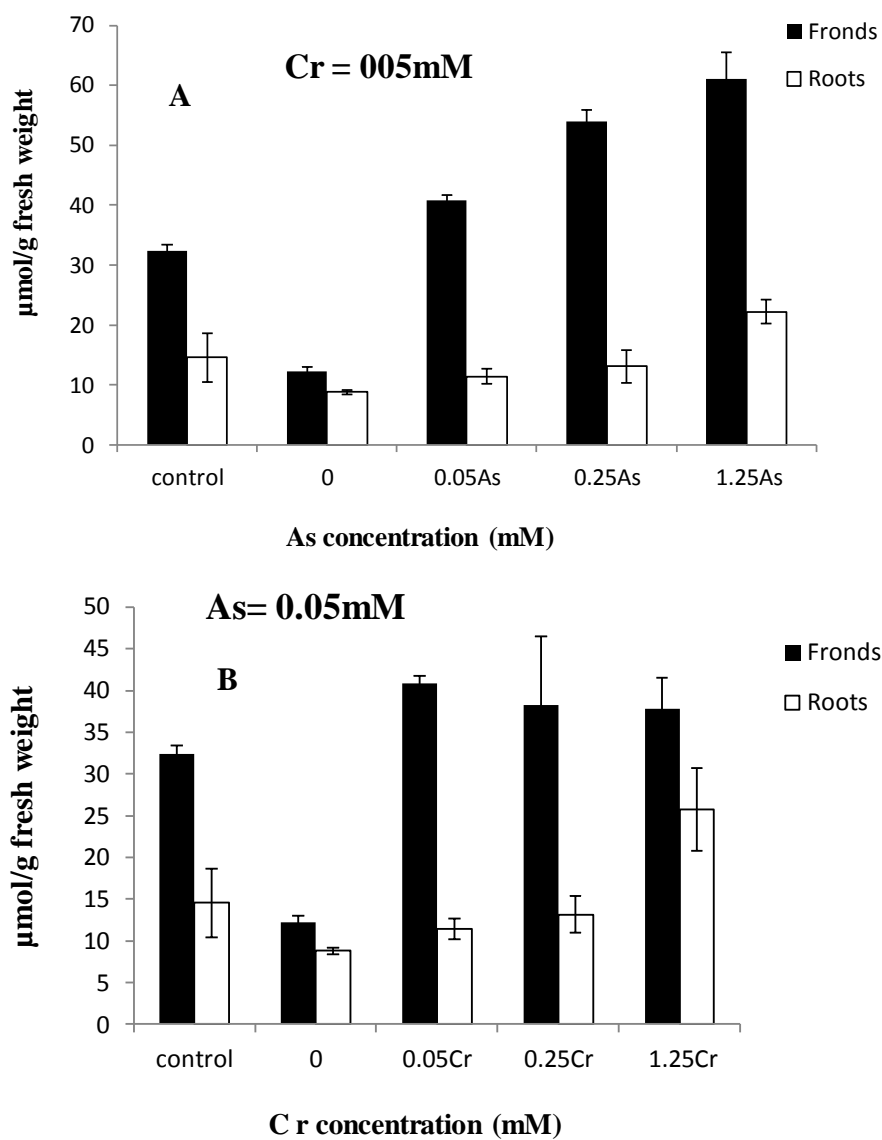


Table 1

Dry biomass of *P. vittata* L. after 2-w of exposure to arsenic, chromium and/or sulfate.

As	Cr	SO₄	Roots	FronDs
0	0	0	0.93 ± 0.06	2.44 ± 1.58
0.05	0	0	0.60 ± 0.07	1.01 ± 0.16
0.05	0.25	0	0.88 ± 0.29	1.33 ± 0.15
0.05	0.25	0	0.57 ± 0.10	1.25 ± 0.21
0.05	1.25	0	1.06 ± 0.29	1.72 ± 0.41
0	0.05	0	0.45 ± 0.13	0.89 ± 0.13
0.05	0.05	0	0.88 ± 0.29	1.33 ± 0.30
0.25	0.05	0	0.67 ± 0.09	1.89 ± 0.06
1.25	0.05	0	0.77 ± 0.20	1.74 ± 0.26
0	0.05	0	0.45 ± 0.13	0.89 ± 0.13
0	0.05	0.25	0.44 ± 0.12	2.02 ± 0.47
0	0.05	1.25	0.78 ± 0.21	2.13 ± 0.56
0.05	0	0	0.60 ± 0.07	1.01 ± 0.16
0.05	0	0.25	0.92 ± 0.02	1.15 ± 0.32
0.05	0	1.25	0.72 ± 0.12	1.19 ± 0.42

Values are represented as means ± standard deviation

Table 2

Concentrations of Sulphur (S), potassium (K) and phosphate (P) in the *P. vittata*.
after 2-w of exposure to arsenic (As), chromium (Cr) and/or sulfate (SO₄).

mM			Elemental concentration (mg kg ⁻¹)					
Solution concentration			S		K		P	
As	Cr	SO ₄	Fronds	Roots	Fronds	Roots	Fronds	Roots
0	0	0	6,494 ± 752	6,009 ± 501	14,825 ± 416	10,881 ± 2,296	7,040 ± 855	5,154 ± 398
0.05	0	0	4,332 ± 79	3,449 ± 245	14,376 ± 1,234	7,647 ± 1,175	4,627 ± 421	5,354 ± 207
0.05	0.05	0	3,304 ± 335	2,275 ± 901	17,653 ± 1,827	9,625 ± 1,080	2,875 ± 287	4,396 ± 387
0.05	0.25	0	3,605 ± 437	3,105 ± 238	15,809 ± 1,216	7,527 ± 762	1,071 ± 191	3,649 ± 307
0.05	1.25	0	4,223 ± 396	3,373 ± 116	17,693 ± 808	7,470 ± 839	4,761 ± 90	6,695 ± 1321
0	0.05	0	3,896 ± 273	3,125 ± 258	18,504 ± 1,186	10,401 ± 327	4,847 ± 198	6,028 ± 389
0.25	0.05	0	3,950 ± 95	3,285 ± 474	12,888 ± 1,232	8,283 ± 1,091	3,797 ± 284	6,283 ± 402
1.25	0.05	0	2,820 ± 44	2,688 ± 138	13,250 ± 721	8,145 ± 853	2,621 ± 309	4,966 ± 638
0	0.05	0.25	3,467 ± 159	3,392 ± 147	14,893 ± 2,231	10,155 ± 1,574	3,339 ± 289	6,098 ± 398
0	0.05	1.25	3,777 ± 72	3,610 ± 205	14,437 ± 636	13,884 ± 2,367	3,021 ± 175	5,347 ± 355
0.05	0	0.25	4,481 ± 234	3,943 ± 198	14,841 ± 1,532	11,447 ± 1,732	3,972 ± 268	6,308 ± 866
0.05	0	1.25	4,633 ± 370	4,029 ± 255	17,323 ± 1,813	9,255 ± 2,584	4,783 ± 667	5,345 ± 1287

Table 3

Concentrations of Cr in the *P. vittata*. after 2-w of exposure to arsenic, chromium and/or sulfate.

Solution Concentration (mM)			Chromium concentrations (mg kg ⁻¹)			Roots / Fronds	
AsV	CrVI	SO ₄	Frond	Roots External	Roots Internal	% internal	
0	0	0	0.15	0.45	2.030		
0	0.05	0	234 ± 21	1,261 ± 243	11,370 ± 340	90.0	54
0	0.05	0.25	280 ± 18	917 ± 113	8,764 ± 1,238	90.5	35
0	0.05	1.25	707 ± 3	1,272 ± 108	19,326 ± 558	96.1	29
0.05	0.05	0	47 ± 1	610 ± 62	5,430 ± 835	89.9	129
0.05	0.25	0	892 ± 76	442 ± 62	18,746 ± 283	97.7	22
0.05	1.25	0	1,645 ± 2.36	2,674 ± 397	39,978 ± 2,02	93.7	26
0.25	0.05	0	110 ± 9.82	438 ± 39	5,552 ± 294	92.3	55
1.25	0.05	0	58 ± 3.85	208 ± 15	4,758 ± 518	97.8	86

**CAPÍTULO IV- Arsenic Resistant Bacteria Isolated from the rhizosphere
of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L**

(Normas da revista Microbiological Research)

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate arsenite and arsenate resistance of four microbial isolates recovered from the rhizosphere of *Pteris vittata* as well as their ability to express As(III)-oxidizing and As(V)-reducing capabilities under aerobic conditions. The bacteria were isolated and grown with LB or PBM media, inoculated with various concentrations of As(III) or As(V). All incubation experiments were conducted using 20 mL cylindrical flasks with aqueous media (LB media for C1, C3, & C4 and PBM media for C2 only) containing 7.5 mg L^{-1} as As(III) or As(V). The results of these experiments demonstrated that growth was generally better. In addition, the microbial isolates C1, C3 and C4 displayed resistance up to 1mM As(III) and 40 mM As(V) as well as an ability to oxidize As(III) and reduce As(V) in aerobic conditions. Comparisons between the rates of As(III) oxidation and As(V) reduction suggests a significant preference for the oxidation step as its rate was much higher than As(V) reduction. The results therefore conclude that the microbial isolates used in this study were resistant to high arsenic concentrations in aqueous media. The tolerance and redox-manipulation of arsenic in laboratory systems by microbial isolates may provide some insights for environmental remediation of contaminated groundwater.

Keywords: arsenic-resistant bacteria, oxidation, reduction

1 Introduction

Arsenic, a toxic metalloid, is widely distributed in the environment, which results from both natural and anthropogenic sources (Liu et al., 2007). Arsenate (AsV) and arsenite (AsIII) are the two most abundant inorganic arsenic forms in terrestrial and aquatic environments. They are both highly toxic to most living organisms including microbes, plants, and mammals. Compared to AsV, AsIII is more bioavailable and toxic due to its greater hydrologic mobility and high affinity to bind with reactive sulfhydryl groups of many enzymes involved in crucial cellular metabolism (Quéméneur et al., 2010).

Arsenic is widely involved in microbial metabolism via biochemical detoxification or energy acquisition for growth (Quéméneur et al., 2010; Quéméneur et al., 2008). Microbial transformations of AsV into AsIII and vice-versa are important in controlling arsenic biogeochemistry in various ecosystems. On one hand, AsV can be used as electron acceptor in anaerobic respiration for energy gain. In aerobic conditions, AsV can be reduced to AsIII followed by extrusion from cytoplasm via specific AsIII transporters, which represents a typical resistant pathway for microbes to cope with high AsV in the environment (Quéméneur et al., 2010). On the other hand, AsIII can be oxidized to AsV by both heterotrophic and chemoautotrophic oxidizing bacteria, which have been identified from a wide range of ecosystems and exhibit phylogenetic diversity (Kertulis-Tartar, 2005). By transforming AsIII to AsV, AsIII oxidizers attenuate AsIII bioavailability and toxicity in the environment.

Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* Chinese brake fern (Ma et al., 2001) has a potential to be used to remediate arsenic-contaminated soils (Liu et al., 2007) and water (Oremland et al., 2005). Efficient arsenic uptake by *P. vittata* is closely associated with root-microbe symbiosis where microbial transformation and root absorption of arsenic occur continuously.

Microbial AsIII oxidation has application in bioremediation technology by transforming more mobile and toxic AsIII to less toxic AsV, which can be immobilized and removed more easily (Quéméneur et al., 2010). Although a wide range of AsIII oxidizers have been reported (Liu et al., 2007; Quéméneur et al 2008; Silver et al., 2005), no information is available regarding microbial AsIII oxidizers in the rhizosphere of *P. vittata*. Our goals were to (1) isolate arsenic resistant bacteria (2) To test AsIII -oxidizing and AsV-reducing abilities for bacteria under aerobic conditions.

2 Materials and Methods

Sodium arsenite and sodium arsenate (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA and Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were used to prepare AsIII and AsV stock solutions. Microbial media components were purchased from Fisher Scientific. Primers for PCR were custom-ordered from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

2.1 Spent growth solution of *P. vittata*.

Four-month old *P. vittata* plants, of uniform size, with 4-5 fronds growing in potting media were transferred to 0.2-strength Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1938). They were grown in a controlled environment with 8-h photoperiod at light intensity of $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28/23 °C day/night temperature and 60% relative humidity. The nutrient solution was aerated continuously and changed weekly. After two-week of acclimation, the growth solutions were collected without ferns and called “spent growth media”

2.2 Isolation of culturable bacteria

Three media prepared to isolate culturable bacteria from the spent growth media were: (i) minimal medium, with the following composition (1 L, pH ~ 6.4): 5.00 g peptone; 0.15 g ferric ammonium citrate; 0.098 g MgSO_4 ; 0.066 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; ; 0.006 g FeCl_3 ; and 12 g agar (24), (ii) Luria Bertani (LB) medium, and (3) Hoagland agar medium (1.5% agar) (Hoagland and Arnon, 1938), which was prepared from 0.2 μm -filtrated spent Hoagland solution with 0.4% (w/v) glucose added as the carbon source. Spent medium (200 μL) was poured onto the three types of media and the solution was spread evenly over the surface of each plate, which was then incubated at 30°C. Isolated colonies were obtained by continuous sub-streaks and incubation at 30°C.

2.3 Arsenic tolerance of bacterial isolates.

To measure arsenic tolerance, cultures were inoculated to an initial turbidity of 0.05 $\text{OD}_{600\text{nm}}$, in LB liquid medium (for C1, C3 and C4) or *Pseudomonas* basal mineral medium PBMM (Atlas, 2004) (for C2) supplemented with indicated levels of sodium arsenate or sodium arsenite. Growth was measured following incubation at 30°C, 200 rpm for 12 h.

2.4 Measurement of AsIII oxidation and AsV reduction.

To test AsIII-oxidizing and AsV-reducing abilities of the isolated strains, pure cultures were inoculated into liquid LB medium (for C1, C3 and C4) or PBMM (for C2) containing 7 mg L^{-1} AsIII or 7 mg L^{-1} AsV with cells from an early log phase growth. Control treatment was included by adding 7 mg L^{-1} AsIII or 7 mg L^{-1} AsV to sterilized media. After 4 h growth at 30°C with 200 rpm, $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of the cultures were measured. Cells were collected by centrifugation at 14,000 g for 2 min. Arsenic speciation and estimation of concentration were carried out in the supernatant fluids of different cultures and the corresponding

extracts of cell pellets following breaking the cells using ultrasonication and extraction into 50% methanol using As-speciation cartridge and GFAAS.

2.5 Identification of bacteria using fatty acid methyl ester (FAME) analysis using MIDI Sherlock (Midi Inc., Newark, DE

Fatty acids were extracted in xylene and saponified in dilute sodium hydroxide/methanol solution followed by treatment with dilute HCl/methanol solution to derive respective methyl esters (FAMES). The FAMES extracted from the aqueous phase was analyzed by a gas chromatograph and interpreted using MIDI Sherlock software (Kunitsky et al., 2006).

2.6 Data analysis

All values were expressed as means \pm SE (n=3). The treatment effects were determined by analysis of variance according to the linear model procedure of the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1986). Treatment means were separated by Duncan's multiple range tests using a level of significance of $p < 0.05$.

3 Results

Isolation of culturable AsIII oxidizers from spent growth media.

Following plating of the spent media, after 2 d of incubation at 30°C, four colonies with different morphologies appeared on the mineral and LB medium. Purified cultures were obtained by continuous sub-streak and were named C-1, C-2, C-3 and C-4. Among the four strains, C-2 displayed yellow color with others being white or tan and none exhibited fluorescence under UV. Three of the four bacterial isolates grew well in LB medium but C-2 grew best in Pseudomas basic mineral medium (Roland, 2004).

Carbon utilization assay using Biolog plates showed that C1, C2, and C3 had high similarity indices to *Comamonas testosterone*, *Flavimonas*

oryzihabitans and *Staphylococcus epidermidis* respectively, and C4 had relatively lower similarity index to *Pseudomonas alcaligenes* (Table 2). Fatty acid methyl ester analyses were consistent with these identifications – matching C1 to *Comamonas testosteroni* and C2 to *Flavimonas oryzae* (Table 2). C3 matched with both *Staphylococcus capitis* and *S. epidermidis* with close similarity indices and C4 with *P. alcaligenes* (Table 2).

All the four isolates were resistant to 50 μ M sodium arsenite with only about 10% growth reduction compared to no arsenite controls (Fig. 1). When tested up to 1 mM sodium arsenite, C-2 was significantly more sensitive to sodium arsenite than C-1, C-3 and C-4 (Fig. 1). All the four isolates including C-2 had significantly higher degrees of tolerance to arsenate as revealed by growth in media containing 40 mM sodium arsenate (Fig. 1).

To test their ability in AsIII oxidation, the four strains were inoculated into flasks with liquid medium containing 7 mg L⁻¹ AsIII. Control flasks had media with AsIII, but no cells. After 4 h incubation under 200 rpm, about 5 to 10% of the total arsenic in the medium was oxidized in LB medium and 3.5% in the minimal medium in the control flasks. In media where C-1 was inoculated significantly more arsenite was oxidized (27% of the total) (Fig 2A). The spent medium where C-2, C-3 and C-4 were cultured did not have significantly greater AsV compared to controls of medium without cells (Fig 2B). AsIII oxidation in the control media (sterilized LB or MM), could be caused by the strong aeration under 200 rpm shaking conditions. When cell pellets of these four isolates grown in media containing As(III) were analyzed, 34%, 55%, 24% and 70% of the total arsenic was AsV in C-1, C-2, C-3 and C-4 respectively (Fig.2B). Together these results suggest that the four isolates had differing abilities to oxidize arsenite.

When tested for AsV reduction by providing AsV in the medium, there was no detectable AsV reduction in the control media, but a small but detectable

fraction of AsV was reduced in the spent media inoculated with C-1, C-2, C-3 and C-4 (Fig 2A). In the media, 5.6%, 0.5%, 2.6% and 1.6% of the total arsenic was AsIII (Fig 2A). Analysis of the cell pellet extracts showed that C-1 cells contained significantly greater AsIII levels (17% of the total arsenic) than C-2 (4.2%), C-3(4.5%) and C-4 (12.6%) (Fig 2B). Together these results show that the four isolates had differing abilities to reduce arsenate.

4.0 Discussion

Multiple methods were used to identify the four isolates as *Comamonas* sp., C-1, *Flavobacterium* C-2, *Staphylococcus* C-3 and *Pseudomonas* C-4 (Tables 1). These four isolates exhibited remarkable tolerance to sodium arsenate and arsenite (Fig 1). All four isolated bacteria oxidized AsIII (Fig 4) and also reduced AsV (Fig 2), although AsV reduction rates were much lower than that for AsIII oxidation (Fig 2 and Fig 3). In our experiment, *Comamonas* sp. C-1 induced significant oxidation of AsIII after 4 h of incubation with AsIII but reduced AsV when provided with AsV (Fig. 2). To investigate whether AsIII oxidation by C-1 was by the cells or by enzymatic and non-enzymatic factors released from the cells, we tested AsIII oxidation in spent media where C-1 cells were cultured initially. AsIII oxidation in such a spent medium was no more than background control AsIII oxidation rates (data not shown), suggesting that AsIII oxidation by C-1 was mediated by the cells. Consistent with our results we propose that C-1 cells tolerate high levels of AsV by reducing AsV within the cells and exporting AsIII out. We hypothesize that an arsenite oxidase spatially separated from arsenate reductase, oxidizes the AsIII as it escapes out or after its export outside the cells. This is consistent with our observation that only a small fraction of the arsenic outside the cells is AsIII (Fig 2A). Both *Comamonas* and *Flavobacterium* isolates have been previously identified from the rhizosphere of some plants and exhibited potential for the accelerated degradation of a diverse organic contaminants in the environment (Daane et al.,

2001; Liu et al., 2007; Lu et al., 2006; Narasimhan et al., 2003; Xu et al., 2010). Whether the rhizosphere system of *P. vittata* can play a role in degrading toxic organic pollutants present in AsIII-contaminated water is raised as a new issue, which deserves further study.

Regarding phytofiltration technology using *P. vittata* to remove AsIII and AsV from contaminated water, the oxidizers in the rhizosphere can significantly affect arsenic speciation and thus root uptake dynamics. In the presence of the oxidizing bacteria, AsIII uptake by *P. vittata* will be impacted by phosphorus (P) levels because AsV and P are chemical analogs and they compete for root uptake. In the absence of P, AsV uptake rate by *P. vittata* was up to 9-20 times higher than AsIII (Tu et al., 2004). This suggests that with low P content, AsIII removal efficiency could be increased by synergic function of microbial AsIII oxidation in the rhizosphere followed by root uptake of AsV at a higher rate.

This study provides the platform for future research to verify the application of AsIII oxidizers including four culturable isolates from the rhizosphere of *P. vittata* to improve phytofiltration of arsenic contaminated water.

5 References

Atlas, R.M. 2004. Handbook of microbiological media. Third edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, p.1431.

Daane, L.L., I. Harjono, G.J. Zylstra, and M.M. Häggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol* **67**:2683-2691.

HOAGLAND, D. R., A ND D. I. Aa~ox. 1938. The water- culture method for growing plants without soil. Univ. California Agric. Exper. Sta. Cir. 347

Kunitsky, C., Osterhout, G. and M. Sasser. 2006. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock microbial identification system. In: Miller, M. (eds) *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, PDA, Bethesda.

Liu, L., C.Y. Jiang, X.Y. Liu, J.F. Wu, J.G. Han, and S.J. Liu. 2007. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environ. Microbiol.* **9**:465-473.

Lu, Y., D. Rosencrantz, W. Liesack, R. Conrad. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **8**:1351-1360.

Ma, L.Q., K.M. Komar, C. Tu, W. Zhang, and Y. Cai. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **409**: 579.

Narasimhan K, C. Basheer, B.V. Bajic, and S.Swarup. 2003. Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol* **132**: 146-153.

Oremland R.S. and J.F. Stolz. 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* **13**: 45-49.

Quéméneur, M., A. Cebron, P. Billard, F. Battaglia-Brunet, F. Garrido, C. Leyval, and C. Jouliau. 2010. Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper Isle River Basin, France. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4566-4570.

Quéméneur, M., A. Heinrich-Salmeron, D. Muller, D. Lièvreumont, M. Jauzein, P.N. Bertin, F. Garrido, and C. Jouliau. 2008. Diversity Surveys and Evolutionary Relationships of *aoxB* Genes in Aerobic Arsenite-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4567-4573.

SAS Institute. 1997. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary, NC, USA: SAS Institute

Silver, S. and L.T. Phung. 2005. Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 599-60.

Tu, S., L.Q. Ma, G.E. MacDonald, B. Bondada. 2004. Arsenic absorption, speciation and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* in the presence of phosphorus. *Environ. Exp. Bot.* **51**: 121-131.

Xu, L., Y. Teng, Z.G. Li, J.M. Norton, and Y.M. Luo. 2010. Enhanced removal of polychlorinated biphenyls from alfalfa rhizosphere soil in a field study: the impact of a rhizobial inoculum. *Sci Total Environ.* **408**: 1007-1013.

Fig 1. Arsenic resistance of bacterial isolates C1, C2, C3 and C4. Late log phase cultures of C1 (A), C2(B), C3(C) and C4(D) were inoculated to 0.05 OD₆₀₀ density in LB medium (C1, C3 and C4) or Pseudomonas Basal Mineral medium (C2) containing indicated concentrations of sodium arsenate (filled bars) or sodium arsenite (striped bars) or no arsenic (open bars) and incubated for 12 h at 200 rpm at 30°C. Optical density at 600 nm was measured using a spectrophotometer. Bars represent means and standard errors for three replicates.

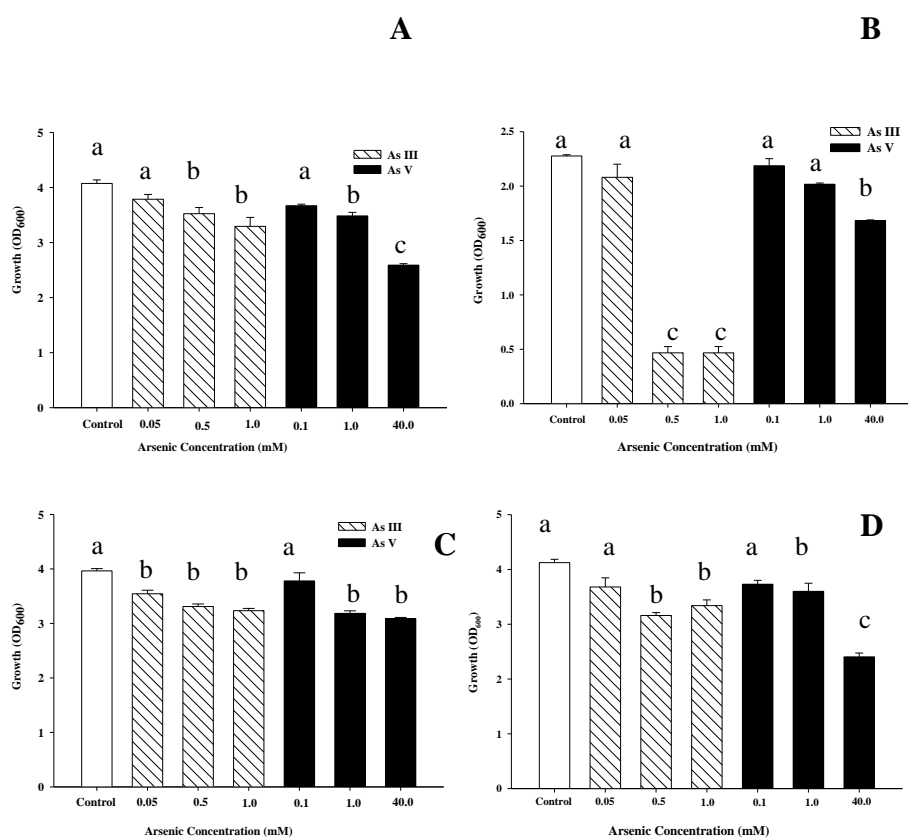


Fig. 2. Arsenite oxidation by bacterial isolates C1, C2, C3 and C4. Sodium arsenite was provided in the culture medium for four hours. Total arsenic (open bars) and arsenate (filled bars) were determined in the spent medium (A) and corresponding extracts of cells expressed per unit cell density (B). Bars represent means and standard errors for three independent cultures. Bars denoted with different letter codes are significantly different at $p=0.05$.

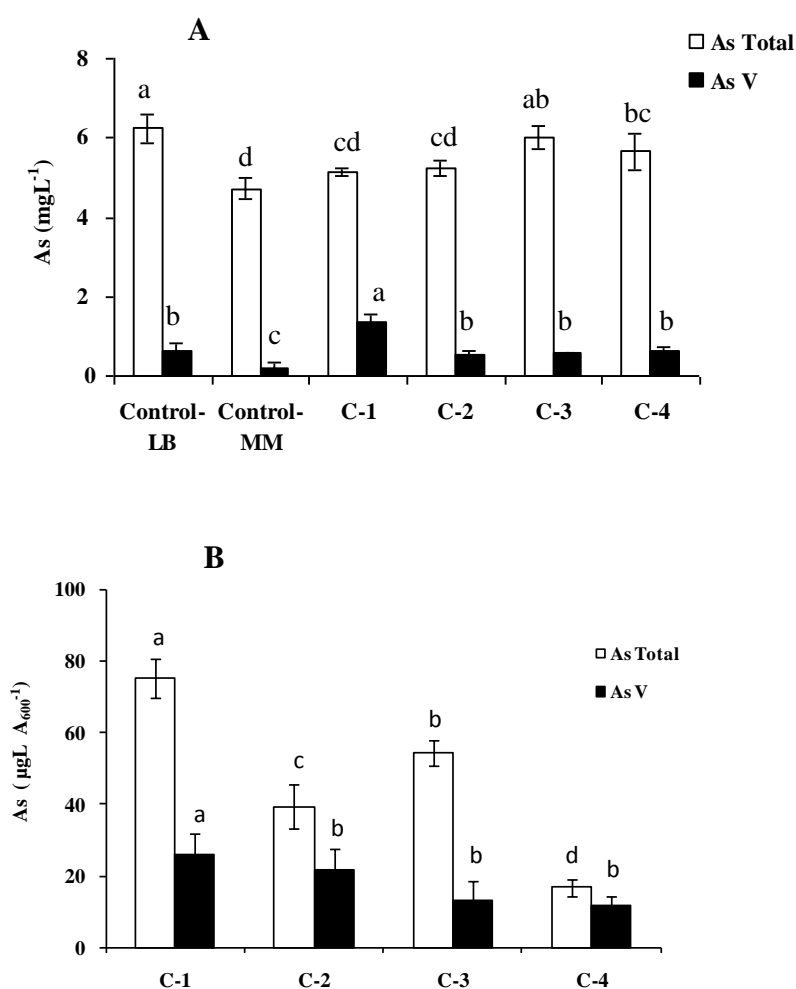


Fig 3. Arsenate reduction by bacterial isolates C1, C2, C3 and C4. Sodium arsenate was provided in the culture medium for four hours. Total arsenic (open bars) and arsenite (filled bars) were determined in the spent medium (A) and corresponding extracts of cells, expressed per unit cell density (B). Bars represent means and standard errors for three independent cultures. Bars denoted with different letter codes are significantly different at $p=0.05$.

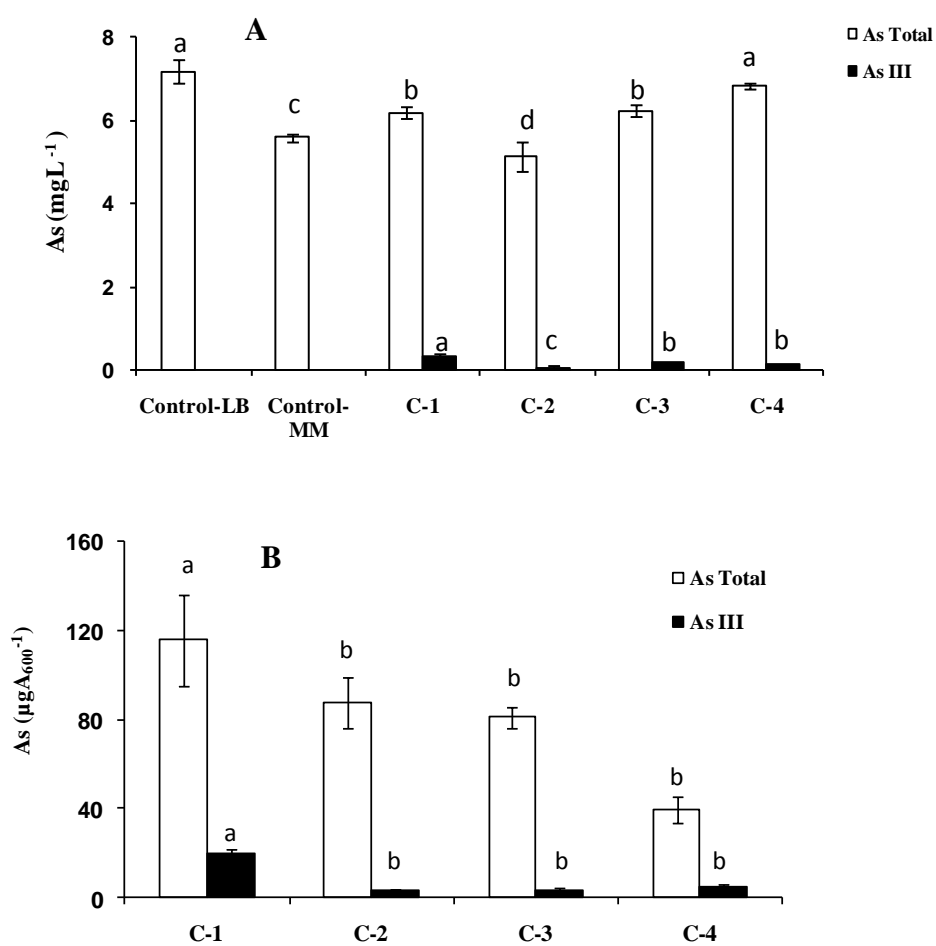


Table 1. Identification of bacterial isolates based on fatty acid methylester analyses (FAME). Similarity index (SIM) calculated by MIDI Sherlock microbial identification system is given. Two values are given if SIMs for the top two matches did not differ by 0.1.

Bacterial isolate	Identification	SIM
C1	<i>Comamonas testosteroni</i>	0.554
C2	<i>Flavimonas orhzihabitans</i>	0.877
C3	<i>Staphylococcus capitis</i>	0.659
C3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.651
C4	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0.684