



**JERUSA SCHNEIDER**

**OCORRÊNCIA E AÇÃO FITOPROTETORA DE  
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES  
EM SOLOS CONTAMINADOS COM ARSÊNIO**

**LAVRAS - MG  
2011**

**JERUSA SCHNEIDER**

**OCORRÊNCIA E AÇÃO FITOPROTETORA DE FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS CONTAMINADOS  
COM 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 Microbiologia e Bioquímica do Solo, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

**LAVRAS – MG  
2011**

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

Schneider, Jerusa.

Ocorrência e ação fitoprotetora de fungos micorrízicos  
arbusculares em solos contaminados com arsênio / Jerusa Schneider.  
– Lavras : UFLA, 2011.

181 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. Recuperação de áreas degradadas. 2. Micorriza arbuscular. 3.  
Fitotoxidez. 4. Tolerância. 5. Nutrição mineral-absorção. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**JERUSA SCHNEIDER**

**OCORRÊNCIA E AÇÃO FITOPROTETORA DE FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS CONTAMINADOS  
COM 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 Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2011.

Dr<sup>a</sup>. Cleide Aparecida de Abreu

CSRA/IAC

Dr. Cláudio Roberto Fonsêca de Sousa Soares

MIP/UFSC

Dr. Eduardo Alves

DFP/UFLA

Dr<sup>a</sup>. Fatima Maria de Souza Moreira

DCS/UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2011**

A Deus, criador de uma belíssima e complexa natureza.  
Aos meus pais, Jaime e Ezoni, pelo amor e apoio, que me permitiram chegar até aqui.

DEDICO

A toda minha família e aos amigos

AGRADEÇO

A todos que gostam de  
Microbiologia do Solo

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças ao apoio de algumas pessoas. Assim gostaria de agradecer...

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme, por quem tive a honra de ser orientada no doutorado. Pela sua preciosa orientação, conselhos, opiniões, correções e exemplo de ética profissional, aqui deixo registrada minha admiração.

Ao Prof. Dr. Sidney Luis Stürmer pela identificação de FMAs e contribuição para melhoria do trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho pelos conhecimentos transmitidos, constante motivação e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fatima Maria de Sousa Moreira pelo apoio e auxílio sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca de Sousa Soares pelo auxílio, apoio e disponibilidade para discussões e esclarecimentos de dúvidas.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela oportunidade de realização do Doutorado.

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, em especial, ao Manuel Aparecido Silva, pela valiosa contribuição na execução das análises.

Aos colegas do Departamento de Ciência do Solo, em especial aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo adquiridos durante o curso: Amanda, Cândido, Cleide, Ligiane, Márcia, Marlene, Paulo, Pedro, Plínio, Rogério,

Bruno, Silvia, Jéssé, Wesley e Leandro, pela convivência, amizade e colaboração durante o curso.

Aos colegas do Departamento de Biologia, Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial a Kamila e Melline, que me auxiliaram e ajudaram nas extrações enzimáticas

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial a Eloisa e Cláudia Labory, pela amizade, apoio e importantes discussões sobre o trabalho. Muito obrigada à Claudia também, pelas correções no texto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves, que mesmo distante, gentilmente aceitou auxiliar nas análises de microscopia eletrônica e por ter concedido uma oportunidade para aprender nessa área.

Ao Pós-doutorando Enio Tarso de Sousa Costa, pelas análises de fluorescência de raios-X realizadas no Picofox e esclarecimentos nos cálculos.

À equipe do Studio Fitness Pilates Corpore pelas preciosas horas de relaxamento e pelo companheirismo durante o período de Doutorado.

Ao Dailto Silva pela enorme paciência e compreensão, por todos os ensinamentos, por sua alegria contagiante e acima de tudo, pelo carinho, encorajamento e força, principalmente na conclusão deste trabalho.

Ao meu pai Jaime e minha mãe Ezoni por me acompanharem sempre. É impossível colocar em palavras tantos anos de dedicação.

## RESUMO

Neste estudo testamos a hipótese de que a contaminação do solo com arsênio (As) interfere na comunidade e na atividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e que estes efeitos estão relacionados à tolerância diferenciada de espécies/isolados fúngicos. Inicialmente avaliou-se a ocorrência e a diversidade de FMAs em uma área impactada pela mineração de ouro em Paracatu-MG. Solos de quatro locais com diferentes concentrações de As foram amostradas. Verificou-se a ocorrência generalizada dos FMAs na área, sendo esta influenciada pelas concentrações de As e época de amostragem. Encontrou-se um total de 23 espécies sendo: 10 do gênero *Acaulospora*, cinco de *Scutellospora*, dois de *Racocetra*, quatro de *Glomus*, uma *Gigaspora* e uma *Paraglomus*. Para avaliar a influência da contaminação do solo com As na colonização, esporulação, além dos efeitos no crescimento e do sistema antioxidativo em plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com FMAs, foi realizado um experimento em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da UFLA, utilizando-se 3 isolados de FMAs de solos não contaminados e 3 isolados provenientes de áreas contaminadas com As. Como substrato, utilizou-se um Neossolo Quartzarênico (RQ), o qual foi contaminado com  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas doses de 35, 75 e 150 mg de As  $\text{dm}^{-3}$  de solo. Ocorreram sintomas de fitotoxidez logo após emergências das plantas submetidas a 150 mg de As  $\text{dm}^{-3}$  de solo, seguida de morte. Após 147 dias, as raízes e a parte aérea das plantas foram coletadas, nos tratamentos de 0, 35, 75 mg de As  $\text{dm}^{-3}$  de solo, sendo obtidas a matéria seca e a concentração de As da parte aérea e da raiz. Em experimentos adicionais, foram determinadas as atividades enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), da peroxidase do ascorbato (APX) e da redutase da glutatona (GR) na parte aérea de plantas de *L. leucocephala* inoculadas com diferentes FMAs, além da nutrição mineral da planta e uma avaliação anatômica e ultraestrutural na parte aérea e raízes de *L. leucocephala* com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão. Com base nos resultados obtidos nos diversos estudos realizados, conclui-se que a poluição do solo com As interfere na colonização e esporulação dos FMAs, porém espécies com elevada eficiência simbiótica podem ser empregadas em programas de revegetação de solos contaminados com As.

Palavras-chave: Recuperação de áreas degradadas. Fitotoxidez. Tolerância. Micorriza arbuscular. Nutrição mineral – Absorção.

## ABSTRACT

This study tested the hypothesis that soil contamination with arsenic (As) interferes in the community and activity of mycorrhizal fungi (AMF) and that these effects are related to the tolerance of different species/fungal isolates. Initially we assessed the occurrence and diversity of AMF in an area impacted by gold mining in Paracatu, Brazil. Soils of 4 locations with different concentrations of As were sampled. There was a widespread occurrence of AMF in the area, which is influenced by the concentrations of As and sampling time. A total of 23 species were identified, belonging to the following genus: *Acaulospora* (10 species), *Scutellospora* (5 species), *Racocetra* (2 species), *Glomus* (4 species), *Gigaspora* (1 specie) and *Paraglomus* (1 specie). To assess the influence of soil contamination with As in the colonization, sporulation, and the effects on growth and antioxidative system in plants of *Leucaena leucocephala* inoculated with mycorrhizal fungi, an experiment was conducted in a greenhouse at the Department of Soil Science at Federal University of Lavras UFLA using three isolates of AMF from an uncontaminated soil and 3 isolates from areas contaminated with arsenic. As substrate, we used a PSAMENT soil (RQ in the Brazilian classification), which was contaminated with  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at the doses of 35, 75, and 150 mg of  $\text{As dm}^{-3}$  of soil. Plants subjected to 150 mg  $\text{dm}^{-3}$  showed phytotoxicity symptoms shortly after emergency, which was followed by the death of the plant. After 147 days, the roots and shoots of plants were collected in treatments receiving 0, 35, and 75 mg  $\text{As dm}^{-3}$ , for measurement of dry weight as well as arsenic concentration of shoots and roots. Additional experiments evaluated the total enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) in the shoots of plants of *L. leucocephala* inoculated with different AMF in addition to the mineral nutrition of the plant, as well as anatomical and ultra-structural changes in shoots and roots of *L. leucocephala* with the aid of Scanning/Transmission Electron Microscopy. Based on the results obtained in several studies we concluded that soil pollution with As interferes with the colonization and sporulation of AMF, but symbiotic species with high efficiency can be used in revegetation programs of As-contaminated soils.

Keywords: Recovery of degraded areas. Phytotoxicity. Tolerance. Mycorrhiza. Mineral nutrition – Absorption.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Metais pesados e elementos-traço em solos</b> .....	14
<b>2.1.1</b>	<b>O arsênio</b> .....	17
<b>2.1.1.1</b>	<b>Casos famosos no mundo</b> .....	19
<b>2.1.2</b>	<b>Arsênio em plantas</b> .....	21
<b>2.1.3</b>	<b>Efeito do arsênio sobre a anatomia vegetal</b> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e efeito do arsênio sobre as atividades enzimáticas</b> .....	27
<b>2.3</b>	<b>Fitotecnologia como técnica para recuperação de áreas degradadas</b> .....	31
<b>2.3.1</b>	<b>Fitoextração por espécies hiperacumuladoras</b> .....	34
<b>2.3.1.1</b>	<b>Outras samambaias hiperacumuladoras de As</b> .....	35
<b>2.3.2</b>	<b>Micorrizas na amenização da toxicidade de arsênio</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>CAPÍTULO 2 Fungos micorrízicos arbusculares em solos contaminados com arsênio</b> .....	58
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	60
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	62
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	88
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
	<b>CAPÍTULO 3 Colonização, esporulação de fungos micorrízicos arbusculares e efeitos no crescimento de <i>Leucaena leucocephala</i> em solo contaminado com arsênio</b> .....	95
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	97
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	99
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	105
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	114
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115
	<b>CAPÍTULO 4 Fungos micorrízicos arbusculares na atividade de enzimas antioxidantes em <i>Leucaena leucocephala</i> cultivada em solo contaminado com arsênio</b> .....	123
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	125
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	128
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	133
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	143
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	144

	<b>CAPÍTULO 5 Aspectos anatômicos e ultraestruturais de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculada com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio .....</b>	<b>150</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>152</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>153</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>157</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>169</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>170</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>173</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>175</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) é um metalóide encontrado basicamente em todos os ambientes. É classificado como o número um na lista de poluentes mais tóxicos pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças - ATSDR (2007), indicando o elevado potencial de impacto deste poluente no solo. Elevadas concentrações de As no solo podem acontecer naturalmente, quando este é proveniente de fontes geológicas, como resíduos de rochas em decomposição, ou através de fontes antropogênicas, quando adicionado ao solo pela atividade humana, via mineração e beneficiamento de bens metálicos, por exemplo (SAKUMA et al., 2003).

A mineração e fundição de bens metálicos sempre exerceram um papel importante para o desenvolvimento da maior parte das sociedades e civilizações. Contudo, podem causar impactos ambientais, comprometendo os ecossistemas e a saúde da população, pois elementos poluentes, como As, são expostos à superfície do solo sofrendo alterações de forma e, ou, sendo disseminado em alguns meios (i.e. água, ar), entrando na cadeia trófica.

Como consequência da ação tóxica desse elemento, ocorre a redução do crescimento e da diversidade com grande impacto no solo e organismos, comprometendo sua funcionalidade e causando a degradação. Isso favorece a erosão do solo e o carreamento dos contaminantes para mananciais hídricos. Portanto, existem extensas áreas assim degradadas, no país e em várias partes do mundo, que precisam ser recuperadas.

Devido a estes efeitos adversos, a recuperação de áreas contaminadas com As é tarefa difícil. Entretanto, pode ser conseguida através de um método ainda em desenvolvimento, a fitorremediação, no qual as plantas e a microbiota associada podem remover, conter, transferir, estabilizar ou tornar inofensivos os

metais tóxicos (RASKIN & ENLEY, 2000). A fitorremediação prevê vários mecanismos de despoluição, sendo que para áreas contaminadas com arsênio podemos destacar a fitoestabilização e a fitoextração.

A fitoestabilização visa reduzir o potencial de dano ao ambiente, pela redução da mobilidade e disponibilidade do contaminante no solo, sendo as plantas, neste caso, escolhidas por tolerar as condições da área, controlar a erosão e a lixiviação e assim evitar a translocação do contaminante para a parte aérea. Para o estabelecimento de uma comunidade de plantas estável nestas condições, a população microbiana deve ser diversa e funcional, incluindo, por exemplo, os fungos micorrízicos, que formam importantes simbioses radiculares mutualísticas (MA) com a maioria das plantas, e por isso representam parte integrante da microbiota de qualquer solo funcionalmente ativo, mesmo em condições adversas, como ocorre em solos poluídos com elementos-traço (SIQUEIRA et al., 2007). Estes fungos representam uma ligação direta entre as plantas e o solo, influenciando a absorção de nutrientes e de água pela planta hospedeira e contribuindo, em muitos casos, para maior tolerância das plantas ao estresse induzido pelo excesso de elementos-traço. Assim como nas plantas, os fungos micorrízicos arbusculares também sofrem efeitos tóxicos decorrentes do excesso de elementos-traço (NOGUEIRA & SOARES, 2010). Em solos muito degradados a diversidade e atividade dos FMAs é reduzida ou às vezes eliminada (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; STÜRMER & SIQUEIRA, 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre a ocorrência e ação fitoprotetora da simbiose micorrízica nestas condições, não sendo até o momento, conhecido nenhum trabalho realizado em solos brasileiros que apresentam elevadas concentrações de As, representando sérios riscos de contaminação ambiental e à saúde humana (MATSCHULLAT et al., 2000).

Elevadas concentrações de As podem exercer efeito seletivo sobre as populações, favorecendo a dominância de certas espécies mais adaptadas, o que

teria impacto sobre a vegetação, considerando que estes fungos podem amenizar os efeitos fitotóxicos dos elementos-traço. Isto resulta de alterações na absorção, acumulação ou translocação dos elementos-traço na planta ou de uma nutrição melhor balanceada.

É de fundamental importância para a fitoestabilização de solos contaminados considerar estes e outros microrganismos benéficos para as plantas nestas condições. No caso dos FMAs, é urgente e necessário que se entenda melhor as relações ecológicas destes fungos em ambientes com elevadas concentrações de As no solo e seus efeitos para as plantas nas condições brasileiras.

Diante da hipótese de que a contaminação do solo interfere na comunidade e na atividade dos FMAs em solos contaminados com As e que estes efeitos são relacionados à tolerância diferenciada de isolados, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do As sobre estes fungos, especificamente na ocorrência, colonização, esporulação e mecanismos envolvidos na proteção das plantas hospedeiras, avaliando-se aspectos anatômicos e de ultraestrutura dessa associação simbiótica e possíveis mecanismos de desintoxicação nas plantas hospedeiras, visando dar subsídios para o emprego destes fungos em programas de revegetação de solos contaminados com As.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metais pesados e elementos-traço em solos

Os metais pesados são elementos químicos que fazem parte do grupo dos elementos vestigiais (elementos-traço). Elementos-traço são elementos presentes em quantidades baixas nos solos, plantas e águas. É o caso de elementos como arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb), selênio (Se) e zinco (Zn), por exemplo, que constituem cerca de 1% do conteúdo total de elementos químicos do solo (PIERZYNSKI et al., 1994; ESSINGTON, 2004; PRASAD, 2004). De acordo com a definição utilizada em Prasad (2004), metais pesados são elementos com densidade superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$ , como Zn (7.1), Cr (7.2), Cd (8.6), Ni (8.7), Mo (10.2), Co (8.9), Cu (8.9), Pb (11.4) e Hg (13.5). Outros metais, que podem causar problemas ambientais, não estão incluídos nesta designação de metal pesado, como o Al (2.7) referido por este autor como metal leve (*light-metal*), ou o As (5.7) considerado um metalóide. Contudo, o termo “metal pesado” nunca foi definido por nenhum órgão oficial na área química, tendo se tornado, por isso sem sentido (GUILHERME et al., 2005)

Alguns elementos-traço são considerados nutrientes essenciais para as plantas, sendo elementos constituintes de moléculas orgânicas ou desempenhando funções específicas no metabolismo, indispensáveis ao normal desenvolvimento das plantas em quantidades residuais, pelo qual são incluídos no grupo dos micronutrientes essenciais. São considerados micronutrientes essenciais para as plantas o Cu, ferro (Fe), Mn, Mo, Zn, Ni e boro (B) (VARENNE, 2003). Outros destes elementos-traço podem encontrar-se presentes nas plantas sem qualquer função específica ou conhecida (i.e. selênio) pelo qual são considerados elementos-traço não essenciais.

Os elementos-traço são, e sempre serão onipresentes em solos, sedimentos e sistemas aquáticos (GUILHERME et al., 2005). Os elementos-traço podem ser adicionados ao solo devido tanto a ações naturais quanto antropogênicas. As ações naturais compreendem o intemperismo de rochas e minerais, as emissões vulcânicas e outros, enquanto que as ações antropogênicas envolvem os aterros sanitários, as atividades industriais e de mineração, as aplicações de corretivos, de fertilizantes e de pesticidas, entre outros. A concentração dos diferentes elementos-traço em solos antes da adição antropogênica é, geralmente, aceita como benigna, ou de pouco risco, porque o crescimento de plantas ou a qualidade da água não são afetados adversamente (CHANG et al., 1984). Entretanto, há locais onde, mesmo sem a adição de materiais contendo elementos-traço, sua concentração excede os limites admissíveis para solos devido a processos naturais de enriquecimento com elementos-traço ou de fatores de formação do solo. Nos locais onde esses níveis base de elementos-traço são altos e em situações onde eles possam estar presentes em formas muito móveis no solo, podendo vir a ser biodisponíveis, o risco gerado pela presença desses elementos-traço se eleva (GUILHERME et al., 2005). O conteúdo total de elementos-traço em solos tem refletido a extensão da contaminação de atividades humanas e processos naturais de intemperismo de solos, mas o comportamento de elementos-traço depende de sua forma química ou iônica. Esta forma é, certamente, muito influenciada pelo pH, quantidade presente, solubilidade, origem pedogênica ou antropogênica, e sua interação com os colóides do solo em um ambiente dinâmico, como o solo. Adicionalmente, a disponibilidade destes elementos-traço pode ser afetada pelas reações mediadas biologicamente e redução/oxidação sequenciais ocorrendo no solo (SLAGLE, 2000).

A poluição do solo tem merecido atenção especial nos últimos anos por apresentar sérios riscos à saúde humana e à qualidade do ambiente

(GUILHERME, 1999). Dentre as atividades que mais contribuem para a poluição do solo com esses agentes destacam-se a mineração e a indústria metalúrgica, principalmente a de metais não ferrosos. Isso porque ao promoverem a extração de alguns metais, produzem grandes quantidades de rejeitos, muitas vezes com elevados teores de Ni, Cr, Cu, Pb, Cd e Zn, que afetam severamente a vegetação (BAKER et al., 1994) e as atividades biológicas do solo, como respiração e decomposição, no local e em áreas adjacentes (VANGRONSVELD et al., 1997).

Os solos possuem características únicas quando comparados aos outros componentes da biosfera (ar, água e biota), pois se apresentam não apenas como um dreno para contaminantes, mas também como um tampão natural que controla o transporte de elementos químicos e outras substâncias para a atmosfera, a hidrosfera e a biota (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001).

No entanto, a ocupação e uso do solo podem alterar sensivelmente os processos biológicos, físicos e químicos dos sistemas naturais. Estas alterações ocorridas em uma bacia hidrográfica podem ser avaliadas através do monitoramento da qualidade da água. Por meio do ciclo hidrológico, as chuvas precipitadas sobre as vertentes irão formar o deflúvio (escoamento) superficial que irá carrear sedimentos e poluentes para a rede de drenagem. Desta forma, o rio é um integralizador dos fenômenos ocorrentes nas vertentes da bacia, que pode ser avaliado pelos parâmetros de qualidade da água (MERTEN & MINELA, 2002).

### 2.1.1 O arsênio

O arsênio (As) é um semimetal, com densidade  $5,72 \text{ g cm}^{-3}$ , de ocorrência natural na crosta terrestre, presente em rochas magmáticas em concentrações que variam de  $0,5\text{-}2,6 \text{ mg kg}^{-1}$  e, em sedimentares, de  $1,0\text{-}1,3 \text{ mg kg}^{-1}$  (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Quanto à origem, pode ser litogênico, quando provenientes de fontes geológicas, com resíduos de rocha liberados pelo intemperismo, ou antropogênico, quando adicionado ao solo pela atividade humana, via mineração e aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes (SAKUMA et al., 2003).

O As é amplamente distribuído na atmosfera e na crosta terrestre (HABUDA-STANIC et al., 2008), sendo considerado como a substância mais perigosa à saúde humana pela ATSDR (2007). Em solos não contaminados, a concentração de As pode variar entre 1 e  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  (WENZEL et al., 2002; CETESB, 2005). Concentrações mais elevadas podem indicar uso excessivo de compostos agrofloretais como pesticidas, fertilizantes, inseticidas, desfolhantes e preservativos da madeira (GONZAGA et al., 2008; LEE et al., 2008).

A atividade de mineração é um dos principais meios pelo quais os metais e metalóides entram no ambiente. Essa atividade, em áreas que contêm minerais sulfetados, como arsenopirita (FeSAs), tem contribuído para a dispersão de As (BORBA et al., 2003; JUHASZ et al., 2007; LEE et al., 2008; CHOE et al., 2009), causando perda da vegetação e contaminação de mananciais hídricos e solos agrícolas, colocando em risco toda biota localizada ao redor das mineradoras (SILVA et al., 2004).

O arsênio pode existir em quatro estados de oxidação: arsina (-3), elementar (0), arsenito (+3) e arsenato (+5). Em condições óxicas ( $E_h > 200 \text{ mV}$ ; pH 5-8), o arsênio é encontrado na forma  $\text{As}^{5+}$ , enquanto que o  $\text{As}^{3+}$  se encontra em condições anóxicas (SMITH et al., 1998). Embora  $\text{As}^{3+}$  seja a

forma mais tóxica,  $\text{As}^{5+}$  é também tóxico a humanos, plantas e microrganismos (DATTA et al., 2007). Portanto, a toxidez do elemento depende muito de sua forma química e de seu estado de oxidação (MANDAL & SUZUKI, 2002).

O metalóide tende-se a se concentrar nos horizontes superficiais, em virtude da deposição atmosférica e reciclagem da vegetação (ALLOWAY, 1990; BROWN & ROSS, 2002). Esta concentração também pode ser atribuída à presença de óxidos e da matéria orgânica na camada superficial dos solos. Assim, a exposição ao As pela ingestão de produtos agrícolas, contato com a pele e ingestão de solo pode resultar em risco para a saúde humana (ZAKHAROVA et al., 2002).

O comportamento do arsenato no solo assemelha-se ao do fosfato, embora tenha uma maior tendência para formar ligação iônica, em vez de covalente, em razão do seu maior caráter metálico (BAIRD, 2002). A disponibilidade de As em solos é controlada pelo processo de sorção (adsorção/dessorção) com os óxidos de ferro, alumínio e manganês, matéria orgânica e os minerais de argila (WANG & MULLIGAN, 2006).

Enquanto, As e fósforo (P) ocupam o mesmo grupo da tabela periódica, o P é classificado como um não-metal. O P é um elemento essencial que participa de vários processos metabólicos em plantas, como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos, glicose, respiração, síntese e estabilidade de membrana, ativação e desativação de enzimas, reações redox, metabolismo de carboidratos e fixação de  $\text{N}_2$  (VANCE et al., 2003).

Vários são os atributos do solo que podem influenciar a adsorção do As e do P, sendo os principais: o tipo e teor de argila, de colóides amorfos e de matéria orgânica (NOVAIS & SMYTH, 1999; WANG & MULLIGAN, 2006). Esses elementos competem pelos mesmos sítios de sorção nas partículas do solo (ADRIANO, 2001; SMITH et al., 2002). Gao & Mucci (2001) observaram que o aumento da concentração de arsenato em solução resulta no aumento da

concorrência entre fosfato e arsenato nos sítios de sorção e uma posterior queda na quantidade do fosfato adsorvido.

Em um dos primeiros registros sobre análises de As em solos brasileiros, Curi & Franzmeier (1987) detectaram teores de As em Latossolo Roxo (atualmente Latossolo Vermelho perférrico) de  $36 \text{ mg kg}^{-1}$ . Esse estudo revela que a preocupação com elementos-traço como o As em solos brasileiros é relativamente recente. Pesquisa realizada por Marques (2000) evidenciou teores de As de até  $38 \text{ mg kg}^{-1}$  em latossolos sob vegetação de cerrado no Brasil, e valores similares foram obtidos por Oliveira et al. (2002). Esses valores máximos são semelhantes aos relatados por Campos (2004) em um trabalho com 17 amostras de Latossolos de diferentes regiões do Brasil (máximo:  $32 \text{ mg kg}^{-1}$  de As). Entretanto, no Brasil, tem sido relatada ocorrência de contaminação de águas (até  $0,36 \text{ mg L}^{-1}$ ), em solos (até  $860 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e sedimentos (até  $3.200 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por As nas proximidades de áreas industriais ou de mineração (MATCHULLAT et al., 2000; CANTONI, M., 2010).

#### **2.1.1.1 Casos famosos no mundo**

Os impactos negativos causados pelo As aos solos e águas têm despertado grande interesse do público devido principalmente à contaminação de uma parcela significativa de populações vizinhas às fontes geradoras desse elemento (RAWLINS et al., 1997).

As principais formas de intoxicação por As ocorrem via consumo de águas poluídas e por ingestão de solos contaminados (USEPA, 2002), resultando em efeitos tóxicos, agudos ou crônicos. Tais efeitos são relativos ao período de exposição e podem ocasionar diferentes patologias (BORBA, 2004).

Em 1984, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu que as águas potáveis deveriam ter no máximo  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de As. Porém, em 1993,

devido a novas evidências toxicológicas, a OMS reduziu a concentração máxima de As em água para  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) também fixou como padrão a concentração máxima de As em água potável em  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , com o objetivo de proteger os consumidores de sistemas públicos de água, evitando os efeitos causados pela exposição em longo prazo ao As (USEPA, 2002).

Atualmente no Brasil, de acordo com a Resolução do CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento e estabelece condições e padrões lançamento de efluentes, a concentração máxima de As permitida para qualidade de água classe 1 e 2 é de  $0,010\text{mg L}^{-1}$ , e para águas de classe 3, é de  $0,033 \text{mg L}^{-1}$ .

Solos contaminados com elevadas concentrações de As tem sido encontradas em diversos países, incluindo, Bangladesh, China, Eslováquia, Índia, EUA e Brasil (MASCHULLAT et al., 2000). No Brasil, as fontes naturais de contaminação por As, identificadas até o momento, estão relacionadas às rochas que hospedam depósitos auríferos sulfetados, como as da região do Quadrilátero Ferrífero (MG). Borba et al. (2004) verificaram que a concentração média de As em corpos d'água da região do Quadrilátero Ferrífero foi de  $30,5 \mu\text{m L}^{-1}$  e observaram que 22% das crianças apresentaram concentrações superiores a  $40 \mu\text{m L}^{-1}$  de As na urina.

Recentemente, Wolfe-Simon et al. (2010) descobriram um microrganismo capaz de substituir P por As nos componentes celulares. Trata-se de uma bactéria da família *Halomanadaceae* denominada GFAj-1. Wolfe-Simon et al. (2010), relatam que muitas dessas bactérias são conhecidas por serem capazes de tolerar elevadas concentrações de As, mas a GFAj-1 quando privada de P, pode incorporar As no seu DNA e continuar a se desenvolver, sugerindo que mesmo sendo um elemento extremamente tóxico pode ser essencial para

alguns seres adaptados a condições inóspitas. Entretanto, muitos pesquisadores ainda questionam os resultados publicados por Wolfe-Simon et al., 2010 (ZIMMER, C., 2010; MATSON, J., 2010; PENNISI, E., 2010; DRAHL, C., 2010; REDFIELD, R., 2010). Estes pesquisadores sugerem que seja mais provável que o As esteja sendo usado em outras partes das células, e que este fato possa estar relacionado com uso de metodologias e contaminantes inadequados. Portanto, é necessário saber quais as moléculas da célula que contem As e se estas moléculas estão ativas e funcionais (ZIMMER, C., 2010; MATSON, J., 2010; PENNISI, E., 2010; DRAHL, C., 2010).

### **2.1.2 Arsênio em plantas**

Assim como os nutrientes, as plantas absorvem os elementos-traço pelos mesmos mecanismos. Os metais e metalóides exercem um efeito tóxico às plantas, devido principalmente à interferência no transporte de elétrons da respiração e fotossíntese e na inativação de diversas enzimas vitais. Como consequência do baixo nível energético, há uma diminuição da absorção dos nutrientes e no crescimento das plantas (POMPÉIA, 2000).

O As não é um elemento essencial para plantas, e é geralmente considerado um elemento com elevada fitotoxidez. Contudo, as plantas têm sensibilidades variadas ao As. Sabe-se que os legumes são altamente sensíveis ao As (ADRIANO, 1986; DIAS et al., 2010), enquanto *P. vittata* pode crescer melhor na presença de As (MA et al., 2001).

A distribuição de As entre plantas também varia. Em níveis altos de As no solo, folhas e raízes velhas tendem a ter concentrações mais altas. Em concentrações de As de solo mais baixa, os níveis de As vegetal são maiores em folhas do que em raízes (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001).

A fitotoxicidade do As pode ser evidente em plantas em várias formas. Sintomas característicos de fitotoxicidade de As em plantas são: murchamento das folhas, crescimento lento das raízes e parte aérea, folhas com necrose, cor arroxeada e finalmente morte da planta (WOOLSON et al., 1971; ADRIANO, 1986; DIAS, et al., 2010). Em geral, o As inibe o metabolismo na maioria das plantas (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Mais especificamente, o arsenato pode provocar a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (MEHARG & MACNAIR, 1994; OREMLAND & STOLZ, 2003; GONZAGA et al., 2006) e também da capacidade de substituir o P em várias reações (GOYER, 1996; ZHANG et al., 2004). O arsenito afeta a função de enzimas e proteínas pela ligação a grupos sulfidrílicos (OREMLAND & STOLTZ, 2003). O fosfato não compete com a absorção de arsenito, e a deficiência em fósforo não aumentou o influxo de arsenito, indicando que sua absorção não compartilha o mesmo sistema de transportadores de fosfato (WANG et al., 2002).

Destaca-se, a nível celular, a perda da integridade da membrana, o que causa efluxo de íons, principalmente de potássio. A parede celular pode aumentar a sua rigidez devido a transtornos enzimáticos na biossíntese de constituintes da parede, assim como as propriedades elásticas da parede celular também podem ser modificadas diferencialmente por efeito do As (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1992).

A ação sobre o núcleo não parece ter igual importância para todos os tipos de elementos-traço e ainda que possa haver interação com ácidos nucléicos e inibição na divisão celular, os efeitos sobre as membranas e a parede celular, em certos casos, parecem ser os mais iniciais, mesmo porque a ação sobre o núcleo pode ser consequência dos desajustes da membrana. Há efeitos sobre o citoplasma e as organelas (cloroplasto, mitocôndria e complexo de Golgi), há uma forte distorção no sistema tilacoidal e na organização dos fotossistemas, que

apresentam fortes implicações metabólicas e na redução do crescimento. Como consequência dessas mudanças estruturais e metabólicas, relata-se, ainda, que o As pode também influenciar a captação e distribuição de nutrientes para as plantas através da competição direta com os nutrientes e, ou, da alteração dos processos metabólicos (MEHARG & HARTLEY-WHITAKER, 2002).

Compostos de As encontram-se no ambiente muitas vezes em concentrações tóxicas para a maioria dos seres vivos. Em resposta, assim como as plantas, os microrganismos do solo também evoluíram com relação aos seus mecanismos de resistência para adaptarem-se a altas concentrações de As. Estes mecanismos podem se manifestar através da redução do  $\text{As}^{5+}$  para  $\text{As}^{3+}$ , bem como da redução da entrada do As na célula, por aumentar especificamente a absorção de fósforo (CERVANTES et al., 1994), ou através de reações da peroxidação com membranas de lipídeos (ABDRASHITOVA et al., 1990). Segundo Tu et al. (2003), essa estratégia reside na maior facilidade de redução do arsenato a arsenito que fosfato a fosfito. O arsenito pode ser menos tóxico, devido à facilidade de sequestro vacuolar pela formação de complexos arsenito-tiol (-SH) e ou de fitoquelatina-As (MEHARG, 2002).

O comportamento químico do As na sua forma oxidada ( $\text{As}^{5+}$ ) é similar ao do fósforo no solo (GUILHERME et al., 2005). Em plantas, o arsenato é absorvido pelo mesmo sistema de transporte do fósforo (MEHARG & MACNAIR, 1994; MEHARG & HARTLEY-WHITAKER, 2002; WANG et al., 2002). Wang et al. (2002) observaram que com o aumento do suprimento de fosfato a absorção de As decresceu bastante, sendo esse efeito mais pronunciado na concentração de As das raízes que na concentração de As da parte aérea. Da mesma forma, com o aumento do suprimento de As, houve decréscimo na concentração de P nas raízes, mas, não na parte aérea. Nas maiores concentrações de As e suprimento de fósforo menor que  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  apareceram sintomas de fitotoxidez, mas com o incremento de P os sintomas foram

minimizados. O efeito da inibição é mais aparente quando a concentração de fosfato e arsenato na solução nutritiva são comparáveis.

Há uma hipótese que o arsenito é absorvido passivamente via aquagliceroporinos, ou canais que permitem movimento de água e solutos neutros, nas raízes. O arsenato é um elemento químico análogo ao fosfato, e é absorvido via sistema de transporte de fosfato (ASHER & REAY, 1979). Contudo, na *Holcus lanatus* L., *Deschampsia cespitosa* L. e *Agrostis capillaries* L. um sistema de transporte de fósforo alterado foi encontrado. Este sistema de transporte permite que estas plantas sejam tolerantes ao As pela diminuição do  $V_{max}$  e afinidade à captação de arsenato (MEHARG & MACNAIR, 1992; 1994).

### **2.1.3 Efeito do arsênio sobre a anatomia vegetal**

Diferentes respostas dos órgãos vegetativos, tais como crescimento radicular e da parte aérea, acúmulo de biomassa radicular e, ou, da parte aérea e biomassa total são passíveis de serem utilizados como indicadores da sensibilidade/tolerância de espécies vegetais a contaminantes do solo, inclusive ao As (MASCHER et al., 2002; LIU et al., 2005; GENG et al., 2006; SINGH et al., 2007). Dentre estes parâmetros de crescimento vegetal, Kapustka et al. (1995) consideraram a seguinte ordem de sensibilidade aos contaminantes: comprimento radicular > biomassa radicular > altura da parte aérea > biomassa total (raiz mais parte aérea) > biomassa da parte aérea > taxa de germinação.

O As pode interferir no crescimento radicular em consequência da redução das taxas respiratórias devido à substituição do fosfato pelo arsenato nos processos metabólicos de geração de energia, como a respiração celular (SHARPLES et al., 2000; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Há relatos da interferência do As no processo amilolítico, promovendo queda na atividade

das  $\alpha$ -amilases e conseqüente redução no crescimento radicular em função do déficit energético (ABEDIN & MEHARG, 2002; LIU et al., 2005).

Castillo-Michel et al. (2007) expuseram plântulas de ervilha ao As e verificaram significativa redução nas taxas de alongamento radicular associada à redução na atividade amilolítica, de cerca de 50%, nas raízes. Liu et al. (2005) verificaram, em plântulas de trigo expostas ao As, que o crescimento radicular é o parâmetro de crescimento mais sensível a presença deste elemento e que está inversamente relacionado à concentração de As no meio externo. A mesma resposta foi observada em plântulas de arroz (ABEDIN & MEHARG, 2002). Silva (2008) verificou que os primórdios radiculares foram formados bem próximos uns dos outros na raiz principal, provavelmente, em consequência da redução do crescimento da mesma.

Há relatos de um escurecimento das raízes, no qual está relacionado à ocorrência de reações de oxi-redução na superfície da raiz que interferem no funcionamento do órgão (NASCIMENTO, 2007). Este fato, aliado à ocorrência de alterações anatômicas e a um sistema radicular pouco desenvolvido, pode levar ao baixo suprimento de nutrientes essenciais e água, promovendo déficit hídrico indireto, afetando assim a parte aérea (CARBONELL-BARRACHINA et al., 1997).

O As é, muitas vezes, comparado a metais de transição e a outros metalóides que são, na maioria das vezes, micronutrientes ou nutrientes não-essenciais (MARSCHNER, 1995). Esses elementos são absorvidos em pequenas quantidades e, quando em concentrações tóxicas no meio intracelular, seus níveis são regulados visando à manutenção de concentrações celulares baixas e a homeostase celular (CLEMENS, 2001).

Com o As na forma de arsenato ocorre o oposto; sua similaridade química com o macronutriente fosfato, essencial no metabolismo dos vegetais, leva à absorção de quantidades relativamente elevadas deste elemento, através

de transportadores de fosfato existentes na raiz, por competição entre os dois radicais e da substituição do fosfato pelo arsenato (MEHARG & MACNAIR, 1992; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001; SHARPLES et al., 2000). Como resultado, o arsenato pode substituir o fosfato em processos bioquímicos e, ou, promover a diminuição da concentração de fosfato no meio intracelular, levando à redução de processos metabólicos vitais, como a fosforilação oxidativa na mitocôndria.

Em raízes de *Pisum sativum* (ervilha) expostas ao As, Päivöke (1983) verificou alterações na organização, tamanho e formato das células parenquimáticas do córtex; alterações no padrão de organização do estelo, com variação no número de pólos de protoxilema e disposição dos tecidos vasculares além de aumento na lignificação das células do estelo, dificultando a diferenciação das células floemáticas e xilemáticas das demais.

A desintegração tecidual observada pode estar associada à morte celular decorrente de estresse oxidativo, amplamente relatado na literatura em espécies vegetais expostas a concentrações tóxicas de As (HARTLEY-WHITAKER et al., 2001; MASCHER et al., 2002; NASCIMENTO, 2007; SINGH et al., 2007). Singh et al. (2007) atribuíram a redução nas taxas de crescimento radicular e os danos na estrutura anatômica à ocorrência de estresse oxidativo, resultando em danos às células.

O acúmulo de compostos fenólicos pode ser um indicativo da sensibilidade da planta ao As, visto que estas substâncias são componentes dos mecanismos de defesa não-enzimáticos contra fatores causadores de estresse (VAUGHN & DUKE, 1984). Alguns compostos fenólicos podem atuar na interceptação do elemento estressor, ligando-se a este e inibindo sua ação oxidante, ou atuar no reparo, removendo intermediários reativos de oxigênio (MICHALAK, 2006), possivelmente gerados pela presença do As no meio intracelular.

## 2.2 Estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e efeito do arsênio sobre as atividades enzimáticas

O estresse oxidativo pode ser biótico (causado por outros seres vivos) ou abiótico (causado por um fator externo que não um ser vivo, como seca, excesso de água ou de luz, elementos-traço, etc.). O estresse oxidativo, é definido por Vangronsveld & Clijsters (1994) como “o conjunto de alterações fisiológicas, resultantes da ação direta ou indireta das ROS (*reactive oxygen species* ou espécies reativas de oxigênio), com ação inibitória de enzimas, e que afetam os processos metabólicos, nomeadamente a respiração, fotossíntese, fixação do CO<sub>2</sub>, trocas gasosas e outros”.

O estresse oxidativo é assim uma consequência do aumento da produção intracelular de ROS. Este aumento desencadeia na planta uma resposta metabólica que se traduz na ativação de mecanismos específicos de eliminação do excesso de ROS no interior das células, de forma a obter um controle da sua acumulação, bem como a regulação da expressão genética para produção de metabólitos de sinalização (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutatona reduzida e oxidada, ascorbato e desidroascorbato),

Os organismos estão metabolicamente preparados para eliminar quantidades controladas dessas espécies, mas em condições de estresse há aumento da produção intracelular de ROS, sendo que os mecanismos normais de defesa não são suficientes para eliminá-los, e dessa forma anular o seu efeito adverso.

Os efeitos nocivos das ROS nas células resultam de danos oxidativos em constituintes celulares como aminoácidos, proteínas, glicídios, lipídios e ácidos nucleicos através de diversas reações que se encontram detalhadamente descritas em Moller et al. (2007). Como consequência, verifica-se a inibição de determinadas vias metabólicas por inibição de enzimas específicas (i.e.

fotossíntese, ciclo de Calvin e fosforilação oxidativa), alterações nas membranas dos cloroplastos, nos teores de clorofila total e na capacidade fotossintética, alterações em proteínas e lipídios membranares causando desestabilização das membranas, com conseqüente perda da compartimentação celular e aumento da permeabilidade a íons e solutos, etc. (VANGRONSVELD & CLIJSTERS, 1994; REICHMAN, 2002; MOLLER et al., 2007).

Sob condições normais de crescimento, a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS) nas células é baixa, mas diversas alterações nas condições normais podem retirar as células de sua homeostase, aumentando a produção de ROS (POLLE, 2001). Os ROS podem ser formados a partir da doação de energia ou de um, dois ou três elétrons para o oxigênio molecular formando, respectivamente, o oxigênio singleto ( $O_2^S$ ), o íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) (VALKO et al., 2006). Em contraste com o oxigênio molecular, os ROS podem causar danos a macromoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos), levando à destruição oxidativa da célula (KARENLAMPI et al., 2000; BARREIROS et al., 2006; VALKO et al., 2006).

O As, assim como outros elementos-traço, parece estimular a formação de ROS (MYLONA et al., 1998; TEISSEIRE & VERNET, 2001; CAO et al., 2004; VALKO et al., 2006). Embora os mecanismos de formação desses ROS ainda não sejam bem entendidos, sabe-se que o arsenato, por ser quimicamente semelhante ao fosfato, atua reduzindo a fosforilação oxidativa deslocando o fosfato na síntese de ATP (TERWEELE et al., 1967, citados por MASCHER et al., 2002), podendo levar à formação de intermediários reativos de oxigênio. Adicionalmente, a oxidação espontânea de arsenito em arsenato pode acarretar a formação de ROS (VALKO et al., 2006)

As defesas em plantas incluem a participação de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, POX, APX, GR) e antioxidantes não enzimáticos

(glutathiona, antocianinas), com a finalidade de diminuir os efeitos tóxicos dos ROS.

Dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) são metaloenzimas que agem como primeira linha de defesa contra os ROS (VALKO et al., 2006). Quando prótons estão disponíveis, as SOD catalisam o protonamento de duas moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Existem várias isoformas da SOD que diferem no tipo de metal presente no centro ativo, na constituição da cadeia aminoacídica, no número de subunidades e em outras características (VALKO et al., 2006). As diferentes isoformas estão localizadas nos cloroplastos, no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no apoplasto (MITTLER, 2002).

Catalases (CAT, EC 1.11.1.6) são enzimas que participam do controle dos níveis tóxicos de peróxido de hidrogênio, promovendo sua conversão em água e oxigênio molecular. Possuem um grupo heme em sua estrutura (VALKO et al., 2006) e atuam em peroxissomos (MITTLER, 2002).

Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) são enzimas que degradam o peróxido de hidrogênio em água e em um composto oxidado que depende do tipo de peroxidase atuante. São encontradas no citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular e no espaço extracelular (MITTLER, 2002). A peroxidase predominante é a peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) que catalisa a oxidação do ascorbato por peróxido de hidrogênio gerando o desidroascorbato (HIDEG, 1996). As APXs estão presentes no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no apoplasto e, principalmente, nos cloroplastos (MITTLER, 2002). As APXs participam com as redutases da glutathiona do ciclo ascorbato-glutathiona, que é induzido por estresse oxidativo (NOCTOR & FOYER, 1998; SMITH et al., 1998). As redutases da glutathiona (GR, EC 1.8.1.7) reduzem a glutathiona oxidada, utilizando NADPH, sendo a forma reduzida utilizada para

regenerar o ascorbato, substrato da APX (APEL & HIRT, 2004), resultando em consumo de  $H_2O_2$ .

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, os tióis revestem-se de grande importância. A glutatona, um tripeptídeo ( $\gamma$ -glu-cys-gly) hidrofílico, além de participar do ciclo ascorbato-glutaciona é capaz de consumir, quando reduzida, alguns ROS (HIDEG, 1996). Outra função bastante importante da glutatona é sua participação na síntese de fitoquelatinas (PC). As PCs são peptídeos não protéicos com a estrutura geral ( $\gamma$ -glu-cys) $_n$ -gly, em que  $n$  varia de 2-11, que podem ser rapidamente sintetizadas em resposta a níveis tóxicos de metais pesados (SCHMÖGER et al., 2000). As PCs são enzimaticamente sintetizadas a partir da glutatona pela sintase da fitoquelatina (PCS, EC 2.3.2.15) e complexam Cd, Cu, Hg e As (SCHMÖGER et al., 2000), conferindo tolerância a esses elementos tóxicos (CLEMENS, 2006).

Outros antioxidantes não enzimáticos de grande importância são os compostos fenólicos. Os flavonóides, agindo como antioxidantes, podem consumir ROS e, ainda, quelatar íons metálicos que seriam capazes de participar da reação de Fenton (VALKO et al., 2006). Plantas submetidas ao As têm apresentado aumento na concentração de antocianinas (GUIMARÃES, 2006).

Apesar de muitos estudos sobre a tolerância de plantas a metais pesados, e alguns sobre a tolerância ao As (MYLONA et al., 1998; SCHMÖGER et al., 2000; HARTLEY-WHITAKER et al., 2001; PAWLIK-SKOWRONSKA et al., 2001; MASCHER et al., 2002; CAI et al., 2004; CAO et al., 2004; TU et al., 2004), ainda não existem informações suficientes para se entender a tolerância de plantas, principalmente as fixadoras de nitrogênio, que são muito indicadas para utilização em programas de revegetação de áreas degradadas (ZHANG et al., 2004; LINS et al., 2006). Em parte, esta indicação se deve à capacidade destas espécies sobreviverem em ambientes degradados, com reduzida quantidade de matéria orgânica e de diversos nutrientes, principalmente

de nitrogênio (WONG, 2003). Além disso, há enorme carência de trabalhos que demonstram os efeitos do As sobre os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos comumente envolvidos em mecanismos de defesa ao estresse oxidativo. As defesas antioxidantes são sensíveis para indicar a toxicidade do As mesmo a planta não manifestando sintomas de fitotoxidez e podem ser utilizadas como ferramenta para avaliar os possíveis efeitos fitoprotetores dos FMAs para a planta hospedeira.

### **2.3 Fitotecnologia como técnica para recuperação de áreas degradadas**

Diversas técnicas de remediação são utilizadas em países desenvolvidos e com políticas ambientais rígidas, porém muito está por ser explorado neste sentido no Brasil. Uma das alternativas para restaurar a funcionalidade e a diversidade dos ecossistemas impactados por solos contaminados é o método da fitorremediação, mais recentemente descrito como “fitotecnologia”. Esta apresenta inúmeras vantagens, dada a sua natureza permanente, combinada aos baixos custos de manutenção, à proteção contra a erosão eólica e hídrica, melhoria na estrutura do solo, aumento da fertilidade do solo e a recuperação da estética aérea do solo (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Um dos requisitos básicos para o sucesso de qualquer técnica de revegetação é encontrar plantas tolerantes aos contaminantes (CARNEIRO et al., 2002).

Devido ao custo relativamente baixo, a fitorremediação comporta-se como uma atrativa opção para a despoluição de solos com metais pesados, principalmente em países em desenvolvimento, onde financiamentos para recuperação ambiental são escassos (NASCIMENTO et al., 2006). Accioly & Siqueira (2000) acreditam que a fitorremediação é uma prática promissora, com mercado garantido no país, se for considerada a existência de inúmeras e extensas áreas contaminadas, particularmente com elementos-traço.

A fitorremediação prevê vários mecanismos de despoluição (Figura 1), sendo que para áreas contaminadas com elementos-traço destaca-se a fitoestabilização e a fitoextração. A fitoestabilização visa reduzir o potencial de dano ao ambiente, pela redução da mobilidade e disponibilidade do contaminante no solo, sendo as plantas, neste caso, escolhidas por tolerar as condições da área, controlar a erosão e a lixiviação e assim evitar a translocação do contaminante para a parte aérea.

A fitoextração consiste na absorção e acumulação de elementos-traço na parte aérea de plantas (SANTOS et al., 2006). O potencial de fitoextração depende da interação entre solo, metal, planta e microrganismos de solo (LASAT, 2002). A planta ideal para fitoextração de elementos-traço deve ser tolerante aos seus altos níveis, acumular grandes quantidades na parte aérea, ter alta taxa de crescimento, produzir muita biomassa e ter sistema radicular abundante (GARBISU & ALKORTA, 2001). A translocação do contaminante da raiz para a parte aérea facilita a retirada do mesmo e, no final do ciclo da planta, quando a parte aérea é colhida, estas poderão ser, posteriormente, dispostas em aterros sanitários ou recicladas para a recuperação do elemento contaminante (CUNNINGHAM & OW, 1996).

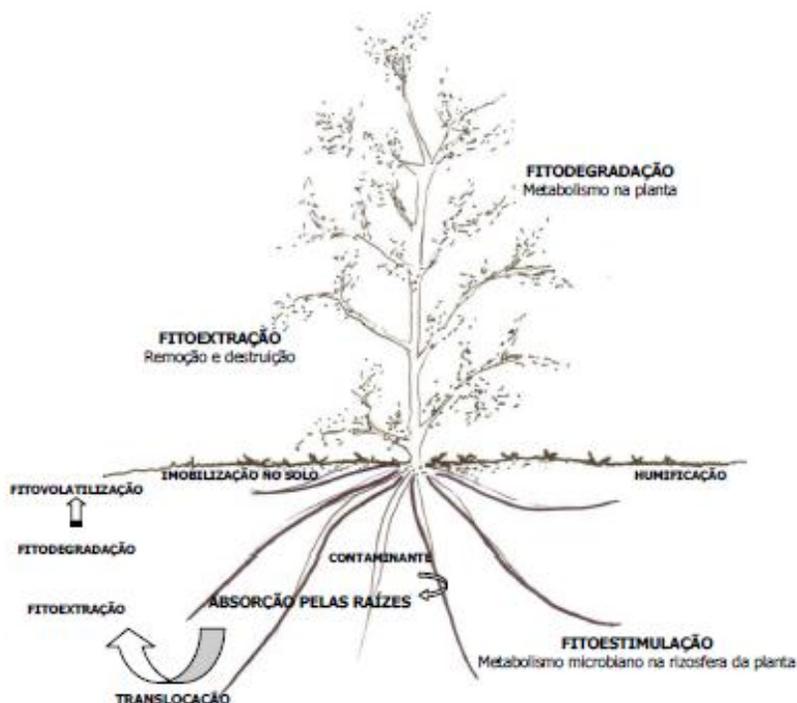


Figura 1 Mecanismos utilizados pelas plantas no processo de fitorremediação (ANDRADE et.al., 2007)

Contudo, a fitorremediação é uma tecnologia razoavelmente nova e é muito dependente da planta no sistema. Isto produz impacto na eficiência da fitorremediação; portanto, há muitas questões ou áreas de preocupação que necessitam ser observadas. Primeiro, se a planta tem um sistema radicular raso ela pode não ser capaz de plenamente remediar o solo ou água porque os contaminantes podem estar fora do alcance das raízes. Em segundo lugar, as plantas podem estar limitadas a locais de baixa ou moderada contaminação. Se os níveis de contaminação são altos demais há o risco de morte das plantas ou comprometimento de seu crescimento, o qual impediria a remediação. Em terceiro lugar, a taxa de limpeza é geralmente bem mais lenta que os métodos de remediação tradicionais. Isto pode apresentar um problema quando as exigências

para remediação do solo são mais imediatas. Em quarto lugar, não há sempre um pleno entendimento da fisiologia, bioquímica, captação, etc. das plantas empregadas (SCHNOOR, 2002). Portanto, não é sempre claro o que está ocorrendo entre a planta e o solo (i.e. volatilização ou lixiviação).

### **2.3.1 Fitoextração por espécies hiperacumuladoras**

Recentemente, Ma et al. (2001) descobriram a primeira planta descrita como hiperacumuladora de arsênio, a espécie de samambaia *Pteris vittata* L., que possui grande potencial como fitoextratora (GONZAGA et al., 2008). Hinchman et al. (1998), citados por Accioly & Siqueira (2000), afirmam que a taxa de remoção de um contaminante é dependente da biomassa coletada no final do ciclo, do número de cortes por ano, da concentração do contaminante na parte colhida e do fator de bioacumulação. De acordo com Watanabe (1997), uma boa hiperacumuladora deve possuir características tais como, alta taxa de acumulação mesmo em baixas concentrações do contaminante, alta taxa de crescimento e de produção de biomassa, resistência a pragas e doenças e tolerância ao contaminante.

A *Pteris vittata* L. enquadra-se nas características citadas por Watanabe (1997), principalmente, porque acumula alta quantidade de As na parte aérea e boa produção de biomassa. A produção de biomassa em 12 semanas de crescimento, em ambiente de casa de vegetação, foi de aproximadamente 0,5 g planta<sup>-1</sup> quando a *Pteris vittata* L. foi cultivada em solo contendo 500 mg de As kg<sup>-1</sup> (TU & MA, 2002). Concentração na biomassa de 2,3%, quando a *Pteris vittata* L. foi cultivada em solo com 500 mg kg<sup>-1</sup> de As (TU & MA, 2002).

A biomassa colhida pode ser processada para a retirada do contaminante, pode ter seu peso ou volume reduzido por processos microbianos,

físicos ou químicos, como a queima ou a digestão (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Entretanto, é conveniente conhecer a espécie de As acumulada e a possibilidade de contaminação secundária durante o transporte, a estocagem e disposição do resíduo enriquecido em As. No caso da *Pteris vittata* L., 94% do arsênio é acumulado na parte aérea na forma de arsenito (TU et al., 2003). Testes de lixiviação de As da folha da *P. vittata* L conduzidos por Tu et al. (2003) revelaram que folhas secas ao ar perderam substancial quantidade de arsênio. As perdas por lixiviação indicam que cuidados especiais na disposição final da biomassa enriquecida dessa samambaia devem ser tomados para evitar contaminação secundária. Entre as espécies testadas até o momento, são consideradas hiperacumuladoras as espécies *Pityrogramma calomelanos* (FRANCESCONI et al., 2002), *Pteris cretica* L. variedades Albo-lineata e Winsettii, *Pteris longifolia* L. e *Pteris umbrosa* R. Br. (ZHAO et al. 2002). Como todas as hiperacumuladoras descobertas até o momento pertencem à família *Pteridaceae*, Meharg (2002) afirma que a probabilidade de descoberta de outras hiperacumuladoras do gênero *Pteris* é grande, no entanto, não se deve descartar a probabilidade de ocorrência de samambaias hiperacumuladoras da mesma família e outros gêneros.

### **2.3.1.1 Outras samambaias hiperacumuladoras de As**

Desde a identificação inicial da *P. vittata* como uma hiperacumuladora de As, outras samambaias foram identificadas como hiperacumuladoras. Contudo, nem todas as samambaias são capazes de hiperacumular As (KUEHNELT et al., 2000; MEHARG, 2002; VISOOTTIVISETH et al., 2002; ZHAO et al., 2002; MEHARG, 2003). Até o presente, a maioria das samambaias que hiperacumulam As pertencem ao gênero *Pteris*.

*Pteris cretica*, *P. Longifolia* e *P. umbrosa* mostraram ser hiperacumuladoras de As na mesma quantidade que a *P. vittata* (ZHAO et al., 2002). Meharg (2003) descobriu que *Pteris tremula* e *Pteris stramina* não hiperacumulam As.

Em um estudo realizado por Zhao et al. (2002), quatro outras samambaias não-*Pteris* foram avaliadas. Contudo, elas não exibiram nenhuma habilidade de hiperacumular As. Numerosas espécies de samambaias também foram avaliadas por Meharg (2003), e a maioria destas espécies de samambaias também não hiperacumulam As. Até o presente, a única samambaia não-*Pteris* que exibiu esta habilidade é a *Pityrogramma calomelanos* (FRANCESCONI et al., 2002). A parte aérea foi capaz de acumular 2760 a 8350 mg kg<sup>-1</sup> de As quando cultivada em solo contendo 135 a 510 mg kg<sup>-1</sup> de As. Contudo, os autores não foram capazes de estabelecer uma relação direta entre as concentrações de As na parte aérea com aquelas no solo. Tal relação foi vista com *P. vittata* (MA et al., 2001). Interessantemente, a parte aérea com a maior concentração de As foi coletada de samambaias cultivadas em concentração de As mais baixa (135 mg kg<sup>-1</sup> de As). Portanto, estas samambaias têm a habilidade de eficazmente reduzir as concentrações de As do solo. Contudo a habilidade de hiperacumulação sob concentrações de As mais altas não foi considerada. Também foi sugerido que a *P. calomelanos* é uma candidata melhor à fitoextração do que a *P. vittata* porque ela pareceu ser capaz de crescer melhor em solos contaminados com As no qual ambas as espécies foram coletadas.

Em geral, essas plantas parecem apresentar mecanismos constitutivos e adaptativos que permitem elevada absorção e sobrevivência em solos com altas concentrações de As. Muitas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de entender e aumentar a capacidade de absorção de As dessas plantas (GONZAGA et al., 2006). Diante da importância da fitoextração como técnica remediadora para áreas contaminadas por As, há necessidade de estudos que

relacionam a tolerância de espécies de clima tropical, desenvolvidas em níveis crescentes de contaminação, com os aspectos fisiológicos dessas plantas, para que possam ser efetivamente cultivadas como fitoextratoras nas áreas contaminadas no Brasil.

### **2.3.2 Micorrizas na amenização da toxicidade de arsênio**

A colonização de fungos micorrízicos nas raízes pode modificar a aquisição e a tolerância das plantas a elementos-traço (LEE & GEORGE, 2005). O aumento da absorção de elementos-traço do solo é atribuído às hifas micorrízicas e, pelo efeito indireto da micorriza, nas mudanças morfológicas e fisiológicas das raízes da planta hospedeira. Vogel-Mikus et al. (2006) relatam que o aumento da absorção de elementos-traço do solo está relacionado com o micélio extrarradicular. Andrade et al. (2005) verificaram que as hifas extrarradiculares de fungos micorrízicos são capazes de transportar Cd da solução do solo para a planta e até restringir a transferência desse elemento para a parte aérea devido à imobilização fúngica na raiz.

Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de vários isolados de FMAs em solos com elevada poluição química e a ação fitoprotetora da simbiose micorrízica ao excesso de elementos-traço no solo (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; SIQUEIRA et al. 2007). Recentemente, Soares & Siqueira (2008) relatam os benefícios da inoculação de FMAs para o crescimento da *Brachiaria decumbens* em solos multicontaminados por elementos-traço, sendo este efeito atribuído à redução na concentração destes elementos na parte aérea das plantas micorrizadas. Apesar das evidências de proteção dos FMAs às plantas, os mecanismos envolvidos induzidos pelos fungos não são ainda bem estudados. Entretanto, vários mecanismos têm sido sugeridos como: efeito de diluição dos elementos-traço nos tecidos vegetais em decorrência do

favorecimento do crescimento da planta (CHRISTIE et al., 2004); exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera (KALDORF et al., 1999); redução da absorção devido à retenção e imobilização dos elementos-traço nas estruturas fúngicas (KHAN et al., 2000; ZHU et al., 2001; GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2002a) com consequente redução da transferência dos elementos das raízes para a parte aérea (JONER et al., 2000; CHRISTIE et al., 2004).

Recentemente, tem sido estudado também em várias partes do mundo, o envolvimento da simbiose micorrízica na redução da fitotoxidez de As. Estudos têm demonstrado que a maioria das plantas adaptadas a solos contaminados com As são geralmente associadas aos FMAs (GONZÁLEZ-CHAVEZ et al., 2002b; WANG et al., 2002; AGELY et al., 2005) e isto estaria relacionado com o aumento na aquisição de P pelas plantas micorrizadas (AHMED et al., 2006; CHEN et al., 2007). O arsenato é dominante sob condições aeróbicas, sendo este análogo ao fosfato. Devido a essa similaridade, a absorção de As e P pelas plantas e pelos FMAs pode ocorrer através dos mesmos transportadores (MEHARG & MACNAIR, 1992; ROSEN, 2002), o que possibilita o fosfato inibir efetivamente a absorção de arsenato.

Ahmed et al. (2006) demonstraram que a inoculação com *Glomus mosseae* em plantas de lentilha contribuiu para aumentar a tolerância das plantas ao As e isto foi relacionado com a melhoria da nutrição fosfatada das plantas. Em estudo mais recente, Xu et al. (2008) observaram que ocorreu um incremento de P na parte aérea e raízes de *Medicago truncatula* também colonizadas com *G. mosseae*, promovendo restrição na absorção de As pelas raízes. Chen et al. (2007), comprovaram que os FMAs tem uma grande contribuição na redução da fitotoxidez de As para as plantas. Os resultados indicam que plantas colonizadas por *G. mosseae* apresentaram maior peso seco e

um aumento substancial na concentração de P, e com concentrações de As significativamente baixas.

Estes estudos evidenciam a possível aplicação dos FMAs em práticas de remediação, porém ainda existem poucas informações disponíveis sobre o potencial dos FMAs em aumentar a tolerância das plantas ao As e os mecanismos envolvidos nesse processo de desintoxicação de ambientes contaminados com As. Em áreas de mineração de Au, geralmente têm sido constatados elevados teores de As (BORBA et al., 2003; LEE et al., 2008; CHOE et al., 2009), o que tem causado problemas ambientais e de saúde (MATSCHULLAT et al., 2000), e estudos caracterizando o potencial dos FMAs em proteger as plantas hospedeiras ainda são inexistentes no Brasil.

Assim, a tolerância de plantas micorrizadas a elementos-traço parece estar associada a fungos de crescimento rápido e que produzem grande massa de micélio, com constante renovação do mesmo, visto que a tolerância à planta hospedeira está associada ao acúmulo desses elementos no micélio fúngico (CHRISTIE et al., 2004). Portanto, a obtenção e seleção de isolados adaptados às condições de excesso de elementos-traço, o estudo de mecanismos e fatores envolvidos no efeito protetor e o conhecimento da base genética e molecular da plasticidade desses fungos em relação a esse fator ambiental, são importantes tópicos que precisam ser estudados para dar sustentação ao desenvolvimento tecnológico para aplicação desses fungos na reabilitação de áreas com solos contaminados.

## REFERÊNCIAS

ABDRASHITOVA, S. A. et al. Oxidation of iron and manganese by arsenic-oxidizing bacteria. **Mikrobiologiya**, v.59, p. 85-89, 1990.

ABEDIN, M.D.J.; MEHARG, A.A. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 243, n.1, p. 57-66, Mar. 2002.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. & SCHAEFER, C.E., ed. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 299-352, Jul. 2000.

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York, Springer Verlag, 1986. 533p.

ADRIANO, D.C. **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals**. 2. ed. New York, Springer Verlag, 2001. 867p.

AGELY, A.; SYLVIA, D.M.; MA, L.Q. Mycorrhizae increase arsenic uptake by the hyperaccumulator Chinese Brake Fern (*Pteris vittata* L.). **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 34, p. 2181–2186, Nov. 2005.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Cercla priority list of hazardous substances**. Atlanta: ATSDR, 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>>. Acesso em: 10 out. 2010.

AHMED, F.R.S.; KILLHAM, K.; ALEXANDER, I. Influences of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and nutrition of lentil irrigated with arsenic contaminated water. **Plant and Soil**, v. 283, n.1-2, p. 33-41, Jan. 2006.

ALLOWAY, B. J. The origin of heavy metals in soils. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). **Heavy metals in soils**. New York: J. Wiley, 1990. p. 29-39.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação, o uso de plantas na melhoria ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos. 176p., 2007.

ANDRADE, S.A.L.; JORGE, R.A.; SILVEIRA, A.P.D. Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 389-394, July/Aug. 2005.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, June 2004.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiology Plant**, v. 85, n.2, p. 235-241, June 1992.

ASHER, C.J.; REAY, P.F. Arsenic uptake by barley seedlings. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 6, n.4, p. 459-466, 1979.

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

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. 1-4, p.41-49, June 1994.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, v.2, p.345-361, 1992.

BARREIROS, A.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, Aug. 2006.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, E. B. R.; MATSCHULLAT, E. J. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from iron quadrangle, Brazil. **Environmental Geology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 39-52, Jan. 2003.

BORBA, R.P.; FIGUEIREDO, B.R.; CAVALCANTI, J.A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola Minas**, v.57, n. 1, p.45-51, Jan./Mar. 2004.

BROWN, K. G.; ROSS, G. L. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American council on science and health. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 36, n. 2, p. 162-174, Out. 2002.

CAI, Y.; SU, J.; MA, L.Q. Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 129, n. 1, p. 69-78, May. 2004.

CAMPOS, M.L. **Reações de arsênio em Latossolos brasileiros de potencial agrícola e comparação de extratores**. 2004. 95p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas). Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG, 2004.

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

CAO, X.; MA, L.Q.; TU, C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 128, n. 3, p. 317-325, Feb. 2004.

CARBONELL-BARRACHINA, A.A. et al. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 3-4, p. 167-176, Dec. 1997.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p.1629-1638, Nov. 2002.

CASTILLO-MICHEL, H. et al. Use of X-ray absorption spectroscopy and biochemical techniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (*Pisum sativum*) plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 6-7, p. 457-463, June/July 2007.

CERVANTES, C. JI, G.; RAMIREZ, J. L.; SILVER, S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 355-367, Dec. 1994.

CHANG, A.C. et al. Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. **Journal of Environmental Quality**. v. 13, n. 1, p. 87-91, 1984.

CHEN, B. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. **Science of the Total Environment**, v. 379, n. 2-3, p. 226-234, July 2007.

CHOE, E. et al. Qualitative analysis and mapping of heavy metals in an abandoned Au-Ag mine area using NIR spectroscopy. **Environmental Geology**, Berlin, v. 58, n. 3, p. 477-482, Aug. 2009.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 209-217, Jan. 2004.

CLEMENS, S. Evolution and function of phytochelatase synthases. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 319-332, Feb. 2006.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, n. 4, p. 475-486, Set. 2001.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de 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](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2010

CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 715-719, Mar. 1996.

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.

DATTA, R.; MAKKRIS, K. C.; SARKAR, D. Arsenic fractionation and bioaccessibility in two alkaline Texas soils incubated with sodium arsenate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 52, n. 4, p. 475-482, Mar. 2007.

DIAS, L. E. et al. Growth seedlings of pigeon pea, (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), wand riverhemp (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) in an arsenic-contaminated soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** (Online), v. 34, p. 975-983, Mar. 2010.

DRAHL, C. Arsenic bacteria breed backlash. Chemical and Engineering. **News**, v. 88, n. 50, p. 7, Dec. 2010.

ESSINGTON, M.E. **Soil and water chemistry: an integrative approach**. CRC Press, Boca Raton, 2004. 534p.

FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **The Science of the Total Environment**, Oxford, v. 284, n. 1-3, p. 27-35, Feb. 2002.

GAO, Y.; MUCCI, A. Acid base reactions, phosphate and arsenate complexation, and their competitive adsorption at the surface of goethite in 0,7 M NaCl solution. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 65, n.14, p. 2361-2378, July 2001.

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.

GENG, C.N. et al. Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v.279, n. 1-2, p. 297-306, Jan. 2006.

GONZAGA, M.I.S.; SANTOS, J.A.G.; MA, L.Q. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 90-101, Jan./Feb. 2006.

GONZAGA, M.I.S.; SANTOS, J.A.G.; MA, L.Q. Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils: Repeated harvests and arsenic redistribution. **Environmental Pollution**, v. 154, n. 2, p. 212-218, July 2008.

GONZÁLEZ-CHAVEZ, C. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. **New Phytologist**, v. 155, n.1, p.163-171, July 2002b.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C. et al. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v. 240, n. 2, p. 287-297, Jan. 2002a.

GOYER R.A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN C.D. (Ed.) Cassarett & Doull's Toxicology – **The basic science of poisons**. Mcgraw Hill. New York, p. 691-736, 1996.

GUILHERME, L. R. G. Poluição do solo e qualidade ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: SBCS, 1999. 1CD-ROM

GUILHERME, L.R.G. et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 345-390, Jul. 2005.

GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG, 2006.

HABUDA-STANIC, M. et al. Arsenite and arsenate sorption by hydrous ferric oxide/polymeric material. **Desalination**, v. 229, n. 1-2, p. 1-9, Set. 2008.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; MEHARG, A.A. Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lantus* L., clones with differential sensitivity. **Plant Cell and Environmental**. v. 24, n. 7, p. 713-722, July 2001.

HIDEG, E. **Free radical production in photosynthesis under stress conditions**. In: PESSARAKLI, M. (ed.) Handbook of photosynthesis, p.911-930. University of Arizona, 1996.

JONER, E.J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil**, v. 226, n. 2, p. 227-234, Jan. 2000.

JUHASZ, A. L. et al. In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. **Chemosphere**, Oxford, v.69, n. 1, p. 69-78, Aug. 2007.

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

KALDORF, M. et al. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal Plant and Physiology**, v. 154, n. 5-6, p. 718-728, 1999.

KAPUTSKA, L.A. et al. Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contaminated by smelter emissions: II. Laboratory phytotoxicity studies. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 14, p. 1905-1912, 1995.

KARENLAMPI, S. et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, Oxford , v. 107, n. 2, p. 225-231, Feb. 2000.

KHAN, A.G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, Oxford , v. 21, n. 1-2, p. 197-207, July 2000.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.85-144, Jul. 2005.

KUEHNELT, D.; LINTSCHINGER, J.; GOESSLER, W. Arsenic compounds in terrestrial organisms. IV Green plants and lichens from an old arsenic smelter in Austria. **Applied Organometallic Chemistry**. v.14, n. 8, p. 411-420, Aug. 2000.

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals : a review of biological mechanisms. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 1, p. 109-120, Feb. 2002.

LEE, J.S. et al. Evaluation of human exposure to arsenic due to rice ingestion in the vicinity of abandoned Myungbong Au-Ag mine site, **Journal of Geochemical Exploration**, Korea, v. 96, n. 2-3, p. 231-235, Feb./Mar. 2008.

LEE, Y.J.; GEORGE, E. Contribution of mycorrhizal hyphae to the uptake of metal cations by cucumber plants at two levels of phosphorus supply. **Plant and Soil**, v. 278, n. 1-2, p. 361-370, Jan./Feb. 2005.

LINS, C.E.L. et al. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit., in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n.3, p. 181-185, Mar. 2006.

LIU, X. et al. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere**, v. 6, n. 2, p. 293-301, Oct. 2005.

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

MANDAL, B.K.; SUZUKI, K.T. Arsenic around the world: a review. **Talanta**, v. 58, n. 1, p. 201-235, Aug. 2002.

MARQUES, J. J. G. S. M. **Trace element distributions at the landscape and micrometer scales**. Purdue University. 2000. 183p. PhD Thesis West Lafayette Purdue University. Disponível em: <http://www.dcs.ufla.br/marques/teses/marques.pdf> acesso em: 26 de março. 2008.

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

MATSCHULLAT, J. et al. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 15, n. 2, p. 181-190, Feb. 2000.

MATSON, J. **Poison Nil: Mono Lake bacterium exhibits exotics arsenic driven biological activity**. Disponível em: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=arsenic-life>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

MECHARG, A.A. Arsenic and old plants. **New Phytologist**, v. 156, n. 1, p. 1-4, Out. 2002.

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

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. Relationship between plant P status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* L. Beauv. that differs in their tolerance to arsenate. **Plant and Soil**, v. 162, n. 1, p. 99-106, Feb. 1994.

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**, v.43, n. 4, p.519-524, Out. 1992.

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

MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v.3, n.4, p.33-38, Out./Dez. 2002.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, Mar. 2006.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, June 2007.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N.; SCANDALIOS, J.G. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 576-585, Set. 1998.

NASCIMENTO, C.W.A; AMARASIRIWARDENA, D.; XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 140, n. 1, p. 114-123, Mar. 2006.

NASCIMENTO, K.J.T. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. 2007. 36p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2007.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, June 1998.

NOGUEIRA, M.A. ; SOARES, C. R. F. S. . Micorrizas arbusculares e elementos-traço. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; SIU MUI TSAI, S.M. (Org.). **Micorrizas: 30 Anos de Pesquisa no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, v. 01, p. 475-501, 2010,

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 399p.

OLIVEIRA, R. C. et al. Arsênio em solos do Cerrado. In: XXV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 2002, **Anais...** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2002, 9 p.

OREMLAND, R.S.; STOLZ J.F. The ecology of arsenic. **Science**. v. 300, n. 5621, p. 939-944, May. 2003.

PÄIVÖKE, A. The short-term induced effects of zinc on the growth, anatomy and acid phosphatase activity of pea seedlings. **Annales Botanici Fennici**, v. 20, p. 197-203, 1983.

PAWLIK-SKWRONSKA, B. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3-4, p. 241-249, May. 2001.

PENNISI, E. **Author of controversial arsenic paper speaks**. Science Insider. Disponível em: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2010/12/author-of-controversial-arsenic-.html>. Acesso em: 11 de dezembro de 2010.

PIERZYNSKI, G.M.M; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton, Lewis Publishers, 1994. 313p.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, p. 445-462, 2001.

POMPÉIA, S. L. **Resposta das plantas nativas brasileiras à poluição**. In: **Ecofisiologia Vegetal** (W. Larcher, ed.). São Carlos, v. 449, 454 p., 2000.

PRASAD, M. N. V. **Heavy metal stress in plants from molecules to ecosystems**. (2 Ed.), 520 p., Fev. 2004.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. **Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environmental**. John Wiley & Sons. New York, 2000. 304p.

RAWLINS, B.G. et al. Preliminary investigation of mining-related arsenic contamination in the provinces of Mendoza and San Juan (Argentina) and Minas Gerais (Brazil). **British Geological Survey**, Technical Report WC/97/60. 1997. 27p.

REDFIELD, R. **My letter to science**. RR Research blog. Disponível em: <http://www.rrresearch.blogspot.com/2010/12/my-letter-to-science.html>. Acesso em: 7 de dezembro de 2010.

REICHMAN, S. M. **The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc**, In: FOUNDATION, A. M. E. E. (ed.), 54p., 2002.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86-92, Jan. 2002.

SAKUMA, A.M.; CAPITANI, E.M. de; TIGLEA, P. Arsênio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. (Ed.). **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, p.203-238, 2003.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B; MAZUR, N. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, p.419-432.

SCHMOGER, M.E.V.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, v. 122, p. 793-802, Mar. 2000.

SCHNOOR, J.L. Phytoremediation of soil and groundwater. **GWRTAC Technology Evaluation Report TE-02-01**, 2002.

SHARPLES, J.M. et al. Symbiotic solution to arsenic contamination. **Nature**, v. 404, p. 951–952, Apr. 2000.

SILVA, K.L.F. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. 2008. 98p. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2008.

SILVA, S.R. et al. Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 189-197, Jan./Fev. 2004.

SINGH, H.P. et al. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v.53, n. 1, p. 65-73, July 2007.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-306, Dez. 2007.

SLAGLE, A. **Background concentrations of trace elements in three West Virginia soils: MLRA-126.** (Dissertação de Mestrado). College of Agriculture, Forestry, and Consumer Sciences at West Virginia University. Morgantown, West Virginia, 174p., 2000.

SMITH, E.; NAIDU, R.; ALSTON, A.M. Arsenic in the soil environment: a review. **Advances in Agronomy**, v. 64, p. 149-195, 1998.

SMITH, E.; NAIDU, R.; ALSTON, A.M. Chemistry of inorganic arsenic in soils: II., effect of phosphorus, sodium, and calcium on arsenic sorption. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 2, p. 557-563, 2002.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833-841, Jan. 2008.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Eds). **Soil biodiversity an Amazonian and other Brazilian ecosystems.** Wallingford: CABI-Publishing, p.206-236, 2006.

TEISSEIRE, H.; VERNET, G. Effects of the fungicide folpet on the activities of antioxidative enzymes in duckweed (*Lemna minor*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 69, n. 2, p. 112-117, Feb. 2001.

TU, C. et al. Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 124, n. 2, p. 223-230, July 2003.

TU, C. et al. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 51, n. 2, p. 121-131, Apr. 2004.

TU, C.; MA, L.Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 2, p. 641-647, 2002.

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**, v.50, n. 3, p.243-251, Dec. 2003.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3ed. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2008.

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

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLEN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, n. 3, p. 423-447, Mar. 2003.

VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. Toxic effects of metals. In: FARAGO, M. E. **Plants and the chemical elements: Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity**, p. 149-177, 1994.

VANGRONSVELD, J.; COLPAERT, J. V.; TICHELEN, K. K. van. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 131-140, Feb. 1997.

VARENNE, A. Produtividade dos Solos e Ambiente: **Escolar Editora**. 2003.

VAUGHN, K.; DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 60, n. 1, p. 106-112, Jan. 1984.

VISOOTTIVISETH, P.; FRANCESCONI, K.; SRIDOKCHAN, W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 453-461, Aug. 2002.

VOGEL-MIKUŠ, K. et al. Colonisation of a Zn, Cd e Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal e nutrient uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 139, n. 2, p. 362-371, Jan. 2006.

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

WANG, S.; MULLIGAN, C.N. Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. **Journal of Hazardous Materials**, v.138, n. 3, p.459-470, Dec. 2006.

WATANABE, M.E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, v.31, n. 4, p. 182A-186A, Apr. 1997.

WENZEL, W.W. et al. Arsenic in field-collected soil solution and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 165, n. 2, p. 221-228, Apr. 2002.

WOLFE-SIMON, F. et al. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*. doi:10.1126/science.1197258. 2010.

WONG, M.H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 775-780, Feb. 2003.

WOOLSON, E. A. **Emissions, cycling, and effects of arsenic in soil ecosystems**. In: FOWLER B.A. (ed.). Elsevier, Amsterdam. p., 52-125. 1983.

XU, P. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v.156, n.1, p.215-220, Nov. 2008.

ZAKHAROVA, T.; TATANO, F.; MENSNIKOV, V. Health cancer risk assessment for arsenic exposure in potentially contaminated areas by plants fertilizer: a possible regulatory approach applied to a case study in Moscow Region-Russia. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, California, v. 36, n. 1, p. 22-23, Aug. 2002.

ZHANG, W. et al. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p.337-345, Oct. 2004.

ZHAO, E.J.; DUNHAM, S.J.; McGRATH, S.P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytologist**, v.156, n. 1, p. 27-31, Oct. 2002.

ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P.; LAIDLAW, A.S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v.42, n. 2, p.193-199, Jan. 2001.

ZIMMER, C. **This paper should not have been publishes. Scientists see fatal flaws in the NASA study of arsenic – based life.** Slate, Disponível em: <http://www.slate.com/id/2276919>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

## CAPÍTULO 2

### FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS CONTAMINADOS COM ARSÊNIO

#### RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são de ocorrência generalizada e formam importante simbiose com a maioria das plantas, inclusive em solos contaminados com arsênio (As). Tem sido preconizado que os FMAs podem reduzir a fitotoxicidade de As por aumentar a aquisição de P pelas plantas micorrizadas. Por isso, torna-se necessário que se entenda melhor as relações ecológicas destes fungos com excesso de As no solo e seus efeitos nas plantas em condições brasileiras. Para isso, avaliou-se a ocorrência e a diversidade de FMAs em uma área impactada pela mineração de ouro em Paracatu-MG. Solos de quatro locais com diferentes concentrações de As foram amostradas: Área de referência ( $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de As); B1 ( $396 \text{ mg dm}^{-3}$  de As); Estéril ( $573 \text{ mg dm}^{-3}$  de As) e Rejeito ( $1046 \text{ mg dm}^{-3}$  de As). As coletas do solo foram realizadas em dezembro de 2008 (período chuvoso) e em setembro de 2009 (período seco) e foram coletadas 6 amostras compostas por área, totalizando 24 amostras. Verificou-se a ocorrência generalizada dos FMAs na área, sendo esta influenciada pelas concentrações de As e época de amostragem. Encontrou-se um total de 23 espécies sendo: 10 do gênero *Acaulospora*, cinco de *Scutellospora*, dois de *Racocetra*, quatro de *Glomus*, uma *Gigaspora* e uma *Paraglomus*. Isto sugere um grande e generalizado potencial de adaptação dos FMAs ao elevado teor de arsênio, sendo que *Acaulospora excavata*, *Acaulospora sp#1*, *Acaulospora sp#2*, *A. tubercullata*, *A. colombiana* e *Scutellospora sp#1* ocorreram em locais de maior teor de arsênio. As espécies de maior frequência foram *Paraglomus occultum*, *Acaulospora morrowiae* e *Glomus clarum*, sendo que estas espécies de FMAs ocorrem em todas as áreas estudadas. A dominância destas espécies indica sua elevada tolerância ao excesso de As. A contaminação com arsênio reduziu o número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares, apesar disso, há um aumento de espécies desses fungos na presença de plantas. Conclui-se que o As exerce efeito diferenciado sobre os FMAs, sendo estes efeitos dependentes do grau de contaminação.

Palavras-chave: Micorrizas. Diversidade. Mineração de ouro.

## ABSTRACT

Vesicular arbuscular mycorrhizal (AMF) fungi are ubiquitous establishing symbiosis with a large number of plants in spite of soil contamination with arsenic (As). It has been suggested that AMF may reduce the phytotoxicity of As by increasing the acquisition of P by mycorrhizal plants. Therefore, it is important to study the ecology of AMF in soils contaminated with As, as well as its effect on the symbiotic relationship between AMF and cultivated plants for the Brazilian conditions. We assessed the occurrence and diversity of AMF in an area impacted by gold mining in Paracatu, Brazil. Soils of 4 locations with different concentrations of As were sampled: Reference area ( $10 \text{ mg dm}^{-3}$  As), B1 ( $396 \text{ mg dm}^{-3}$  As), undisturbed material ( $573 \text{ mg dm}^{-3}$  As), and mine waste ( $1046 \text{ mg dm}^{-3}$  As). Six soil samples were taken in December 2008 (rainy season) and in September 2009 (dry season) from each area, totaling 24 samples. There was a widespread occurrence of AMF in the area, which is influenced by the concentrations of As and sampling time. A total of 23 species were identified, belonging to the following genus: *Acaulospora* (10 species), *Scutellospora* (5 species), *Racocetra* (2 species), *Glomus* (4 species), *Gigaspora* (1 specie) and *Paraglomus* (1 specie). This suggests a large and widespread potential for adaptation of AMF to the high levels of As, while *Acaulospora excavata*, *Acaulospora sp#1*, *Acaulospora sp#2*, *A. tubercullata*, *A. colombiana* e *Scutellospora sp#1* occurred in places of higher content As. The most frequent species identified were: *Paraglomus occultum*, *Acaulospora morrowiae* and *Glomus clarum*. The dominance of these species indicates their high tolerance to excess As. Contamination with arsenic reduced the number of species of mycorrhizal fungi, yet there is an increase of species of fungi in the presence of plants. Our results show that arsenic exerts differential effects on AMF populations, which is affected by the intensity of As pollution.

Keywords: Mycorrhizae. Diversity. Gold mining.

## 1 INTRODUÇÃO

O risco à saúde humana associado à presença de elementos tóxicos no ambiente é influenciado pela quantidade total de elementos-traço presente no ambiente, sua toxicidade, biodisponibilidade e bioacessibilidade (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Estudos em locais próximos a complexos industriais e de refino de minério indicam concentrações elevadas de elementos-traço no solo, os quais podem afetar a funcionalidade, a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas, causando danos, às vezes irreversíveis às propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Elementos contaminantes, como arsênio (As), são expostos a superfície do solo sofrendo alterações de forma e podem entrar na cadeia trófica quando são disseminados de alguma forma via água ou ar (RAWLINS et al., 1997; BORBA, 2004).

A recuperação de solos degradados pelo excesso de As pode ser viabilizada através de vários processos, dos quais a revegetação é a estratégia mais recomendada (denominada de Fitotecnologia), de menor custo, e promove a fitoestabilização da área (RASKIN & ENSLEY, 2000). Entretanto, para o estabelecimento de uma comunidade de plantas nestas condições, a população microbiana deve ser diversa e funcional. Um dos representantes desta população e que deve ser considerado são os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), que estabelecem uma relação simbiótica mutualística conhecida como Micorriza Arbuscular (MA) com a maioria das plantas terrestres (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; STÜRMER & SIQUEIRA, 2006) e por isso representam parte integrante da microbiota de qualquer solo funcionalmente ativo (SIQUEIRA et al., 2007).

As MA aumentam a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, principalmente P em solos de baixa fertilidade (MOREIRA &

SIQUEIRA, 2006). O arsenato é dominante sob condições aeróbicas, sendo este análogo ao fosfato. Devido a essa similaridade, a absorção de As e P pelas plantas e pelos FMAs pode ocorrer através dos mesmos transportadores existentes nas membranas fúngicas (MEHARG & MACNAIR, 1992; MEHARG & HARTLLEY-WHITAKER, 2002; ROSEN, 2002). Este processo, possibilita o fosfato inibir efetivamente a absorção de arsenato (XIA et al., 2007; XU et al., 2008).

Assim como nas plantas, os FMAs também sofrem efeitos tóxicos em locais com elevadas concentrações de As. Em solos muito degradados, a diversidade e a atividade dos FMAs são reduzidas ou às vezes eliminadas (KLAUBERG FILHO et al., 2002; SIQUEIRA et al., 2007). Entretanto, pouco se conhece sobre a ação fitoprotetora dos FMAs nestas condições, não sendo até o momento, conhecido nenhum trabalho realizado em solos brasileiros contaminados por As. As altas concentrações de As podem exercer um efeito seletivo sobre as populações, favorecendo a dominância de certas espécies mais adaptadas, o que teria impacto sobre a vegetação, e que pode ter efeitos diferenciados para as plantas de acordo com a identidade do isolado ou espécies fúngica (POUYU-ROJAS et al., 2006) Isto resulta na alteração na absorção, acumulação ou translocação de As na planta ou de uma nutrição melhor balanceada (CHRISTIE et al., 2004; KLAUBERG FILHO et al., 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Diante da hipótese de que a contaminação do solo com As interfere na comunidade e na atividade dos FMAs e que estes efeitos estão relacionados à tolerância diferenciada de isolados, esforços para se conhecer melhor a ecologia destes fungos em solos contaminados com As são de grande interesse, principalmente quando se pretende introduzir espécies/isolados mais eficientes com o objetivo de promover a fitoestabilização da área (CHRISTIE et al., 2004). A contribuição dos FMAs para as plantas em solos contaminados com As está

relacionada a diversos aspectos como diversidade, abundância, persistência e eficiência das populações, que podem variar entre locais e em função de variáveis ambientais e presença de vegetação. Portanto, considerando os FMAs como importante componente dos ecossistemas é de importância fundamental conhecer o impacto dessa poluição sobre a ocorrência e diversidade das populações de FMAs nativas em áreas degradadas pela mineração de ouro, o que foi objeto do presente estudo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Escolha e descrição das áreas de estudo**

A área em estudo está localizada no Morro do Ouro nas proximidades do município de Paracatu, região noroeste do estado de Minas Gerais. As instalações da Kinross em Paracatu compreendem uma mina a céu aberto com o menor teor aurífero do mundo, com uma média de 0,40 g de ouro por tonelada de minério. A empresa investe permanentemente em tecnologias de extração que viabilizam as operações em Paracatu, assegurando níveis médios de produção anual de até 15 toneladas.

Ao longo da atividade de mineração de ouro, são produzidos resíduos minerais chamados de estéreis, o produto final e os rejeitos. Os estéreis são provenientes do decapeamento da mina durante a lavra, os quais apresentam na sua constituição compostos da família dos sulfetos, tais como arsenopirita, pirita, pirrotita e calcopirita (AMORIN, 2007). Durante o beneficiamento ou tratamento de minérios, o que envolve separações físicas e químicas, são produzidos resíduos minerais denominados rejeitos. Esses são lançados em barragens de contenção por meio do lançamento de um material na forma de

polpa constituído basicamente por resíduos minerais e líquidos (LADEIRA et al., 2002).

Uma visão geral da área de estudo, em Paracatu, encontra-se na Figura 1.



Figura 1 Localização das áreas de estudo em áreas de mineração de ouro em Paracatu-MG. AED = Área de empréstimo degradada; BRC = Barragem de resíduos contaminados; AM = área de mineração; AU = área urbana.

Para a realização do estudo, em julho de 2008, foram coletadas amostras em 11 áreas selecionadas e georreferenciadas, visando abranger diferentes estágios de degradação ambiental, com variações no modo, grau de contaminação e tipo de vegetação. Dessa forma, as áreas selecionadas foram: 1) Área de Referência - Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) = área de reserva permanente da mina, com vegetação de Cerrado, abrangendo um total de 73,44 hectares ( $17^{\circ}10'628''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'151''$  longitude oeste); 2) Área

de Empréstimo Degradada (AED) – área de retirada de solo para a construção da barragem ( $17^{\circ}08'621''$  latitude sul e  $46^{\circ}51'170''$  longitude oeste); 3) Rejeito = área (lagoa de retenção de resíduos) com materiais provenientes do beneficiamento do Au ( $17^{\circ}09'900''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'069''$  longitude oeste); 4) Área de mineração – B1 = camada subsuperficial presente em áreas de coleta de solo para extração de Au ( $17^{\circ}12'121''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'535''$  longitude oeste); B2 = material pouco intemperizado, do qual se extrai o Au ( $17^{\circ}12'023''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'723''$  longitude oeste); Estéril = material não aproveitável economicamente, devido ao seu baixo teor de Au ( $17^{\circ}12'050''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'481''$  longitude oeste); 5) Áreas com experimentos de Revegetação – denominadas “Experimento sobre B1” ( $17^{\circ}11'598''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'299''$  longitude oeste) e “Experimento de Cobertura e Revegetação” ( $17^{\circ}11'058''$  latitude sul e  $46^{\circ}52'588''$  longitude oeste).

As amostras de solo coletadas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixa de isopor para o Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), aonde foram mantidas em câmara fria a  $4^{\circ}\text{C}$  até serem submetidas a análises químicas conforme EMBRAPA (1999), quantificação dos teores de As pelo método USEPA 3051A (Tabela 1) e processadas para a extração de esporos, identificação das espécies de FMA (Figura 2) que esporulavam no momento da amostragem e contagem do número total de esporos das populações de FMAs, conforme Gerdeman & Nicolson (1963). Para a quantificação de As dos solos, foram utilizados os seguintes métodos:

**Mehlich-1 (As biodisponível):** Dois gramas de TFSA e 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$  +  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados ao tubo de centrifuga e agitados por 10 minutos e deixados em repouso por 24 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante filtrado e armazenado em pote plástico estéril.

**Método 3051 da USEPA (As Total):** Um grama de TSFA e 10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado foram adicionados a tubo de teflon PTFE em forno microondas, sendo realizada a digestão à pressão de 0,76 MPa por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi filtrada e 10 mL de água destilada foram adicionados ao tubo, sendo o conteúdo total armazenado em pote plástico estéril.

De posse dos extratos, os teores de As foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite, em equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800.

Tabela 1 Características químicas do solo nos locais de amostragem da RPM – Kinross, em Paracatu – MG, julho de 2008.

Áreas	pH	P	K	Ca	Mg	Al	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	S	As	
		--mg dm <sup>-3</sup> --	---cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ---	dag kg <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>	-----mg dm <sup>-3</sup> -----				Mehlich	USEPA				
RPPN	5,1	1,6	86,5	0,1	0,3	1,4	3,1	17,2	1,2	159,8	7,9	2,2	6,3	0,1	10,2
Emp.1	6,4	2,9	19,5	0,9	1,9	0,5	0,4	29,6	0,9	15,4	6,8	1,4	11,2	0,03	1,4
Emp.2	5,9	1,9	53,0	1,3	1,4	0,1	0,5	19,9	0,9	76,0	31,7	2,0	14,9	0,1	6,9
Emp.3	5,6	2,0	16,5	0,1	0,1	0,9	0,4	27,0	0,6	17,8	6,4	1,2	6,0	0,01	0,6
B1	5,0	12,3	12,0	0,1	0,1	0,5	0,4	46,0	0,2	20,0	0,7	0,4	23,9	13,2	396,0
B2	3,7	80,5	21,0	10,4	11,8	1,3	1,1	20,5	7,8	583,3	244,9	1,9	355,9	27,3	1849,5
Estéril	3,9	12,3	15,0	0,4	1,3	2,2	0,4	33,1	2,7	287,1	16,5	2,0	107,2	19,1	573,4
Rejeito1	6,6	67,1	66,0	1,2	1,4	0	1,2	45,4	2,2	431,2	11,9	1,5	146,5	28,8	1046,4
Rejeito2	7,2	80,5	72,5	1,3	1,5	0	1,4	44,1	2,7	540,3	13,2	1,6	128,6	33,8	871,7
Exp.B1	5,6	18,4	16,5	0,5	2,4	0,2	0,5	46,0	1,3	69,9	15,7	0,3	114,2	12,6	363,3
Exp.RC	6,6	8,7	41,0	1,2	1,1	0	1,2	33,4	6,3	58,7	22,5	1,2	19,3	6,8	377,2

Atributos químicos: MO (matéria orgânica) = %C x 1,723 (Raij et al., 1978); As USEPA = Teor total de arsênio no solo e As Mehlich = Teor biodisponível de arsênio no solo. RPPN = Área de Referência - Reserva Particular de Patrimônio Natural; Emp.1, Emp.2 e Emp.3 = área de retirada de solo para a construção da barragem; B1 = camada subsuperficial presentes em áreas de coleta de solo para extração de Au; B2 = material pouco intemperizado, do qual se extrai o Au; Estéril = material não aproveitável economicamente, devido ao seu baixo teor de Au; Rej.1 e Rej.2 = área (lagoa de retenção de resíduos) com materiais provenientes do beneficiamento do Au; Exp.1 = Experimento sobre B1; Exp.RC = Experimento de Cobertura e Revegetação

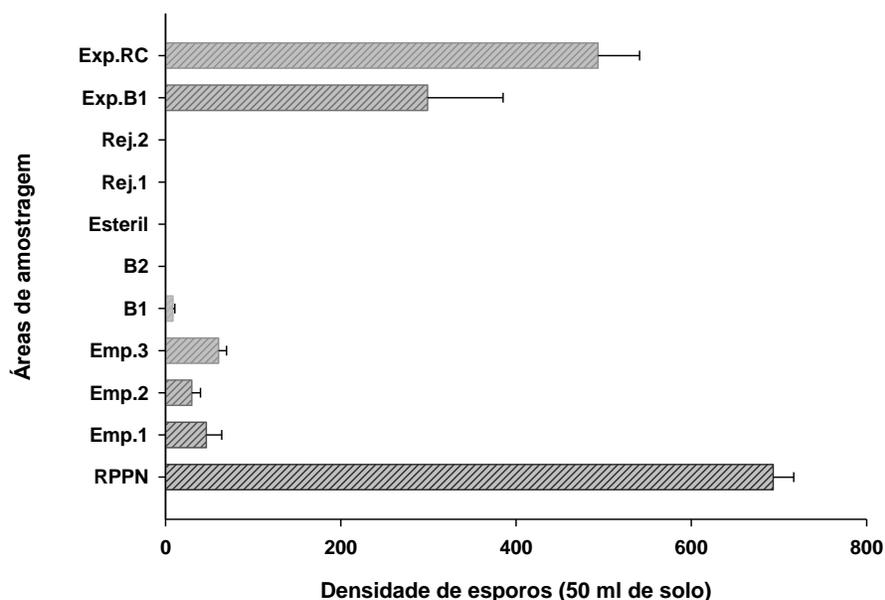


Figura 2 Densidade de esporos total dos locais de amostragem na RPM – Kinross, em Paracatu-MG, julho de 2008. RPPN = Área de Referência - Reserva Particular de Patrimônio Natural; Emp.1, Emp.2 e Emp.3 = área de retirada de solo para a construção da barragem; B1 = camada subsuperficial presentes em áreas de coleta de solo para extração de Au; B2 = material pouco intemperizado, do qual se extrai o Au; Esteril = material não aproveitável economicamente, devido ao seu baixo teor de Au; Rej.1 e Rej.2 = área (lagoa de retenção de resíduos) com materiais provenientes do beneficiamento do Au; Exp.1 = Experimento sobre B1; Exp.RC = Experimento de Cobertura e Revegetação

Devido à heterogeneidade das áreas e ao pouco conhecimento sobre a variabilidade dos impactos ambientais nas 11 áreas inicialmente selecionadas, reduziu-se o número de áreas selecionadas, a fim de se evitar que outros efeitos atuassem nos objetivos do estudo que não aqueles proporcionados pelos impactos ambientais associados à mineração. Sendo assim, os locais foram selecionados a partir da análise dos teores de arsênio (As USEPA e As Mehlich), pH, P, Fe, S, com o auxílio da Análise de Componentes Principais (ACP),

usando o programa CANOCO versão 4.0, que serviu como uma ferramenta estatística contribuindo para a decisão das áreas a serem avaliadas em estudos subsequentes (Figura 3).

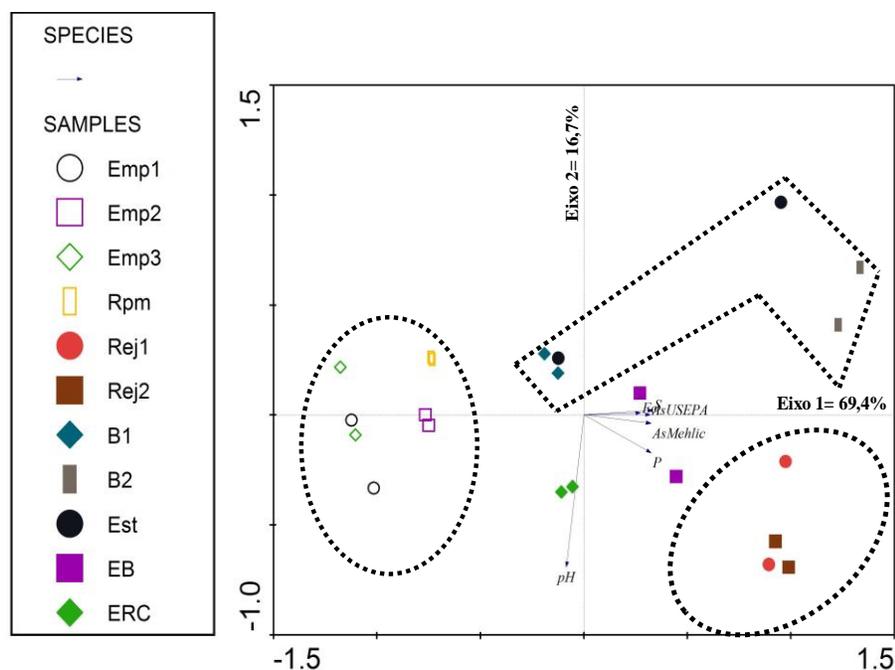


Figura 3 Análise dos componentes principais (ACP) para teores de arsênio (Mehlich e USEPA), pH, P, Fe e S. RPPN = Área de Referência - Reserva Particular de Patrimônio Natural; Emp.1, Emp.2 e Emp.3 = área de retirada de solo para a construção da barragem; B1 = camada subsuperficial presentes em áreas de coleta de solo para extração de Au; B2 = material pouco intemperizado, do qual se extrai o Au; Estéril = material não aproveitável economicamente, devido ao seu baixo teor de Au; Rej.1 e Rej.2 = área (lagoa de retenção de resíduos) com materiais provenientes do beneficiamento do Au; Exp.1 = Experimento sobre B1; Exp.RC = Experimento de Cobertura e Revegetação

Os eixos 1 e 2 correspondem a 69,4% e 16,7% da variabilidade, respectivamente (entretanto, o eixo 1 explicou muito mais do que o eixo 2), explicando juntos aproximadamente 86% da variabilidade total dos dados

(Figura 3). Nota-se que o Eixo 1 separa as áreas que apresentam elevados teores de As das áreas sem a contaminação com As, sendo essa separação influenciada por essa variável As (Mehlich e USEPA) principalmente. O eixo 2, explica 16,7% e separa Empréstimo 1, Empréstimo 2, Experimento de Cobertura e Revegetação e Rejeitos 1 e 2 dos demais locais. Observa-se que essa separação é altamente influenciada pela variável pH do solo.

## **2.2 Áreas selecionadas e amostragem a campo**

A partir da metodologia de ACP, foram selecionadas quatro áreas representativas, as quais foram empregadas para o ensaio de ocorrência de FMAs: 1) RPPN = Área de Referência – Reserva Particular de Patrimônio Natural; 2) B1 = camada subsuperficial presente em áreas de coleta de solo para extração de Au; 3) Estéril = material não aproveitável economicamente, devido ao seu baixo teor de Au; 4) Rejeito = área (lagoa de retenção de resíduos) com materiais provenientes do beneficiamento do Au.

Nas quatro áreas representativas, coletaram-se cinco sub-amostras para obter uma amostra composta, sendo que, foram coletadas seis amostras composta por área, totalizando 24 amostras. O método de amostragem foi padronizado para todas as áreas selecionadas, onde as amostras de solo foram coletadas com trato tipo holandês na profundidade de 0-20 cm (camada superficial). A distância entre os pontos de coleta foi superior a 5m e inferior a 15 m, e as sub-amostras eram armazenadas em um recipiente, homogeneizadas e então transferidas para sacos estéreis com capacidade de 300 g formando uma amostra; transportadas em caixa de isopor para o Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram mantidas em câmara fria a 4°C.

As coletas do solo foram realizadas em dezembro de 2008 (período chuvoso) e em setembro de 2009 (período seco). A caracterização período seco e chuvoso levou em conta a média de precipitação dos quatro meses anteriores à coleta (Figura 4).

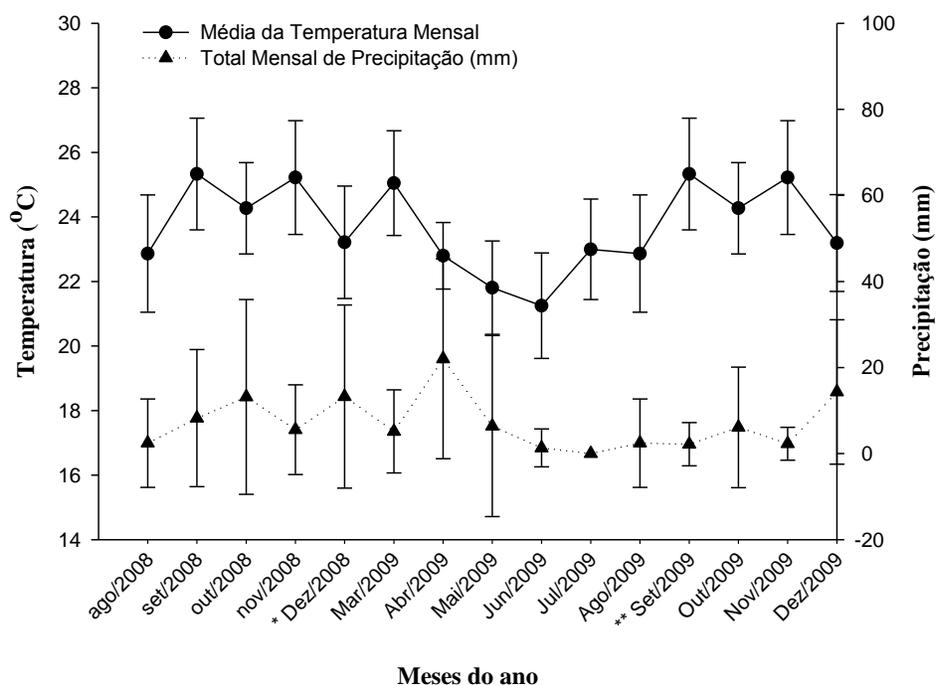


Figura 4 Média mensal de temperaturas e total mensal de precipitação, registrados pela estação hidrometeorológica da Kinross-Rio Paracatu Mineração (RPM), no período de dezembro de 2008 a dezembro de 2009. (T): Desvio padrão; \*: 1<sup>o</sup> época de amostragem (Dezembro/2008); \*\*: 2<sup>o</sup> época de amostragem (Setembro/2009)

A avaliação da densidade de esporos de FMAs foi mediante a extração de esporos através do peneiramento úmido, conforme Gerdemann & Nicolson (1963), seguido de centrifugação com água e solução de sacarose (500 g L<sup>-1</sup>).

Após a extração, os esporos foram transferidos para placas de petri, observados e contados em microscópio estereoscópio com aumento entre 20x a 40x. Em seguida, os esporos extraídos foram separados por tipos em vidros de relógio e montados em lâminas permanentes para observação em microscópio. Cada lâmina possuiu duas lamínulas, uma com polivinil álcool-lactoglicerol (PVLG), na qual se manteve o esporo inteiro e outra com PVLG + reagente de Melzer (1:1, v/v), na qual se rompeu o esporo mediante uma leve pressão sobre a lamínula. Os fungos foram identificados em relação ao gênero e, ou, espécie com base nos critérios morfológicos. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Sidney Luis Stürmer do Departamento de Ciências Naturais na Universidade Regional de Blumenau (FURB). Foram capturadas imagens utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX-60 acoplado a uma câmera digital Canon Poxer Shot A620, através do qual também foram determinadas as dimensões dos esporos dos FMAs, no Departamento de Genética e Cultura de Tecidos na Universidade Federal de Lavras (vide Anexos). Foram também calculados os índices de diversidade de Simpson (L) e de diversidade de Shannon (H). A riqueza de espécies (RQ) e a frequência de ocorrência (% de ocorrência sobre o total de amostras) das espécies nas amostras de campo.

Em setembro/2009, além da coleta de solo e determinação da densidade e identificação de FMAs, conforme descrito anteriormente, avaliou-se também a percentagem de colonização das raízes de espécies vegetais com crescimento espontâneo e espécies introduzidas por semeadura, fomentada pela empresa, na tentativa de realizar a fitoestabilização da área. O método utilizado para a determinação da taxa de colonização radicular foi o método da interseção em placa quadriculada em microscópio estereoscópio (GIOVANETTI & MOSSE, 1980). Para isso, coletaram-se amostras da rizosfera e raízes nas áreas contaminadas com As, sendo estas empregadas também no ensaio sobre ocorrência de FMAs. Considerou-se solo rizosférico aquele solo remanescente

aderido às raízes. Após a agitação dentro de sacos plásticos, para a máxima recuperação do solo rizosférico, procedeu-se a extração de esporos, identificação das espécies de FMAs que esporulavam no momento da amostragem e contagem do número total de esporos das populações de FMAs (GERDEMANN & NICOLSON, 1963). As raízes foram coletadas do solo, lavadas em água de torneira e conservadas em solução de FAA (formalina-álcool-ácido acético) até que se procedesse à coloração destas. Antes da coloração, as raízes foram novamente lavadas para retirar a solução de FAA, separando-se 1 g de raízes finas e acondicionando-as em cápsulas plásticas, as quais foram mergulhadas em solução de KOH 10%, aquecidas a 60°C por 15 minutos, para a clarificação; lavadas em água corrente; acidificadas com HCl 1% por 3 minutos, e aquecidas por 20 minutos em solução de glicerol ácido e azul de tripano 0,05% (PHILLIPS & HAYMANN, 1970).

### **2.3 Estabelecimento de culturas armadilhas**

Parte das amostras de solo (aproximadamente 500 dm<sup>3</sup>) e raízes foram utilizadas para o estabelecimento de vasos de cultivo armadilha com *Brachiaria decumbens*, visando recuperar o máximo de FMAs, especialmente aqueles sem esporulação no momento da coleta. Para a multiplicação, empregou-se uma mistura, denominada aqui de substrato, preparada a partir de um Latossolo Vermelho distrófico coletado em área sob fragmento de mata nativa subcaducifólia, no campus da UFLA, na camada superficial (0-20 cm). O solo foi seco ao ar e peneirado em malha de 2mm, em seguida misturado com areia lavada na proporção 2:1 (v/v). Devido à baixa saturação por bases, foi feita uma calagem para elevar o valor V até 60%, mediante aplicação de calcário dolomítico. Após a calagem, foi aplicado em cada vaso 50 mg kg<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O substrato foi autoclavado para eliminar propágulos ativos de FMAs nativos.

Amostras de solo após aplicação de calcário, nutrientes e autoclavagem, foram submetidas a análise química e apresentaram as seguintes características: pH (em água 2:1), 5,7; Ca, 3,4  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Mg, 1,0  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; P, 7,8  $\text{mg dm}^{-3}$ ;  $\text{P}_{\text{rem}}$ , 10,9  $\text{mg L}^{-1}$ ; K, 12  $\text{mg dm}^{-3}$ ; V, 44,2% e MO, 4,8  $\text{dag kg}^{-1}$ .

As sementes de *Brachiaria decumbens* foram tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por 15 min, em seguida lavadas em água corrente por 2 horas, para eliminar microrganismos contaminantes e facilitar a germinação. Aproximadamente 50 sementes foram semeadas no substrato com solo inóculo.

Após o preparo do substrato e sementes de *Brachiaria decumbens*, este foi distribuído em vasos de 500 mL e, em seguida, irrigaram-se os vasos com água deionizada até que estes atingissem sua capacidade de campo. Os vasos permaneceram em torno de 4 a 12 meses na casa de vegetação, sendo irrigados diariamente e intercalados com períodos de estresse hídrico induzido. A partir do quarto mês iniciou-se a avaliação da densidade de esporos e identificação das espécies de FMAs.

#### 2.4 Análise estatística

Avaliaram-se, nas amostras de campo, a densidade – total e por tipo de esporo de FMAs e a colonização radicular. Nos vasos de cultura armadilha, avaliaram-se a densidade – total e por tipo de esporos e ocorrência de FMAs.

Para análise estatística, empregou-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). Os valores de densidade de esporos e riqueza de espécies foram transformados em  $\log(x+1)$  e a taxa de colonização radicular em arco seno  $(x/100)^{1/2}$  de forma a obter uma distribuição normal dos dados. Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de média (Scott-Knott a 5%). Foram realizadas ainda análises de correlação de Pearson entre a densidade total de

esporos, a colonização micorrízica, a diversidade de espécies e as concentrações de As (Mehlich e USEPA).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Ocorrência de FMAs nas amostras de campo**

As concentrações de As recuperadas pelos diferentes métodos de quantificação (Mehlich e USEPA) variaram conforme as áreas selecionadas (Tabela 2). Os teores totais médios de As no B1, Estéril e Rejeito foram elevados quando comparadas aos valores de intervenção industrial para As em solos ( $150 \text{ mg dm}^{-3}$ ) sugeridos pela CETESB (2005). No entanto, os teores médios de As com extrator Mehlich no B1, Estéril e Rejeito, foram 13, 19 e 29  $\text{mg dm}^{-3}$ , respectivamente. Wenzel et al. (2002), considerando como concentração normal de As em solo variando de 1 a 20  $\text{mg kg}^{-1}$ . Vale salientar que o método USEPA 3051A não extrai o As ocluso em silicatos. Segundo Campos et al. (2003), o método dissolve preferencialmente as frações finas e não possui a habilidade de dissolver silicatos.

A densidade de esporos, a riqueza de espécies e os índices de diversidade calculados, apresentaram variação em função do local de amostragem (Tabela 2). A maior densidade de esporos ocorreu na RPPN. Na amostragem em dezembro de 2008, não foram encontrados esporos de FMAs nas áreas de Estéril e Rejeito (Tabela 2).

Tabela 2 Densidade de esporos (DE), índices de diversidade e concentrações de As no solo em diferentes locais na área contaminada em dezembro de 2008 (amostras de campo)

Áreas de amostragem	DE n°/50 g de solo	Índices de diversidade <sup>(1)</sup>			As <sup>(3)</sup>		Espécies encontradas
		RQ	L	H	Mehlich	USEPA	
		adimensional			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
<b>RPPN</b>	167 a	3,0 a	0,48	0,36	0,1 c	10,2 d	<i>Glomus clarum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>Paraglomus occultum</i> , <i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>A. mellea</i> , <i>Scutellospora heterogama</i> , <i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Paraglomus occultum</i>
<b>B1</b>	27 b	1,2 b	0,82	0,10	13,2 b	396,0 c	
<b>Estéril</b>	0 c	- <sup>(2)</sup>	-	-	19,1 b	573,4 b	-
<b>Rejeito</b>	0 c	-	-	-	28,8 a	1046,4 a	-

<sup>(1)</sup>RQ= riqueza de espécies; L= dominância de Simpson; H= heterogeneidade e Shanon-Wiener. <sup>(2)</sup>-.: ausência de espécies de FMAs.

<sup>(3)</sup>As USEPA = Teor total de arsênio no solo e As Mehlich = Teor biodisponível de arsênio no solo. Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott, P<0,05.

Tabela 3 Densidade de esporos (DE), índices de diversidade e concentrações de As no solo em diferentes locais na área contaminada em setembro de 2009 (amostras de campo).

Área de amostragem	DE n°/50 g de solo	Índices de diversidade <sup>(1)</sup>			As <sup>(3)</sup>		Espécies encontradas
		RQ	L	H	Mehlich	USEPA	
		adimensional			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
<b>RPPN</b>	535 a	4,0 a	0,4	0,42	0,1 c	10,2 d	<i>Glomus clarum</i> , <i>G. minutum</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>Paraglomus occultum</i> , <i>Acaulospora mellea</i> , <i>A. spinosa</i> , <i>A. paulinae</i> , <i>A. scrobiculata</i> , <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Scutellospora fulgida</i> , <i>S.biornata</i> , <i>S. pellucida</i> , <i>Racocetra castanea</i> , <i>R. persicae</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>Paraglomus occultum</i> , <i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>A. excavata</i> , <i>Scutesllospora heterogama</i> , <i>Scutellospora sp#1</i> , <i>S. pellucida</i> ,
<b>B1</b>	287 b	3,8 a	0,6	0,36	13,2 b	396,0 c	

Continua...

Tabela 3 Continuação

Área de amostragem	DE n°/50 g de solo	Índices de diversidade <sup>(1)</sup>			As <sup>(3)</sup>		Espécies encontradas
		RQ	L	H	Mehlich	USEPA	
		adimensional			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
<b>Estéril</b>	237 b	1,0 b	0,5	0,10	19,1 b	573,4 b	<i>Glomus clarum</i> , <i>Paraglomus occultum</i> , <i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Acaulospora sp#1</i> , <i>Acaulospora sp#2</i> , <i>A. tuberculata</i> , <i>A. colombiana</i> , , <i>Scutellospora sp#1</i>
<b>Rejeito</b>	0 c	- <sup>(2)</sup>	-	-	28,8 a	1046,4 a	-

<sup>(1)</sup>RQ= riqueza de espécies; L= dominância de Simpson; H= heterogeneidade e Shanon-Wiener. <sup>(2)</sup>-: ausência de espécies de FMAs.

<sup>(3)</sup>As USEPA = Teor total de arsênio no solo e As Mehlich = Teor biodisponível de arsênio no solo. Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott, P<0,05.

Na amostragem realizada em setembro de 2009, observou-se um aumento na densidade de esporos de FMAs nos locais estudados (Tabela 3). A maior densidade de esporos foi observada novamente na área de referência (RPPN), no entanto, ocorreu um aumento significativo nas áreas com elevadas concentrações de As (B1 e Estéril). Isso se deve ao fato de nessa época de coleta haver maior quantidade e diversidade de espécies vegetais encontradas nas áreas, o que favoreceu o aumento da esporulação e diversidade micorrízica (Figura 5). Isso demonstra a enorme heterogeneidade das áreas estudadas nas suas condições de campo, o que ocorre principalmente devido à movimentação e ao revolvimento constantes (i.e., B1, Estéril e Rejeito).

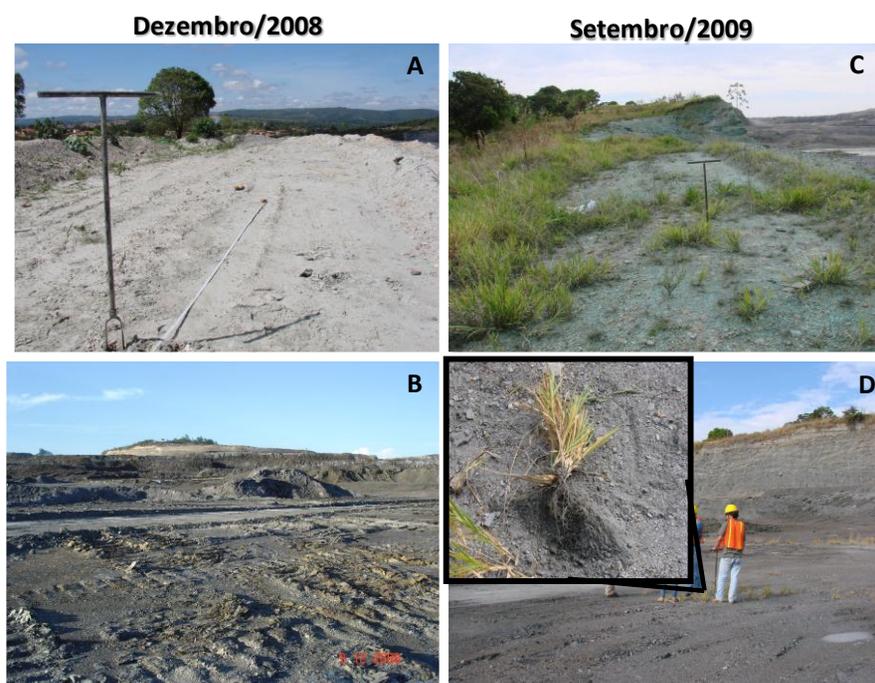


Figura 5 Vista das áreas de estudo e diferenças nas épocas de amostragem em áreas de mineração de ouro em Paracatu-MG. A = Área B1 em dezembro de 2008; B = Área Estéril em dezembro de 2008; C = Área B1 em setembro de 2009; D = Área Estéril em setembro de 2009.

Foi encontrado um total de 23 espécies de FMAs, sendo 10 pertencentes ao gênero *Acaulospora*, cinco de *Scutellospora*, dois de *Racocetra*, quatro de *Glomus*, uma de *Gigaspora* e uma de *Paraglomus* (Figura 6). De maneira geral, nas amostras de campo, as espécies de maior frequência foram *Paraglomus occultum*, *Acaulospora morrowiae* e *Glomus clarum*, sendo que estas espécies de FMAs ocorrem em todas as áreas estudadas. Estes fungos são caracterizados por apresentar pequeno tamanho, ou seja, sua disseminação é mais facilitada, o que pode justificar sua ocorrência generalizada nas áreas analisadas. Nota-se ainda, que na área de referência (RPPN) as espécies de *Acaulospora morrowiae*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus intraradices* não ocorreram somente em setembro de 2009 (Figura 6<sup>a</sup>).

A *Acaulospora excavata* teve sua ocorrência constatada somente em setembro de 2009, na área de B1 não sendo essa espécie comum a área de referência (RPPN) (Figura 6B). A *Scutellospora* sp#1 foi a espécie de FMAs que ocorreu somente nas áreas com concentrações de As, ou seja, em B1 e Estéril, não tendo sido observada sua presença na área de referência, e apenas ocorreu em setembro de 2009 (Figura 6B e C). *Acaulospora colombiana*, *Acaulospora* sp#1, *Acaulospora* sp#2, *A. tuberculata*, foram restrita ao local com maior concentração de As (Figura 6C).

*Glomus minutum*, *Glomus fasciculatum*, *Acaulospora mellea*, *A. spinosa*, *A. paulinae*, *A. scrobiculata*, *Scutellospora fulgida*, *S. pellucida*, *S. biomata*, *Racocetra castanea*, *R. persicae*, *G. margarita* foram encontradas somente na área de RPPN (Figura 6A). Tais observações sugerem que a presença de cada espécie na população de FMAs nativos é resultado de suas interações com o solo, clima, planta hospedeira, outros FMAs e a biota do solo em geral (COLOZZI-FILHO & BALOTA, 1994).

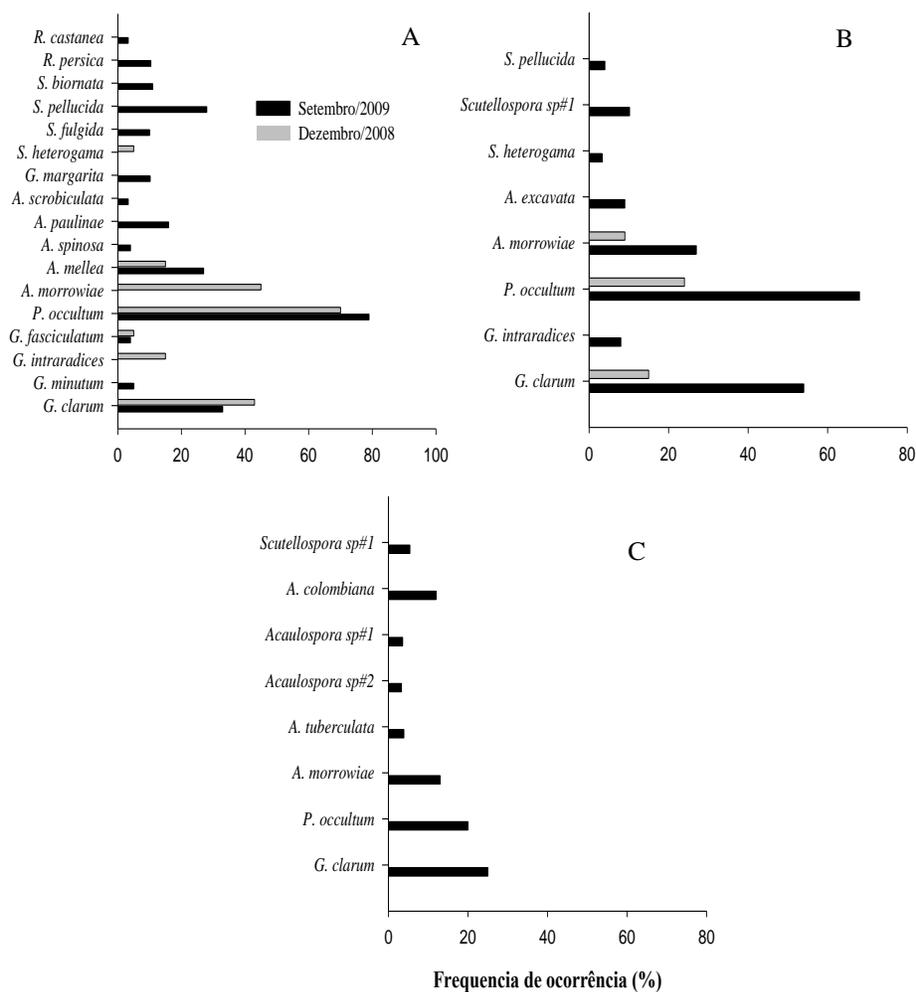


Figura 6 Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nas amostras de solo e suas freqüência de ocorrência no conjunto dos locais de amostragem. A) Espécies e freqüência de ocorrência de FMAs na área de referência (RPPN), B) Espécies e freqüência de ocorrência de FMAs na área de B1, C) Espécies e freqüência de ocorrência de FMAs na área de Estéril.

As correlações entre parâmetros de ocorrência e de diversidade de FMAs e as concentrações de As são apresentadas na tabela 4. A densidade de

esporos e a riqueza de espécies mostraram correlações negativas com As Mehlich e USEPA (Tabela 4).

Os fatores que controlam a colonização a campo atuam de modo muito complexo sendo difícil relacionar características químicas do solo com variações na colonização (KLAUBERG FILHO et al., 2002; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O grau de colonização das plantas pelos FMAs em ambientes degradados depende da densidade de propágulos e da composição das espécies de FMAs no solo, tornando-se isto de grande importância em áreas degradadas (KLAUBERG FILHO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2007). Sabe-se que estes fungos diferem no modo e na extensão da colonização radicular e na sua capacidade de formar propágulos (CHRISTIE et al., 2004). Como discutido por Siqueira et al., 2007, a dinâmica de formação da micorriza por um fungo difere devido a diferenças de crescimento da hifa dos esporos, nas taxas de colonização intrínsecas e na capacidade do fungo usar carbono das raízes do hospedeiro. Assim, mudanças na dinâmica do número de esporos e outras fontes de propágulos refletirão na dinâmica da colonização (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Por outro lado, a natureza das relações entre a colonização e formação de propágulos em solos contaminados por As é ainda pouco conhecida. As altas concentrações de As pode exercer um efeito seletivo sobre as populações, favorecendo a dominância de certas espécies mais adaptadas, o que teria impacto sobre a vegetação, considerando que estes fungos podem amenizar os efeitos fitotóxicos de As (RASKIN & ENSLEY, 2000; AGELY, et al., 2005; XIA et al., 2007; XU et al., 2008).

Tabela 4 Matriz de correlação de Pearson entre colonização micorrízica (CM), densidade de esporos (DE), riqueza das espécies (RQ) e os índices de dominância de Simpson (L) e de diversidade de Shannon-Wiener (H) e as concentrações de As no solo.

	CM	DE	RQ
RQ	-	-	-
DE	-	-	0,78**
CM	-	0,28	0,20
As Mehlich	-0,28	-0,77**	-0,58**
As USEPA	-0,55*	-0,56**	-0,35*

RQ= riqueza de espécies. As USEPA = Teor total de arsênio no solo e As Mehlich = Teor biodisponível de arsênio no solo. \* e \*\* representam os coeficientes de correlação de Pearson significativos a 5% e 1%.

Baixa correlação entre a densidade de esporos no solo e a colonização são comumente observadas a campo (BRUNDRETT, 1996), fato normalmente relacionado à idéia de que o número de esporos reflete muito pouco o potencial de colonização micorrízica do solo, já que o micélio externo e as raízes colonizadas são importantes fontes de propágulos dos FMAs (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Entretanto, no caso de áreas severamente degradadas, como neste estudo, os esporos devem ser fonte mais importante de propágulos, haja vista sua maior resistência a estresses severos (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

### 3.2 Ocorrência de FMAs em plantas hospedeiras

Avaliando-se a taxa de colonização micorrízica em espécies vegetais com crescimento espontâneo e espécies introduzidas por semeadura, coletadas no campo em setembro de 2009, observou-se uma elevada taxa de colonização para as diferentes espécies vegetais analisadas. Em amostras de solo rizosférico obtidas das plantas coletadas no campo, a densidade de esporos, a riqueza de espécies e os índices de diversidades calculados, apresentaram variação em

função do local amostrado e espécie vegetal avaliada. A maior densidade de esporos ocorreu na área de Estéril na rizosfera de *Brachiaria sp.*, seguida da *Turmeraceae*, na mesma área. Em B1, alta densidade de esporos foi observada no solo rizosférico de *Brachiaria sp.* (Tabela 5).

Tabela 5 Colonização micorrízica (CM), densidade de esporos (DE), índices de diversidade em plantas coletadas em diferentes locais na área contaminada em setembro de 2009 (amostras de solo rizosférico)

Identificação		CM	DE	Índices de diversidade**		
Área	Planta	(%)	n°/50 g de solo	RQ	L	H
				-----Adimensional-----		
Estéril	<i>Brachiaria sp</i>	40,31	140	3,1	0,6	0,2
Estéril	<i>Brachiaria sp</i>	48,68	279	4,0	0,4	0,7
Estéril	<i>Turmeraceae</i>	46,55	210	1,8	0,4	1,2
B1	<i>Pteridaceae</i>	35,21	97	2,6	0,2	0,8
B1	<i>Brachiaria sp</i>	39,00	198	3,2	0,4	1,1
B1	<i>Crotalaria</i>	29,16	189	3,8	0,4	0,6

\*RQ= riqueza de espécies; L= dominância de Simpson; H= heterogeneidade e Shanon-Wiener. Médias seguidas por diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott, P<0,05.

*Glomus clarum*, *Acaulospora mellea*, *Paraglomus occultum* e *Acaulospora morrowiae* dominaram as populações de esporos na rizosfera das plantas no campo, apresentando densidades relativas de 40, 32, 16 e 11%, respectivamente, enquanto as demais espécies somaram apenas 3,2% do total de esporos recuperados (Figura 7).

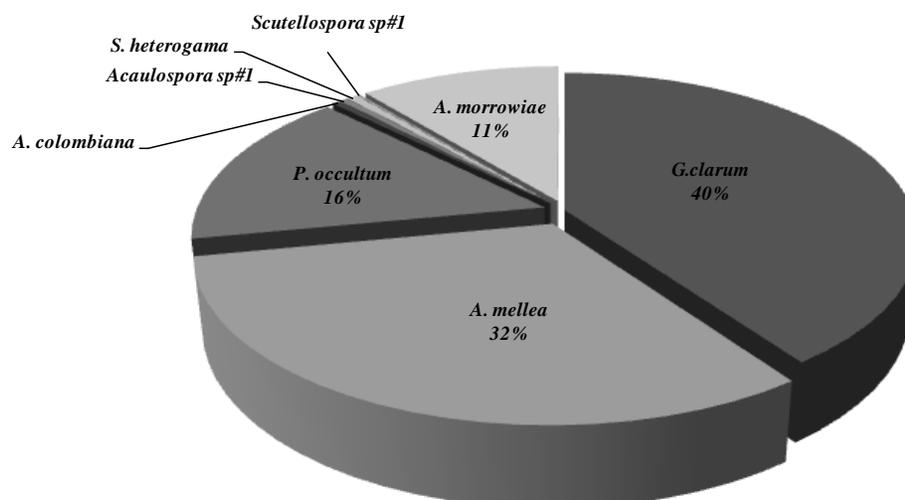


Figura 7 Densidade relativa de esporos (% total recuperado) das populações de FMAs recuperadas nas amostras de solo rizosférico nas áreas contaminadas com As.

A dominância destas espécies na área contaminada indica sua elevada adaptação ao excesso de As. *Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum* e *Paraglomus occultum* foram as únicas espécies recuperadas de amostra de campo em todos os locais avaliados, enquanto *A. Mellea* ocorreu apenas em RPPN.

Klauberg-Filho et al. (2002) verificaram que, em solos contaminados com Zn, Cd, Cu e Pb, a densidade de esporos, a riqueza de espécies e o aumento da dominância relacionaram-se inversamente com a concentração de elementos-traço no solo. Eles encontraram que *Acaulospora mellea* e *Glomus clarum* foram as espécies dominantes na rizosfera de gramíneas estabelecidas nas áreas.

### 3.3 Ocorrência de FMAs em vasos armadilhas

Foram detectadas em vasos de cultura armadilha 18 espécies. Nota-se que a contaminação do solo reduziu o número de espécies de FMAs, apesar disso, há um aumento no número de espécies de FMAs na presença da planta (Tabela 6)

A *Gigaspora margarita* que foi encontrada nas amostras de campo somente na RPPN, na cultura armadilha ocorreu no tratamento que recebeu solo inóculo de B1, sugerindo ausência de esporulação naquela condição que, no entanto, foi favorecida pelas condições nos vasos de cultura armadilha. Outras espécies identificadas nas amostras de campo, não ocorreram nos solos de cultura armadilha, tais como: *Acaulospora sp#1*, *Acaulospora sp#2*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora tuberculata* e *Glomus intraradices*. Esporos de *Glomus intraradices* não foram encontrados no solo de cultura armadilha, provavelmente porque são encontrados com maior frequência no interior das raízes (KURLE & PFLEGER, 1996).

Tabela 6 Ocorrência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) nos locais de amostragem.

Espécies de FMAs	RPPN		B1		Estéril		Geral*	
	C	V	C	V	C	V	C	V
<i>Glomeraceae</i> (PIROZ & DALPÉ)								
<i>Glomus clarum</i>	+	-	+	+	+	+	16	13
<i>Glomus intraradices</i>	+	-	+	-	-	-	3	0
<i>Glomus minutum</i>	+	+	-	-	-	-	3	3
<i>Glomus fasciculatum</i>	+	-	-	-	-	+	1	3
<i>Paraglomeraceae</i> (MORTON, J.B. & REDECKER, D.)								
<i>Paraglomus occultum</i>	+	+	+	+	+	+	20	17
<i>Acaulosporaceae</i> (MORTON, J.B. & BENNY)								
<i>Acaulospora mellea</i>	+	-	+	+	-	+	9	7
<i>Acaulospora morrowiae</i>	+	+	+	+	+	+	20	9
<i>Acaulospora sp#1</i>	-	-	+	-	+	-	3	0
<i>Acaulospora sp#2</i>	-	-	-	-	+	-	1	0
<i>Acaulospora spinosa</i>	+	+	-	-	-	-	4	3
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	+	-	-	-	-	-	2	0
<i>Acaulospora tuberculata</i>	+	-	-	-	-	-	2	0
<i>Acaulospora paulinae</i>	+	+	-	+	-	+	3	5
<i>Acaulospora excavata</i>	+	+	-	-	-	+	4	3
<i>Acaulospora colombiana</i>	-	+	+	-	-	+	4	3
<i>Gigasporaceae</i> (MORTON, J.B. & BENNY)								
<i>Gigaspora margarita</i>	+	+	-	+	-	-	1	1
<i>Scutellospora pellucida</i>	-	+	-	-	+	+	5	1
<i>Scutellospora fulgida</i>	+	+	-	-	-	-	2	1
<i>Scutellospora heterogama</i>	-	-	-	+	+	-	1	1
<i>Scutellospora biornata</i>	+	+	-	-	-	-	6	1
<i>Scutellospora sp#1</i>	-	-	+	+	+	-	3	7
<i>Racocetra castanea</i>	+	+	-	+	-	+	5	19
<i>Racocetra persicae</i>	+	+	-	-	-	+	14	13
<b>Nº de espécies</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>16</b>

C= presença nas amostras de campo; V = presença nas amostras dos vasos armadilhas

\* número de amostras onde a espécie fúngica foi observada (n=24).

O levantamento da ocorrência das espécies nos diversos locais de amostragem indicou existir um efeito seletivo sobre os FMAs, que variou com o grau de contaminação de As. Isto explica a maior ocorrência de *Acaulospora*

*morrowiae*, *Glomus clarum* e *Paraglomus occultum*. A dominância destas espécies indica sua elevada tolerância ao excesso de As.

*Acaulospora excavata*, *Acaulospora sp#1*, *Acaulospora sp#2*, *A. tubercullata*, *A. colombiana* e *Scutellospora sp#1*, apesar da sua baixa ocorrência na área, foram encontradas em locais com alta contaminação, o que deve estar relacionado com a adaptação destas ao excesso de As. Ao contrário, *Glomus minutum*, *Glomus fasciculatum*, *Acaulospora mellea*, *A. spinosa*, *A. paulinae*, *A. scrobiculata*, *Scutellospora fulgida*, *S. pellucida*, *S. biornata*, *Racocetra castanea*, *R. persicae*, *G. margarita* foram encontradas somente na área de RPPN, ou seja, sem a contaminação com As, indicando que algumas espécies são mais sensíveis a contaminação. Estudos adicionais foram realizados utilizando algumas destas espécies para investigar a sua eficiência em promover o estabelecimento de plantas hospedeiras nestes solos, e serão abordados no capítulo 3 desta Tese.

Melloni et al. (2003), estudando a densidade e a diversidade de FMAs em áreas de mineração de bauxita, verificaram que mineração reduziu a ocorrência de FMAs. Por outro lado, o mesmo estudo mostrou que a introdução de plantas herbáceas (capim-gordura, capim-azevém, braquiária, feijão-guandu e bracinga) nos locais minerados, promoveu a rápida recuperação da infectividade do solo, conforme revelaram bioensaios realizados em amostras de solo em diferentes estádios sucessionais. Resultados semelhantes foram relatados por Caproni et al. (2003), também em áreas de mineração de bauxita, em Porto Trombetas-PA, onde ocorreu rápida recuperação, da densidade de esporos e do índice de diversidade dos FMAs ( $H'$ ), que recuperou em apenas dois anos de reabilitação.

É interessante notar que nem sempre as espécies mais adaptadas a estresses são as que fornecem maiores benefícios para as plantas (KLAUBERG-FILHO et al., 2005). A adaptação do fungo, portanto, não deve ser a única

característica quando se pretende obter isolados com potencial de utilização na fitoestabilização de áreas contaminadas com As, sendo importante, também, sua eficiência em amenizar os efeitos fitotóxicos sobre as plantas hospedeiras. Pesquisas adicionais são necessárias em ambientes tropicais contaminados com As para elucidação destes aspectos e outros relacionados à recuperação de ambientes degradados com As.

#### 4 CONCLUSÃO

Verificou-se a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (esporos e colonização) mesmo nas amostras de solo com elevada concentração de arsênio, sendo estas diferenciadas pelas épocas de amostragem.

Encontrou-se um total de 23 espécies sendo: 10 do gênero *Acaulospora*, cinco de *Scutellospora*, dois de *Racocetra*, quatro de *Glomus*, uma *Gigaspora* e uma *Paraglomus*. Isto sugere um grande e generalizado potencial de adaptação dos FMAs ao elevado teor de arsênio, sendo que *Acaulospora excavata*, *Acaulospora sp#1*, *Acaulospora sp#2*, *A. tubercullata*, *A. colombiana* e *Scutellospora sp#1* ocorreram em locais de maior teor de arsênio

*Glomus minutum*, *Glomus fasciculatum*, *Acaulospora mellea*, *A. spinosa*, *A. paulinae*, *A. scrobiculata*, *Scutellospora fulgida*, *S. pellucida*, *S. biornata*, *Racocetra castanea*, *R. persicae*, *G. margarita fulgida*, mostraram-se bastante sensíveis a contaminação com arsênio, sendo encontradas somente na área referência (RPPN).

*Glomus clarum*, *Acaulospora morrowiae*, *A. mellea* e *Paraglomus occultum* dominaram as populações de esporos na rizosfera das plantas no campo.

A contaminação com arsênio reduziu o número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares, apesar disso, há um aumento de espécies desses fungos na presença de plantas.

Houve uma relação inversa entre os teores de arsênio no solo e a colonização micorrízica, densidade de esporos e a riqueza de espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

## REFERÊNCIAS

AGELY, A.; SYLVIA, D.M.; MA, L.Q. Mycorrhizae increase arsenic uptake by the hyperaccumulator Chinese Brake Fern (*Pteris vittata* L.). **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 34, p. 2181–2186, Nov. 2005.

AMORIM, E.F. **Efeito do processo de deposição hidráulica no comportamento de um rejeito de mineração de ouro**. 2007, 109 p. Dissertação (Mestrado em Geotecnia), Universidade de Brasília. Brasília/DF, 2007.

BORBA, R.P.; FIGUEIREDO, B.R.; CAVALCANTI, J.A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola Minas**, v.57, n. 1, p.45-51, Jan./Mar. 2004.

BRUNDRETT, M. et al. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. **ACIAR Monograph**, 1996. 374p.

CAMPOS, M.L. et al. Baseline concentration of heavy metals in Brazilian Latosols. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.34, n. 34, p.547-557, 2003.

CAPRONI, A.L. et al. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1409-1418, Dez. 2003.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 209-217, Jan. 2004.

COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In:HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1994, p. 383-418.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de 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](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2010

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1999. 370 p.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. Programas e **Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. P.235.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, Apr. 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, Mar. 1980.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3. 91G. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413 p.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira em Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 125-134, Jan./Mar. 2002.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.85-144, Jul. 2005.

KURLE, J.E.; PFLEGER, F.L. Management influences on arbuscular mycorrhizal fungal species composition in a corn-soybean rotation. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 2, p. 155-161, Feb. 1996.

LADEIRA, A.C.Q.; CIMINELLI, V.S.T.; NEPOMUCENO, A.L. Seleção de solos para a imobilização de arsênio. **Revista da Escola Minas**, Ouro Preto, v.55, n.3, p. 215-221, July/Sep. 2002.

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, Apr. 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**, v.43, n. 4, p.519-524, Oct. 1992.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 267-276, Fev. 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 625 p.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p.158-161, Jan. 1970.

POUYU-ROJAS, E et al. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 3, p. 413-424, May/June 2006.

RAIJ, B. van et al. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. 170p.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. **Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environmental**. John Wiley & Sons. New York, 2000. 304p.

RAWLINS, B.G. et al. Preliminary investigation of mining-related arsenic contamination in the provinces of Mendoza and San Juan (Argentina) and Minas Gerais (Brazil). **British Geological Survey**, Technical Report WC/97/60. 1997. 27p.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86-92, Jan. 2002.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-306, Dez. 2007.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Eds). **Soil biodiversity an Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI-Publishing, p.206-236, 2006.

USEPA, UNITED STATES ENVIROMENMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3ed. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2008.

WENZEL, W.W. et al. Arsenic in field-collected soil solution and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 165, n. 2, p. 221-228, Apr. 2002.

XIA, YUN-SHENG et al. Arsenic uptake by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in an arsenic-contaminated soil with added phosphorus. **Journal Environmental Sciences**, v.19, n. 10, p.1245–1251, Nov. 2007.

XU, P. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v.156, n.1, p.215-220, Nov. 2008.

### CAPÍTULO 3

## COLONIZAÇÃO, ESPORULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E EFEITOS NO CRESCIMENTO DE *Leucaena leucocephala* EM SOLO CONTAMINADO COM ARSÊNIO

### RESUMO

Tem sido preconizado que os FMAs podem reduzir a fitotoxidez de As por aumentar a aquisição de P pelas plantas micorrizadas. Para avaliar a influência da contaminação do solo com As na colonização, esporulação, além dos efeitos no crescimento em plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com FMAs, foi realizado um experimento em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da UFLA, utilizando-se três isolados de FMAs de solos não contaminados e três isolados provenientes de áreas contaminadas com As em Paracatu-MG. Como substrato, utilizou-se um Neossolo Quartzarênico (RQ), o qual foi contaminado com  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas doses de 35, 75 e 150 mg de As  $\text{dm}^{-3}$  de solo. Ocorreram sintomas de fitotoxidez após a emergência das plantas submetidas a 150 mg  $\text{dm}^{-3}$  de As, as quais morreram logo em seguida. Após 147 dias, as raízes e a parte aérea das plantas foram coletadas, nos tratamentos de 0, 35, 75 mg  $\text{dm}^{-3}$  de As, sendo obtidas a matéria seca e a concentração de As da parte aérea e da raiz, além do conteúdo desse elemento na parte aérea, com vistas a avaliar a remoção do metalóide pelas plantas. Nos tratamentos com adição de As, sintomas de fitotoxidez foram observados durante o crescimento das plantas, principalmente nos tratamentos sem inoculação de FMAs. A contaminação do solo com As afetou negativamente a esporulação e a colonização de modo diferenciado para os diversos isolados testados. A inoculação com *Glomus clarum* e a mistura de espécies (*Glomus clarum*, *Acaulospora morrowiae* e *Gigaspora albida*) favoreceu o crescimento de *L. leucocephala* em solo com alta concentração de As, e maior remoção de As do solo, mostrando potencial fitoextrator. Entretanto, a inoculação com *G. clarum* não foi relacionada com o aumento da absorção de P pela *L. leucocephala*, indicando a provável existência de outros mecanismos envolvidos na proteção das plantas micorrizadas ao excesso de As.

Palavras-chave: Fitorremediação. Associação simbiótica. Micorrizas

## ABSTRACT

It has been suggested that AMF may reduce the phytotoxicity of As by increasing the acquisition of P by mycorrhizal plants. To assess the influence of soil contamination with As in the colonization, sporulation, and the effects on growth and antioxidative system in plants of *Leucaena leucocephala* inoculated with mycorrhizal fungi, an experiment was conducted in a greenhouse at the Department of Soil Science at Federal University of Lavras UFLA using three isolates of AMF from an uncontaminated soil and 3 isolates from areas contaminated with arsenic. As substrate, we used a PSAMENT soil (RQ in the Brazilian classification), which was contaminated with  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at the doses of 35, 75, and 150 mg of As  $\text{dm}^{-3}$  of soil. Plants subjected to 150 mg  $\text{dm}^{-3}$  showed phytotoxicity symptoms shortly after emergency, which was followed by the death of the plant. After 147 days, the roots and shoots of plants were collected in treatments receiving 0, 35, and 75 mg As  $\text{dm}^{-3}$ , for measurement of dry weight and arsenic concentration of shoots and roots, as well as the content of this element in shoots, in order to assess the removal of As by plants. With addition of As, phytotoxicity symptoms were observed during plant growth, especially in the treatments without inoculation with AMF. Soil contamination with As affected negatively sporulation and colonization and the effects varied for different isolates. Inoculation with *Glomus clarum* and the mixture of species (*Glomus clarum*, *Acaulospora morrowiae* and *Gigaspora albida*) favored the growth of *L. leucocephala* in soils with high concentrations of As and higher As removal from the soil, showing a phytoextraction potential. However, inoculation with *G. clarum* was not related to increasing P uptake by *L. leucocephala*, indicating the possible existence of other mechanisms involved in the protection of mycorrhizal plants submitted to excess As.

Keywords: Phytoremediation. Symbiotic association. Mycorrhizae

## 1 INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metalóide amplamente distribuído na atmosfera e na crosta terrestre (HABUDA-STANIC et al., 2008), sendo considerado como a substância mais perigosa à saúde humana pela ATSDR (2007). Em solos não contaminados, a concentração de As pode variar entre 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> (WENZEL et al., 2002). Concentrações mais elevadas podem indicar uso excessivo de compostos agrofloretais como pesticidas, fertilizantes, inseticidas, desfolhantes e preservativos da madeira (GONZAGA et al., 2008; LEE et al., 2008).

A atividade de mineração é um dos principais meios pelos quais os metais e metalóides entram no ambiente. Essa atividade, em áreas que contêm minerais sulfetados, como arsenopirita (FeSAs), tem contribuído para a dispersão de As, causando perda da vegetação e contaminação de mananciais hídricos e solos agrícolas, colocando em risco toda a biota localizada ao redor das mineradoras (SILVA et al., 2004).

Os efeitos adversos ocasionados pela contaminação por As e o papel da associação micorrízica na absorção de elementos-traço pelas plantas tem sido estudadas para a melhoria da eficiência na fitorremediação (KHAN, 2005; GÖHRE & PASZKOWASKI, 2006). No entanto, resultados diferentes foram relatados sobre os efeitos dos FMAs sobre a absorção de As pelas plantas. Alguns trabalhos demonstram que a associação de FMAs não teve efeito (CITTERIO et al., 2005; VOGEL-MIKUS et al., 2006), enquanto outros autores relatam que FMAs atuam na fitoproteção das plantas hospedeiras, promovendo maior produção de biomassa vegetal e melhor balanço nutricional (SHETTTY et al., 1995; LI & CHRISTIE, 2001; WHITFIELD et al., 2003; ARRIAGADA et al., 2007).

A contaminação com As é uma preocupação global. Por este motivo, estudos que evidenciam a possível aplicação dos FMAs em práticas de

fitorremediação são importantes, principalmente pelo fato de existir poucas informações disponíveis sobre o potencial dos FMAs em aumentar a tolerância das plantas ao As e os mecanismos envolvidos nesse processo de desintoxicação de ambientes contaminados com As.

É de conhecimento comum que FMAs aumentam o acesso aos nutrientes, principalmente P para a planta hospedeira em solos de baixa fertilidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O arsenato é dominante sob condições aeróbicas, sendo este análogo ao fosfato (MEHARG, 2002; ADRIANO, 2001). Devido a essa similaridade, a absorção de As e P pelas plantas e pelos FMAs pode ocorrer através dos mesmos transportadores (MEHARG & MACNAIR, 1992; ROSEN, 2002), o que possibilita o fosfato inibir efetivamente a absorção de arsenato (XIA et al., 2007; XU et al., 2008). Contudo, os efeitos dos FMAs sobre a fitorremediação em termos de fitoproteção nas plantas, diferem entre os isolados de FMAs, espécies de plantas hospedeiras e os fatores que interferem na disponibilidade de As no solo (MALCOVA et al., 2003;. ORLOWSKA et al., 2005; CHEN et al., 2007).

Diversos estudos sobre a tolerância de plantas têm demonstrado que as dicotiledôneas são mais sensíveis ao As, entretanto a *Calluna vulgaris* e *Silene vulgaris* foram consideradas tolerantes, pois nestas ocorre acúmulo de As nos vacúolos das células radiculares restringindo a translocação de As para a parte aérea (PALIOURIS & HUTCHINSON, 1991; SHARPLES et al., , 2000). As monocotiledôneas são na maioria tolerantes ao As, um exemplo é a *Holcus lanatus* (MEHARG & MACNAIR, 1992; SRISATIT et al., 2003), ao passo que algumas espécies de samambaias são conhecidas como hiperacumuladoras de As (MA et al., 2001; VISOOTTIVISETH et al., 2002;. ZHAO et al., 2002; MEHARG, 2003).

Espécies vegetais fixadoras de nitrogênio, como a leguminosa *Leucaena leucocephala*, têm sido indicada para utilização em programas de

revegetação de áreas degradadas, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de tolerância destas espécies quando expostas ao As (ZHANG et al., 2004; LINS et al., 2006). Em parte, esta indicação se deve à capacidade destas espécies sobreviverem em ambientes degradados, com reduzida quantidade de matéria orgânica e de diversos nutrientes, principalmente de nitrogênio (WONG, 2003).

Diante da hipótese de que a contaminação do solo interfere na comunidade e na atividade dos FMAs em solos contaminados por As e que estes efeitos são relacionados à tolerância diferenciada de isolados, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do As sobre estes fungos, especificamente na colonização radicular e densidade de esporos, assim como o efeito destes fungos no crescimento da planta, visando dar subsídios para o emprego destes fungos em programas de revegetação com solos contaminados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e preparo das amostras**

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, no período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010. Como substrato, foi utilizado um Neossolo Quartzarênico (RQ), coletado no município de Itutinga-MG. Esse solo foi proveniente de uma área reconhecidamente não sujeita à contaminação intencional com As (as únicas fontes possíveis são deposição atmosférica e adição de insumos que, porventura, contenham As). A escolha deste solo ocorreu em função do mesmo representar uma situação de pior cenário de exposição, ou seja, maior disponibilidade de contaminantes que porventura venham a ocorrer no solo, dado o seu pequeno poder tampão. Resultado da caracterização física, química e mineralógica desse solo encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 Atributos químicos, físicos e mineralógicos do solo utilizado para o cultivo de *Leucena leucocephala*.

Solo	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	MO	P-rem
	H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>				cmolc dm <sup>-3</sup>					----	----	dag kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>
RQ	5,3	2,4	13	0,1	0,1	0,8	2,7	0,2	1,0	3,0	7,6	78	0,1	35,2
Solo	Arg	Ar	Sil	Ct	Gb	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>						
	-----g kg <sup>-1</sup> -----													
RQ	60	920	20	681	156	30,6	35,8	11						

Atributos químicos: pH – pH em água (relação 1:2,5) e CTC (capacidade de troca de cátions) – método de saturação (EMBRAPA, 1999); MO (matéria orgânica) = %C x 1,723 (RAIJ et al., 1978); Atributos físicos: Arg (argila), Ar (Areia) e Sil (Silte) – método da pipeta (DAY, 1965); Atributos mineralógicos: Ct (caulinita), Gb (gibbsita) – Análise Termo-Diferencial (ATD); SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – ataque sulfúrico (EMBRAPA, 1999).

O solo seco ao ar, destorroado e homogeneizado foi passado em peneiras de 4 mm de abertura de malha. A acidez foi corrigida para pH na faixa de 6,0-6,5, utilizando-se calcário dolomítico, em quantidades previamente definidas em ensaio de incubação. Para simular a contaminação com As, foram acrescentadas, em sacos plásticos contendo 1,5 dm<sup>3</sup> de solo, soluções preparadas com Na<sub>2</sub>HasO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, de modo a elevar a dose de As no solo para 35, 75 e 150 mg dm<sup>-3</sup>. Amostra do solo não contaminado foi considerada testemunha. As doses foram escolhidas levando-se em consideração os valores orientadores de intervenção da CETESB (2005) para exposição agrícola (35 mg dm<sup>-3</sup>) e industrial (150 mg dm<sup>-3</sup>), respectivamente. Tendo em vista que uma elevada contaminação poderia impossibilitar o crescimento de *Leucaena leucocephala* e dos FMAs, optou-se ainda por um valor intermediário de 75 mg dm<sup>-3</sup> de As. Após a adição das soluções, a amostra de solo permaneceu incubada durante 30 dias, com umidade mantida em 60% da capacidade de campo.

## 2.2 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado em delineamento totalmente casualizado, em esquema fatorial 4 x 6, utilizando-se quatro doses de As e seis tratamentos com inoculação de FMAs, com três repetições, totalizando 72 parcelas. Como, ocorreram sintomas de fitotoxidez logo após emergências das plantas submetidas a  $150 \text{ mg dm}^{-3}$  de As no solo, seguida de morte, esses resultados não foram submetidos à análises estatísticas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de média (Scott-Knott a 5%) pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo os resultados de colonização micorrízica e esporulação transformados pelo arco seno  $(x/100)^{1/2}$  e  $\log(x + 1)$ , respectivamente.

## 2.3 Isolados de FMAs e planta hospedeira

O experimento constituiu-se de um tratamento controle sem FMAs e de cinco tratamentos de inoculação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os isolados empregados, de diferentes origens e mantidos na coleção de FMAs da UFLA, foram: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum*, *Gigaspora albida*, um inóculo misto proveniente da mistura desses três isolados (Mix de FMAs) e isolados de FMAs de solo contaminado com As, proveniente da área de mineração de ouro, em Paracatu-MG (Mix de Paracatu: *Glomus clarum*, *Paraglomus occultum* e *Acaulospora morrowiae* igualmente dividido pelo número de espécies de FMAs deste inóculo). A escolha dos isolados provenientes da coleção de FMAs da UFLA foi devido ao efeito fitoprotetor que estes fungos proporcionaram para outras espécies vegetais hospedeiras em solos multicontaminados por elementos-traço (SILVA et al. 2006; SOARES & SIQUEIRA, 2008). E a escolha dos isolados provenientes da

área de mineração em Paracatu-MG, foi devido esses isolados apresentarem maior frequência de ocorrência nas áreas estudadas relatadas no Capítulo 2.

As sementes de *L. leucocephala* foram tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, por 40 min, e seguidamente lavadas em água corrente, para eliminar microrganismos contaminantes e facilitar a germinação. As plântulas de *L. leucocephala* foram obtidas de sementes pré-germinadas em papel de filtro, em câmara de germinação e, após a emergência da radícula, foram transferidas para vasos de 1,5 dm<sup>3</sup> (três plântulas por vaso), onde receberam ou não suspensão de esporos de FMAs (aproximadamente 300 esporos por vaso) de cada tratamento de inoculação. A inoculação foi realizada diretamente na radícula. No inóculo misto (Mix de FMAs), o número total de esporos foi igualmente dividido pelo número de espécies de FMAs deste inóculo. O tratamento testemunha recebeu 50 mL de um filtrado de solo-inóculo sem propágulos de FMAs, para equilibrar a microbiota. A escolha da *L. leucocephala* ocorreu em função de ter sido observado o crescimento espontâneo dessa leguminosa na área de mineração de ouro em Paracatu/MG, além da capacidade desta espécie sobreviver em ambientes degradados, com reduzida quantidade de matéria orgânica e de diversos nutrientes, principalmente de nitrogênio.

#### **2.4 Condução do experimento em casa de vegetação**

Após o período de incubação, foram realizadas adubações com doses de nutrientes aplicados, em mg dm<sup>-3</sup>, da seguinte forma: 300 de nitrogênio, 25 de fósforo, 100 de potássio, 50 de enxofre, 0,5 de boro, 1,5 de cobre, 5 de ferro, 10 de manganês e 0,1 de molibdênio, e o pH foi corrigido na faixa de 6,0-6,5, utilizando-se calcário dolomítico. Com exceção do nitrogênio e do potássio, que foram parcelados em três aplicações, os outros nutrientes foram aplicados em única vez, utilizando as seguintes fontes: fosfato de amônio monobásico, nitrato

de potássio, nitrato de cálcio tetrahidratado, sulfato de magnésio, sulfato ferroso amoniacal, sulfato de amônio, nitrato de amônio, ácido bórico, cloreto de manganês, molibdato de sódio, sulfato de zinco e sulfato de cobre. O solo foi transferido para vasos com capacidade de  $1,5 \text{ dm}^{-3}$  no qual foi semeado leucena (*Leucaena leucocephala*), deixando-se, após o desbaste, duas planta por vaso, sendo estas cultivadas por 147 dias. Durante o experimento, os vasos foram mantidos com 60% da capacidade de retenção de água, mediante pesagem e irrigação diárias com água deionizada para complementação do volume perdida por evapotranspiração.

## **2.5 Coleta das plantas e determinação dos teores de arsênio**

Após 147 dias de cultivo, as raízes e a parte aérea das plantas foram coletadas. A parte aérea foi lavada e colocada para secar em estufa de circulação forçada, a  $60^{\circ}\text{C}$ , para ser utilizada na determinação da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA). A MSPA foi moída em moinho tipo Wiley para determinação de As e P. Para a determinação de As, efetuou-se a digestão pelo protocolo do método USEPA 3051A (USEPA, 2002), utilizando-se 0,5 g de material em 10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado em forno de microondas com tubos de Teflon® PTFE à pressão de 0,76 Mpa por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 Mpa é de aproximadamente  $175^{\circ}\text{C}$ . Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 20 mL com água destilada. Cada bateria de análise continha duas amostras de materiais de referência do NIST (SRM 1547 – Peach Leaves) com teor de As conhecido e uma amostra em branco para fins de controle de qualidade. Os extratos para quantificação dos teores do metalóide foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite, em equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800. O valor recuperado para concentração de As no material de referência foi de 70%.

No extrato obtido pelo método USEPA 3051A, P na MSPA foi determinado por fluorescência de raios-X.

De posse da matéria seca e da concentração de As na parte aérea e na raiz, foi estimado ainda, o fator translocação (FT) e a remoção desse elemento da seguinte maneira:

$$FT = \frac{\text{Acúmulo do elemento na parte aérea (PA)}}{\text{Acúmulo total (PA + Raiz)}}$$

A quantidade de As acumulada na parte aérea foi determinada pelo produto entre a produção de MS e a concentração deste elemento na planta.

**Remoção = PA x MS, onde:**

Onde:

PA= Concentração na parte aérea (g kg<sup>-1</sup>)

MS= Produção de matéria seca (g vaso<sup>-1</sup>)

## **2.6 Taxa de colonização radicular e densidade de esporos de FMAs**

Após 147 dias de exposição à contaminação com As, as raízes foram coletadas do solo, lavadas, e 1 g de raízes finas foi retirado e armazenado em FAA (formalina-álcool-ácido acético), para posterior clarificação e coloração com azul de tripano (PHILLIPS & HAYMANN, 1970) e quantificação da taxa de colonização micorrízica (GIOVANETTI & MOSSE, 1980). O restante das raízes foi destinado à determinação da matéria seca de raízes (MSR). Após a determinação de MSR, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley e igualmente submetidas à análises de As.

A densidade de esporos (50 mL solo<sup>-1</sup>) de todos os tratamentos inoculados com FMAs foi determinada após extração dos esporos via peneiramento úmido (GERDEMANN & NICOLSON, 1963), seguido de

centrifugação com água e solução de sacarose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) e contagem em microscópio estereoscópio com aumento entre 20x a 40x.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Produção de matéria seca

As plantas de *Leucaena leucocephala* não sobreviveram no tratamento com a adição de  $150 \text{ mg dm}^{-3}$  de As ao Neossolo Quartzarênico (RQ). Nesta concentração, foram observados sintomas de toxidez comumente associados a As, tais como folhas com coloração marrom escuro, seguido da morte das plantas, logo após a pré-emergência das plântulas (Figura 1).



Figura 1 Sintomas de toxidez comumente associados a As folhas com coloração marrom escuro, necrose nas pontas, seguido da morte das plântulas. A) Pré-emergência de *L. leucocephala* em solo sem contaminação por As. B) Pré-emergência de em solo contaminado com  $150 \text{ mg dm}^{-3}$  de As.

Com as adições de 35 e 75 de  $\text{mg dm}^{-3}$  de As ao RQ, sintomas típicos da toxidez de As, foram observados durante o crescimento das plantas,

principalmente nos tratamentos sem inoculação de FMAs ou de menor eficiência (Figura 2).

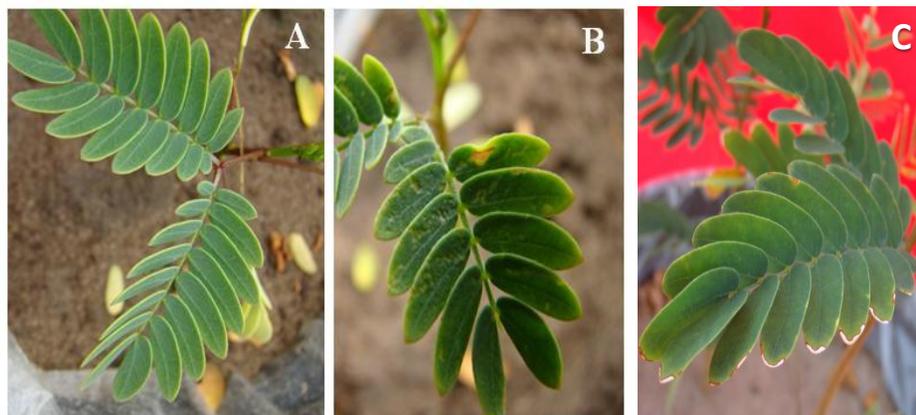


Figura 2 Sintomas de toxidez comumente associados a As folhas com coloração marrom escuro, necrose nas pontas, durante o crescimento de *L. leucocephala*. A) Folhas de *L. leucocephala* em solo sem contaminação por As. B) Folhas de *L. leucocephala* em solo contaminado com  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As sem inoculação. C) Folhas de *L. leucocephala* em solo com  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculado com *Gigaspora albida*.

Os dados de produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) da *Leucaena leucocephala* encontram-se na Tabela 2. Nos tratamentos com adição de  $35$  e  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As ao Neossolo Quartzarênico (RQ) reduziu significativamente a produção da matéria seca da parte aérea e da raiz para os diferentes isolados de FMAs estudados, comparativamente àquela obtida no solo sem contaminação. Com a adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, o metalóide provocou redução relativa de 71,1% no desenvolvimento radicular, e de 78,6% na parte aérea das plantas de *L. leucocephala*, respectivamente, indicando maior sensibilidade ao excesso de As. Enquanto isso, apenas *G. clarum* favoreceu a produção MSPA e MSR, obtendo-se aumentos de 52 e 55% em relação ao tratamento não inoculado, respectivamente, evidenciando os benefícios deste fungo para o crescimento da *L. leucocephala* nas condições de solo estudadas.

Tabela 2 Matéria seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de leucena inoculados com diferentes isolados de FMAs e cultivados em solos contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	MSPA (g vaso <sup>-1</sup> )			MSR (g vaso <sup>-1</sup> )		
	0	35	75	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	3,40 Ac	2,15 Bb	1,04 Cd	1,45 Ac	1,03 Bc	0,99 Bb
<i>A. morrowiae</i>	3,36 Ac	3,24 Aa	2,66 Bb	1,84 Ab	1,04 Bc	0,88 Bb
<i>G. albida</i>	3,60 Ab	2,53 Bb	2,34 Bc	1,23 Ad	1,30 Aa	0,67 Bc
<i>G. clarum</i>	3,89 Ab	3,11 Ba	3,56 Aa	1,94 Aa	1,15 Bb	2,16 Aa
Mix Paracatu	2,12 Ad	1,35 Bc	0,78 Ce	1,75 Ab	0,83 Bd	0,56 Cd
Mix de FMAs	4,50 Aa	3,12 Aa	2,30 Bc	1,89 Aa	0,87 Bd	0,68 Cc

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05)

Estudo conduzido por Tu e Ma (2002), avaliando a produção de matéria seca da *Pteris vittata* em solo arenoso contaminado com arsênio, revelou que, na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup>, ocorreu uma redução na biomassa da parte aérea em 64%, devido ao aumento da disponibilidade do elemento. Isto mostra a alta sensibilidade da *L. leucocephala* em relação à *Pteris*. O As pode interferir no crescimento radicular em consequência da redução das taxas respiratórias devido à substituição do fosfato pelo arsenato nos processos metabólicos de geração de energia, como a respiração celular (SHARPLES et al., 2000; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001).

Durante o experimento discutido neste capítulo, as plântulas de *L. leucocephala* nos tratamentos com maiores doses de As, apresentaram sintomas de fitotoxidez logo após a emergência, seguida de morte, sugerindo que o crescimento da raiz ainda era muito dependente das reservas contidas na semente (ARTECA, 1995). Considerando-se que as sementes também foram bastante afetadas pelo As, levando à queda nas taxas de alongamento radicular devido à redução na atividade de amilases. As amilases são enzimas responsáveis por um dos primeiros passos no metabolismo de degradação de amido para a geração de energia durante a germinação e primeiras etapas do

desenvolvimento do vegetal. Dessa forma, a menor atividade dessas enzimas pode reduzir a disponibilidade de energia para o crescimento radicular (LIU et al., 2005).

Os efeitos do As nas taxas matéria seca de raiz em plantas de *L. leucocephala* foram significativos durante o período de exposição ao poluente, o que sugere que o elemento é facilmente absorvido pelas raízes da espécie em estudo, confirmando sua sensibilidade ao As, como já relatado por Melo (2006), Felipe (2007) e Silva (2008). Este fato, aliado à ocorrência de alterações anatômicas e a um sistema radicular pouco desenvolvido, pode ter levado ao baixo suprimento de nutrientes essenciais e água, promovendo déficit hídrico indireto, afetando assim a produção de matéria seca da parte aérea (CARBONELL-BARRACHINA et al., 1997).

### **3.2 Efeito da contaminação por arsênio na esporulação e colonização de FMAs**

A esporulação dos diferentes isolados fúngicos foi bastante diferenciada, variando em média de 0 a 1070 esporos/50g de solo (Tabela 3). Na menor contaminação com As, *Glomus clarum* apresentou a maior densidade de esporos, 569 esporos/50 g de solo, seguido por Mix de FMAs. Na maior contaminação com As, *G. clarum* e Mix de FMAs foram os fungos que apresentaram os maiores valores de esporulação. Com exceção do *G. clarum* houve uma tendência de diminuição na esporulação com o aumento da dose de As ( $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As) (Tabela 3).

A colonização de *G. clarum* apresentou um aumento da taxa colonização radicular na adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, em relação aos demais tratamentos de inoculação. A taxa de colonização foi reduzida com o aumento na adição de As, exceto para o *G. clarum* que apresentou um aumento de 15% em relação a dose de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$ . Conclui-se que o efeito da contaminação do

solo com As, foi diferenciado, sendo que, para vários fungos, houve redução da colonização da *L. leucocephala*, com exceção para o isolado *G. clarum* (Tabela 3).

Tabela 3 Densidade de esporos e taxa de colonização de fungos micorrízicos arbusculares inoculados em leucena cultivada em Neossolo Quartzarênico contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	Esporulação (n° esporos 50 g solo <sup>-1</sup> )			Colonização (%)		
	0	35	75	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	0 Ae	0 Ae	0 Ae	0 Ad	0 Ad	0 Ad
<i>A. morrowiae</i>	57 Ab	35 Bc	32 Bc	37 Ab	27 Bb	20 Cb
<i>G. albida</i>	43 Bb	56 Ac	34 Bc	32 Ab	36 Aa	23 Bb
<i>G. clarum</i>	540 Ba	569 Ba	1070 Aa	40 Aa	37 Ba	39 Aa
Mix Paracatu	30 Ac	23 Bd	12 Cd	26 Ac	19 Bc	11 Bc
Mix de FMAs	670 Aa	256 Bb	217 Bb	43 Aa	29 Bb	27 Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05)

O grau de colonização das plantas pelos FMAs em ambientes degradados depende da densidade de propágulos e da composição das espécies de FMA no solo, tornando-se isto de grande importância em áreas degradadas (ZAK et al., 1982).

### 3.3 Concentração de As na planta e remoção do metalóide do solo

Com o aumento das doses de 35 para 75 mg dm<sup>-3</sup> de As, foi observado um incremento da concentração de As na parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) independente do tratamento de inoculação (Tabela 4). No entanto, os maiores efeitos das doses de As na MSPA e MSR foram observados na presença do isolado *Glomus clarum* e Mix Paracatu (Tabela 4).

Tabela 4 Concentração de arsênio ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na parte aérea e raiz de leucena cultivados em solo contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	As na MSPA ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			As na MSR ( $\text{mg kg}^{-1}$ )		
	0	35	75	0	35	75
	----- $\text{mg dm}^{-3}$ -----			----- $\text{mg dm}^{-3}$ -----		
Não inoculado	<LD Ca	2,86 Bc	3,93 Ac	1,15 Ba	4,29 Bd	19,70 Af
<i>A. morrowiae</i>	<LD Ca	4,26 Bb	9,06 Ab	<LD Ca	5,14 Bc	27,36 Ad
<i>G. albida</i>	<LD Ca	2,88 Bc	4,56 Ac	<LD Ca	6,87 Bb	21,33 Ae
<i>G. clarum</i>	<LD Ca	7,43 Ba	16,76 Aa	<LD Ca	7,69 Bb	78,90 Aa
Mix Paracatu	<LD Ca	1,03 Bd	3,54 Ad	<LD Ca	3,02 Be	39,55 Ac
Mix de FMAs	<LD Ca	1,45 Bd	2,26 Ad	<LD Ca	8,69 Ba	44,68 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott,  $P < 0,05$ ) LD = valores encontrados para As na planta foram menores que o limite de detecção do método empregado ( $\sim 0,060 \text{ mg de As kg}^{-1}$ ).

A eficiência de cada isolado de FMAs em associação com *L. leucocephala* em acumular As na MSPA e na MSR pode ser avaliada pela remoção líquida do metalóide do solo (Tabela 5). O sucesso da remoção de metais e metalóides deve ser visto como uma combinação de dois fatores: concentrações dos contaminantes suficientemente altas na parte aérea e alta produção de biomassa (NASCIMENTO et al., 2006).

Tabela 5 Acúmulo de arsênio ( $\mu\text{g vaso}^{-1}$ ) na parte aérea e raiz de leucena cultivados em solo contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	Acúmulo de As na MSPA		Acúmulo de As na MSR		Acúmulo Total de As	
	35	75	35	75	35	75
	----- $\text{mg dm}^{-3}$ -----		----- $\text{mg dm}^{-3}$ -----		----- $\text{mg dm}^{-3}$ -----	
Não inoculado	6,15 c	4,11 d	4,42 c	19,50 e	10,57 e	23,61 e
<i>A. morrowiae</i>	13,80 b	24,10 b	5,34 c	24,08 c	19,14 b	48,18 b
<i>G. albida</i>	7,29 c	10,67 c	8,93 a	14,29 f	16,22 c	24,96 d
<i>G. clarum</i>	23,10 a	58,95 a	8,84 a	170,42 a	31,94 a	229,37 a
Mix Paracatu	1,39 e	2,76 e	2,51 d	22,15 d	3,90 f	24,91 d
Mix de FMAs	4,52 d	5,19 d	7,56 b	30,38 b	12,08 d	35,57 c

Médias seguidas de letras iguais na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott,  $P < 0,05$ )

De acordo com Fitz & Wenzel (2002), plantas tolerantes tendem a restringir a transferência de As do solo para a planta e da raiz para a parte aérea, enquanto que as hiperacumuladoras absorvem e translocam ativamente o contaminante. Com base nos resultados apresentados, pode-se verificar que as plantas inoculadas com *G. clarum* apresentaram menor sensibilidade ao As, mas nenhum dos isolados estudados proporcionou a planta hospedeira características de hiperacumulação, devido à remoção de As e ao fato das concentrações do contaminante na parte aérea ter sido menor que as reconhecidas para hiperacumuladoras (SRIVASTAVA et al., 2006; GONZAGA et al., 2006). No entanto, os resultados obtidos mostram que os efeitos dos FMAs sobre a fitorremediação em termos de fitoproteção nas plantas diferem entre os isolados de FMAs, assim como, a tolerância de plantas micorrizadas ao As esta associada a fungos de crescimento rápido, visto que a tolerância à planta hospedeira está associada ao acúmulo desses elementos no micélio fúngico (CHRISTIE et al., 2004).

O fator translocação (FT) mede a eficiência da planta em transportar um elemento da raiz para a parte aérea (Tabela 6). O aumento da concentração de As tende a reduzir a transferência do elemento para a parte aérea, com exceção da *Gigaspora albida*, e isso pode explicar a baixa eficiência deste isolado para *L. leucocephala* (Tabela 6). Os tratamentos inoculados com *Acaulospora morrowiae* e *Glomus clarum* aumentam o fator de translocação nas diferentes doses de As estudadas, característica importante para a fitoextração, apesar de o fator de translocação não ter sido superior a 1 (Tabela 6). Quando o fator de translocação for superior a 1, confirma-se a característica de hiperacumulação da planta (JANKONG et al., 2007).

Tabela 6 Fator de translocação em leucena inoculada com diferentes isolados de FMAs e cultivada em solo contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	Fator de translocação		
	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	<LD Ca	0,58 Ab	0,17 Bc
<i>A. morrowiae</i>	<LD Ca	0,72 Aa	0,50 Ba
<i>G. albida</i>	<LD Ba	0,45 Ac	0,43 Aa
<i>G. clarum</i>	<LD Ca	0,72 Aa	0,28 Bb
Mix Paracatu	<LD Ca	0,36 Ad	0,11 Bd
Mix de FMAs	<LD Ca	0,37 Ad	0,15 Bc

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05). LD = valores encontrados para As na planta foram menores que o limite de detecção do método empregado (~ 0,060 mg de As kg<sup>-1</sup>).

A baixa translocação do As da raiz para a parte aérea, bem como alterações no metabolismo interno da planta que incluem produção de quelatos, compartimentalização, biotransformação e reparo celular (GONZAGA et al., 2006), pode estar relacionada a mecanismos de tolerância ao metalóide e, ou, de redução da fitotoxidez.

As plantas de *L. leucocephala* apresentaram maior nutrição fosfatada em relação ao tratamento não inoculado (Tabela 7). Porém, as plantas inoculadas com Mix Paracatu não apresentaram eficiência simbiótica, visto que a nutrição com P foi semelhante ao tratamento não inoculado e na dose 75 mg dm<sup>-3</sup> de As foi inferior (Tabela 7). Observando a relação P/As, verifica-se que a inoculação com Mix de FMA propicia melhor balanço de P/As em relação aos outros tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7 Concentração de P na parte aérea e relação P/As de leucena inoculada com diferentes isolados de FMAs e cultivada em solo contaminado com As.

Tratamentos de inoculação	P na MSPA (mg kg <sup>-1</sup> )			Relação P/As		
	0	35	75	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----			-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	0,42 Cd	0,49 Be	1,25 Ab	<LD Ca	0,17 Bd	0,31 Ab
<i>A. morrowiae</i>	1,02 Ac	0,71 Cc	1,00 Ac	<LD Ca	0,16 Ad	0,11 Be
<i>G. albida</i>	1,01 Bc	1,16 Ab	1,17 Ab	<LD Ca	0,40 Ac	0,25 Bc
<i>G. clarum</i>	1,40 Bb	0,92 Cb	1,64 Aa	<LD Ca	0,12 Ae	0,09 Bf
Mix Paracatu	0,41 Cd	0,56 Ad	0,67 Ad	<LD Ca	0,54 Ab	0,19 Bd
Mix de FMAs	1,80 Aa	1,72 Ba	1,60 Ca	<LD Ca	1,19 Aa	0,70 Ba

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05). LD = valores encontrados para As na planta foram menores que o limite de detecção do método empregado (~ 0,060 mg de As kg<sup>-1</sup>).

Esperava-se que isolados de FMAs da área de Paracatu apresentassem maior eficiência simbiótica, favorecendo o crescimento de espécies de plantas visando a reabilitação/revegetação dessas áreas, uma vez que esses fungos possuem a capacidade de se adaptar às condições adversas. Esse aspecto foi evidenciado em estudo realizado por Rao & Tak (2002) que verificaram que o fungo *Glomus mosseae* isolado de uma área de mineração de calcário em região árida da Índia aumentou em 12-40% a altura e de 16-42% a produção de matéria seca de várias espécies arbóreas (*Acacia ampliceps*, *A. eriopoda*, *Albizia lebbek*, *Azadirachta indica*, *A. juss* e *Colophospermum mopane*). Além disso, houve um aumento significativo na densidade de esporos viáveis de FMAs variando de 65-102% e na porcentagem de colonização micorrízica que variou de 36-150% entre as diferentes espécies. No entanto, esse fato não foi verificado nesse estudo com isolados da área de mineração, e tais benefícios foram evidentes com outros isolados com *G. clarum* e a mistura de espécies de FMAs (Mix de FMAs), que possivelmente o *G. clarum* teve participação decisiva na maior produção de MSPA e MSR de *L. leucocephala*. Entretanto, este efeito da inoculação com *G. clarum* não foi relacionado com o aumento da absorção de P pela *L.*

*leucocephala*, indicando a provável existência de outros mecanismos envolvidos na proteção das plantas micorrizadas ao excesso de As. Como verificado por Soares & Siqueira (2008), a adição de P juntamente com a inoculação de FMAs isolados de áreas contaminadas com Cd, Cu, Pb e Zn, tiveram efeito amenizante sobre a toxidez dos metais para a *Brachiaria decumbens*. Os mecanismos pelos quais esses benefícios ocorrem são complexos e têm sido objeto de estudos em várias partes do mundo (KLAUBERG-FILHO et al. 2005; CHRISTIE et al. 2004; KHAN, 2006). Segundo estes autores, são necessários mais estudos sobre o papel das raízes das plantas e da diversidade da microbiota do solo tais como bactérias, fungos e microfauna associada para compreender a complexidade ecológica de diversas plantas, microrganismos, tipos de solo, clima e o papel desses na remediação de solos contaminados por metais pesados.

#### 4 CONCLUSÃO

A adição de arsênio no valor de intervenção industrial ( $150 \text{ mg dm}^{-3}$ ) provocou sintomas severos de toxidez nas plantas de *Leucaena leucocephala*. Nas demais doses ( $35$  e  $75 \text{ mg dm}^{-3}$ ) foi observado redução na produção de matéria seca da parte aérea e da raiz, principalmente nos tratamentos não inoculados.

A adição de arsênio no solo afetou negativamente a colonização micorrízica da *Leucaena leucocephala* e a densidade de esporos de modo diferenciado para os fungos inoculados.

Para o mix Paracatu (*Aclauospora morrowiae*, *Glomus clarum*, *Paraglomus occultum*) o aumento da adição de As reduziu a esporulação e a colonização, sendo *Glomus clarum* e mix de FMAs (isolado de área não contaminada) mais eficientes mesmo na dose mais elevada de As.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. **Plant and soil**, v. 159, n. 1, p. 69-78, Jan. 1994

ADRIANO, D.C. **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals**. 2.ed. New York, Springer Verlag, 2001. 867p.

ARRIAGADA, C.A., HERRERA, M.A., OCAMPO, J.A. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globules* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. **Journal Environmental Management**, v. 84, n. 1, p. 93–99, June 2007.

ARTECA, R.N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall. 1995, 332 p.

CARBONELL-BARRACHINA, A.A. et al. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 3-4, p. 167-176, Dec. 1997.

CHEN, B. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. **Science of the Total Environment**, v. 379, n. 2-3, p. 226-234, July 2007.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 209-217, Jan. 2004.

CITTERIO, S. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. **Chemosphere**, v. 59, p. 21–29, Mar. 2005.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de 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](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf). Acesso em: 25 set. 2010

DAY, P.R. Particle fractionation and particle-size analysis. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. Part.1, p.545-566.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1999. 370 p.

FELIPE, R.T.A. **Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio**. 2007, 29 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2007.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. Programas e **Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

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

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, Apr. 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, Mar. 1980.

GOHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, v. 223, n. 6, p. 1115–1122, June 2006.

GONZAGA, M.I.S.; SANTOS, J.A.G.; MA, L.Q. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 90-101, Jan./Fev. 2006.

GONZAGA, M.I.S.; SANTOS, J.A.G.; MA, L.Q. Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils: Repeated harvests and arsenic redistribution. **Environmental Pollution**, v. 154, n. 2, p. 212-218, July 2008.

HABUDA-STANIC, M. et al. Arsenite and arsenate sorption by hydrous ferric oxide/polymeric material. **Desalination**, v. 229, n. 1-2, p. 1-9, Set. 2008.

JANKONG, P.; VISOOTTIVISETH, P.; KHOKIATTIWONG, S. Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. **Chemosphere**, v.68, n. 10, p.1906-1912, Aug. 2007.

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

KHAN, A.G. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal Trace Element in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 355–364, June 2005.

KHAN, G. Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University**, v. 7, n. 7, p. 503-514, 2006.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.85-144, Jul. 2005.

LEE, J.S. et al. Evaluation of human exposure to arsenic due to rice ingestion in the vicinity of abandoned Myungbong Au-Ag mine site, Korea. **Journal of Geochemical Exploration**, v.96, p.231-235, 2008.

LI, X.L., CHRISTIE, P. Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn contaminated soil. **Chemosphere**, v. 43, n. 2, p. 201–207, Jan. 2001.

LINS, C.E.L. et al. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit., in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n.3, p. 181-185, Mar. 2006.

LIU, X. et al. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere**, v. 6, n. 2, p. 293-301, Oct. 2005.

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

MALCOVA, R., RYDLOVA, J., VOSATKA, M. Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 3, p. 151–157, Mar. 2003.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 29–43, Apr. 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**, v.43, n. 4, p.519-524, Oct. 1992.

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

MELO, R.F. **Potencial de espécies vegetais para a fitorremediação de um solo contaminado por As.** 2006, 107 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA, 2006. 625 p.

NASCIMENTO, C.W.A; AMARASIRIWARDENA, D.; XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 140, n. 1, p. 114-123, Mar. 2006.

ORLOWSKA, E. et al. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. **Geoderma**, v. 129, n. 1-2, p. 92–98, Nov. 2005.

PALIOURIS, G., HUTCHINSON, T.C. Arsenic, cobalt and nickel tolerances in two populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke from Ontario, Canada. **New Phytologist**, v. 117, p. 449–459, Jan. 1991.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p.158-161, Jan. 1970.

RAIJ, B. van et al. **Análise química do solo para fins de fertilidade.** Campinas, Fundação Cargill, 1987. 170p.

RAO, A.V.; TAK, R. Growth of different tree species and their nutrient uptake in limestone mine spoil as influenced by arbuscular mycorrhizal (AM) – fungi in Indian arid zone. **Journal Arid Environmental.**, v.51, n. 1, p. 113-119, May. 2002.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86-92, Jan. 2002.

SHARPLES, J.M. et al. Symbiotic solution to arsenic contamination. **Nature**, v. 404, p. 951–952, Apr. 2000.

SHETTTY, K.G., HETRICK, B.A.D., SCHWAB, A.P. Effects of mycorrhizae fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. **Environmental Pollution**, v. 88, n. 3, p. 307–314, Apr. 1995.

SILVA, K.L.F. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. 2008, 98 p. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2008.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, vol. 41, n. 12, p. 1749-1757, Dec. 2006.

SILVA, S.R. et al. Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 189-197, Jan./Fev. 2004.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833-841, Jan. 2008.

SRISATIT, T., KOSAKUL, T., DHITIVARA, D. Efficiency of arsenic removal from soil by *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash and *Vetiveria nemoralis* (Balansa) A. Camus. **Science Asia**, v. 29, p. 291–296, 2003.

SRIVASTAVA, M.; MA, L.Q.; SANTOS, J.A.G. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. **Science of the Total Environment**, v.364, n. 3,p.24-31, July 2006.

TU, C.; MA, L.Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 2, p. 641-647, 2002.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3ed. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2008.

VISOOTTIVISETH, P.; FRANCESCONI, K.; SRIDOKCHAN, W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 453-461, Aug. 2002.

VOGEL-MIKUŠ, K. et al. Colonisation of a Zn, Cd e Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal e nutrient uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 139, n. 2, p. 362-371, Jan. 2006.

WENZEL, W.W. et al. Arsenic in field-collected soil solution and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 165, n. 2, p. 221-228, Apr. 2002.

WHITFIELD, L., RICHARDS, A.J., RIMMER, D.L. Effects of mycorrhizal colonization on *Thymus polytrichus* from heavy metal-contaminated sites in north England. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 1, p. 47-54, Jan. 2003.

WONG, M.H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 775-780, Feb. 2003.

XIA, YUN-SHENG et al. Arsenic uptake by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in an arsenic-contaminated soil with added phosphorus. **Journal Environmental Sciences**, v.19, n. 10, p.1245-1251, Nov. 2007.

XU, P. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v.156, n.1, p.215-220, Nov. 2008.

ZAK, J.C.; DANIELSON, R.M.; PARKINSON, D. Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. **Mycologia**, v. 74, n. 5, p.785-792, 1982.

ZHANG, W. et al. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p.337-345, Oct. 2004.

ZHAO, E.J.; DUNHAM, S.J.; McGRATH, S.P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytologist**, v.156, n. 1, p. 27-31, Oct. 2002.

## CAPÍTULO 4

### FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM *Leucaena leucocephala* CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM ARSÊNIO

#### RESUMO

A influência do arsênio (As) sobre alguns aspectos do sistema antioxidante foi estudada em plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com diferentes isolados de fungos micorrízicos arbusculares e expostas a três concentrações de As (0, 35 e 75 mg dm<sup>-3</sup> de As) em um Neossolo Quartzarênico (RQ) contaminado com Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. O estudo foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da UFLA, utilizando-se três doses de As e seis tratamentos com inoculação de FMAs, com três repetições. Foram selecionados três isolados de FMAs de solos não contaminados e três isolados provenientes de áreas contaminadas com As, localizadas em Paracatu (MG). Após 147 dias foram determinadas as atividades enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), da peroxidase do ascorbato (APX) e da redutase da glutationa (GR) na parte aérea de plantas de *L. leucocephala* inoculadas com diferentes FMAs, além da medição das alturas das plantas e nutrição mineral. Os principais resultados mostram que a contaminação do solo com As afetou o crescimento das plantas de modo diferenciado para os diversos isolados testados. A adição de As em plantas de *L. leucocephala* resultou no incremento na atividade enzimática da SOD, CAT, APX e GR, indicando uma manifestação inicial de defesa antioxidante. A atividade da GR foi maior para o tratamento inoculado com *Glomus clarum* e mistura de espécies provenientes de local não contaminado. A inoculação com FMAs teve múltiplos efeitos benéficos no crescimento de *L. leucocephala*, principalmente nos tratamentos inoculados com *G. clarum*, sugerindo que a simbiose se manteve eficiente, possibilitando o crescimento das plantas. Os resultados indicam o provável papel de colonização de fungos micorrízicos arbusculares na tolerância ao estresse causado por As.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Micorrizas. Elementos-traço.

## ABSTRACT

The influence of arsenic (As) on some aspects of the antioxidant system was studied in *Leucaena leucocephala* plants inoculated with different isolates of mycorrhizal fungi exposed to three As concentrations (0, 35 and 75 mg of As dm<sup>-3</sup> of soil) in a soil (PSAMENT) contaminated with Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The study was conducted in a greenhouse at the Department of Soil Science at Federal University of Lavras UFLA using three doses of As and six treatments inoculated with AMF, with three replications. We selected three AMF isolates from uncontaminated soils and three isolates from areas contaminated with arsenic. After 147 days, we evaluated enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) in the shoots of plants of *L. leucocephala* inoculated with different AMF, as well as plant growth and mineral nutrition. Results show that soil contamination with As affected plant growth differently for different isolates. The addition of As in plants of *L. leucocephala* resulted in an increase in enzymatic activities of SOD, CAT, APX and GR, indicating an initial manifestation of antioxidant defense. The GR activity was higher in the treatment inoculated with *Glomus clarum* and with the mixing of species from the uncontaminated site. Inoculation with AMF had multiple beneficial effects on the growth of *L. leucocephala*, particularly in treatments inoculated with *G. clarum*, suggesting that the symbiosis remained efficient, enabling the growth of plants. The results indicate the probable role of colonization of mycorrhizal fungi in stress tolerance caused by As.

Keywords: Oxidative stress. Mycorrhizal. Trace-elements.

## 1 INTRODUÇÃO

A revegetação de solos degradados é prática crescente devido a necessidade de se restaurarem ambientes que sofreram alterações por diversas intervenções, como por exemplo, atividade de mineração. Porém, algumas áreas apresentam concentrações elevadas de metais e metalóides tóxicos, o que agrava a situação destes locais, devido ao risco de contaminação de solos vizinhos, águas superficiais e subterrâneas (BOULARBAH et al., 2006).

Dentre os diversos processos causadores de contaminação oriundos de atividade de mineração, a liberação de arsênio (As) no ambiente é um dos fatores de maior risco para os ecossistemas, com sérios danos à saúde humana, que incluem efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (TAPIO & GROSCHE, 2006).

Neste contexto, a utilização de plantas na redução da contaminação do ambiente – a fitorremediação – é uma alternativa passível de ser utilizada, em substituição ou complementação aos métodos físico-químicos, por ser considerada uma técnica de baixo custo (ALDRICH et al., 2007). A fitoestabilização pode estabilizar os contaminantes pela absorção e acúmulo nas raízes e, ou, pela adsorção nas raízes e precipitação na rizosfera. Pode ser útil na reabilitação de solos contaminados, reduzindo a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, de ambientes vizinhos e a disponibilidade do contaminante para entrar na cadeia alimentar (WONG, 2003).

A escolha de espécies vegetais para utilização desta técnica é de grande importância, uma vez que algumas espécies são sensíveis a elementos tóxicos, como o As, e não sobreviveriam na presença do mesmo. Outras, entretanto, são consideradas tolerantes e, assim, indicadas para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com este poluente.

O arsênio, na forma de arsenato ( $\text{As}^{5+}$ ), predomina em ambientes aeróbicos e, devido à similaridade com o fosfato, pode participar de muitas reações celulares, como a substituição do fosfato em macromoléculas de DNA, a competição pelo transportador de fosfato e inibir a síntese de ATP (PAIVOKÉ & SIMOLA, 2001; ROSEN, 2002; KATSNELSON, A., 2010; WOLFE-SIMON et al., 2010). Uma vez absorvido, o arsenato pode ser reduzido a arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) e inibir a atividade de várias enzimas, reagindo com os grupos sulfidrílicos das proteínas (MEHARG & HARTLEY- WHITAKER, 2002). Outros estudos mostram que este metalóide pode levar ao aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS) (BHATTACHARYA & BHATTACHARYA, 2007), pela oxidação espontânea do arsenito em arsenato e pela inibição da dissipação do gradiente protônico na cadeia transportadora de elétrons, podendo acarretar em desequilíbrio entre os processos de produção e remoção de oxidantes (KITCHIN & AHMAD, 2003). Os ROS como o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), são continuamente produzidos, predominantemente, em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (JEMIOLA-RZEMNSKA et al., 2007). O equilíbrio entre a produção e o consumo dos ROS pode ser perturbado por diversos fatores estressantes como alta luminosidade, déficit hídrico, baixas temperaturas, metais pesados e outros agentes (APEL & HIRT, 2004).

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes, que incluem a ação de mecanismos enzimáticos, como aumento na atividade da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), das peroxidases (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da redutase da glutatona (GR) e de mecanismos não enzimáticos, como o incremento na produção de tióis (CAO et al., 2004; SANTOS, 2006).

A enzima dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), um dos mais efetivos processos enzimáticos antioxidantes, catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , na

presença de prótons, a oxigênio molecular e  $H_2O_2$ . As várias isoenzimas da SOD diferem na natureza do metal presente no centro ativo, na constituição da cadeia aminoacídica e, no número de sub-unidades. As diferentes isoenzimas da SOD estão localizadas nos cloroplastos, no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no apoplasto (VALKO et al., 2006).

A enzima catalase (CAT EC 1.11.1.6), por sua vez, promove a conversão do  $H_2O_2$  a água e oxigênio molecular e está localizada, principalmente, nos peroxissomos (MITTLER, 2002).

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 citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular, no apoplasto, nas mitocôndrias e nos peroxissomos (MITTLER, 2002). A POX predominante é a peroxidase do ascorbato (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 redutase da glutathiona, do ciclo ascorbato-glutathiona.

A redutase da glutathiona (GR, EC 1.8.1.7) reduz a glutathiona oxidada (GSSG) utilizando NADPH, que é utilizada para regenerar o ascorbato, substrato da APX (APEL & HIRT, 2004). Incremento na atividade da GR resulta em aumento na concentração de glutathiona reduzida (GSH) e decréscimo na concentração de GSSG no interior das células, aumentando assim, a razão GSH/GSSG (ISRAR et al., 2006). A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glu-cys-gly) que, além de participar do ciclo ascorbato-glutathiona, é capaz de consumir alguns ROS. A GSH participa, também, na síntese de fitoquelatinas (PC), que são peptídeos não protéicos com a estrutura geral ( $\gamma$ -glu-cys) $_n$ -gly, em que n varia de 2-11. As PCs podem ser rapidamente sintetizadas, pela sintase da fitoquelatina (PCS, EC 2.3.2.15), em resposta a níveis tóxicos de metais pesados

(SCHMÖGER et al., 2000) e arsênio (PAWLIK-SKOWRONSKA et al., 2004). As PCs produzidas podem, então, formar complexos com os metais, reduzindo a toxicidade dentro das células. Dessa forma, a produção de PCs e a formação dos complexos com os metais tóxicos fazem parte de um importante mecanismo envolvido na tolerância diferencial entre espécies vegetais (CAO et al., 2004; CLEMENS, 2006).

*Leucaena leucocephala* é uma espécie perene, de porte arbóreo, pertencente à família Fabaceae, nativa da América Central. É uma das espécies mais difundidas do gênero *Leucaena*, possui rápido crescimento e seu sistema radicular pode atingir grande profundidade (BARRETO et al., 2001).

Espécies vegetais fixadoras de nitrogênio, como a leguminosa *Leucaena leucocephala*, têm sido indicada para utilização em programas de revegetação de áreas degradadas, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de tolerância destas espécies quando expostas ao As (ZHANG et al., 2004; LINS et al., 2006). Em parte, esta indicação se deve à capacidade destas espécies sobreviverem em ambientes degradados, com reduzida quantidade de matéria orgânica e de diversos nutrientes, principalmente de nitrogênio (WONG, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência As, sobre alguns aspectos do crescimento e do sistema antioxidante em plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com diferentes isolados de fungos micorrízicos arbusculares e expostas a três concentrações de As (0, 35 e 75 mg de As dm<sup>-3</sup> de solo) em um Neossolo Quartzarênico (RQ).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Para avaliar a influência da contaminação do solo com As no crescimento e efeitos no sistema antioxidativo em plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com FMAs, foi realizado um experimento em casa de

vegetação no Departamento de Ciência do Solo da UFLA, no período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010, utilizando-se três isolados de FMAs de solos não contaminados provenientes da coleção da UFLA (*Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum* e *Gigaspora albida*), um inóculo misto proveniente da mistura desses três isolados (Mix de FMAs) e um inóculo misto de três isolados provenientes de áreas contaminadas com As em Paracatu-MG (*Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum* e *Paraglomus occultum*). Como substrato, utilizou-se um Neossolo Quartzarênico (RQ), o qual foi contaminado com  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas doses de 35 e 75  $\text{mg dm}^{-3}$  de As.

Após 147 dias de cultivo, foram realizadas medições da parte aérea com auxílio de uma régua milimétrica a partir do colo da planta até o ápice caulinar. Em seguida, para avaliação enzimática das plantas de *Leucaena leucocephala*, coletaram-se em média cinco folhas (pecíolo e folíolos) por vaso com sintomas de fitotoxidez com As e a partir do terço médio da altura da planta. Cada folha selecionada foi lavada com água deionizada, e em seguida acondicionadas em papel alumínio armazenadas em caixa de isopor contendo  $\text{N}_2$  líquido para posterior armazenamento em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até serem realizadas as extrações enzimáticas. O restante da parte aérea das plantas foram lavadas e colocadas para secar em estufa de circulação forçada a  $60^\circ\text{C}$ , moída em moinho tipo Wiley para ser utilizada na análise dos teores de macro e micronutrientes após digestão pelo protocolo USEPA 3051A (2002). Utilizando-se 0,5 g de material vegetal em 10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado em forno de microondas com tubos de Teflon® PTFE à pressão de 0,76 Mpa por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 Mpa é de aproximadamente  $175^\circ\text{C}$ . Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 20 mL com água destilada. No extrato, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe e Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, P e S por fluorescência de raios-X e K por fotometria de chama.

## **2.1 Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi instalado em delineamento totalmente casualizado, em esquema fatorial 3 x 6, utilizando-se três doses de As e seis tratamentos com inoculação de FMAs, com três repetições, totalizando 54 parcelas. Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de média (Scott-Knott a 5%) pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

## **2.2 Efeito do As sobre as atividades enzimáticas**

As análises enzimáticas ocorreram no Laboratório de bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

### **2.2.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos**

Os extratos enzimáticos brutos para a determinação das atividades da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), da peroxidase do ascorbato (APX) e da redutase da glutatona (GR) foram obtidos pela homogeneização de 0,3 g de folhas em nitrogênio líquido, seguida de adição de 2 ml de meio de extração e de centrifugação a 12.000 x g por 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4°C.

Os meios de extração foram: 1) tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mmol L<sup>-1</sup> e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v)

(PEIXOTO et al., 1999), para as enzimas SOD e CAT; 2) tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 1 mmol L<sup>-1</sup>, PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup>, ditioneitol (DTT) 2 mmol L<sup>-1</sup> e PVPP 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), para a APX; 3) tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, triton 0,02% (v/v) DTT 2 mmol L<sup>-1</sup>, PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup> e PVPP 1% (p/v) (CARLBERG & MANNERVIK, 1985), para a GR.

### **2.2.1.1 Determinação da atividade da SOD (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 5 ml de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, contendo metionina 13 mmol L<sup>-1</sup>, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e riboflavina 2 µmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a 25°C, numa câmara de reação, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul pela fotoredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

### **2.2.1.2 Determinação da atividade da CAT (CAT, EC 1.11.1.6)**

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mmol L<sup>-1</sup> (HAVIR &

MCHALE, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  (ANDERSON et al., 1995) e expressa em  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### **2.2.1.3 Determinação da atividade da APX (APX, EC 1.11.1.1)**

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0, ácido ascórbico  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ , e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (NAKANO & ASADA, 1981, modificado por MOSHIBA, 1993). 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  $2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  (NAKANO & ASADA, 1981) e expressa em  $\mu\text{mol de ácido ascórbico min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### **2.2.1.4 Determinação da atividade da GR (GR, EC 1.8.1.7)**

A atividade da GR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão tris-HCL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,5, GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , NADPH  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  (CARLBERG & MANNERVIK, 1985). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 340 nm, a 30°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  e expressa em  $\mu\text{mol de GSSG min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As plantas de *Leucaena leucocephala* apresentaram um melhor nutrição mineral quando inoculadas com FMAs em relação ao tratamento não inoculado (Tabela 1). As plantas inoculadas com *Glomus clarum* apresentaram maiores teores de macro e micronutrientes mesmo nas doses mais altas de As, o mesmo pode ser observado para a mistura de espécies de FMAs (mix de FMAs).

Tabela 1 Concentração dos nutrientes na parte aérea de *Leucaena leucocephala* inoculada com diferentes fungos micorrízicos arbusculares e submetida a diferentes doses de arsênio.

Tratamento	Concentração								
	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	S (g kg <sup>-1</sup> )	Fe(mg kg <sup>-1</sup> )	Mn(mg kg <sup>-1</sup> )	Cu(mg kg <sup>-1</sup> )	Zn(mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Não inoculado</b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	4,46±1,2	3,78±1,5	20,54±1,7	0,42±1,2	0,68±4,1	37,53±2	3,08±0,7	10±0,3	2,08±2
35	5,67±1,2	4,34±2,3	13,84±3,3	0,49±3,4	0,73±8,3	146,66±1	5,31±3	18,68±3	4,31±6
75	2,67±2,1	2,06±3,2	5,40±2,1	1,25±5,3	0,59±9	192,09±3	3,82±8	23,73±0,7	2,82±7
<b><i>A. morrowiae</i></b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	4,33±2,4	6,35±3,4	22,45±1,5	1,02±1,1	0,53±2,8	299,25±1	39,59±4	14,50±2	6,27±6
35	4,16±2,3	7,89±1,8	18,37±1,8	0,71±1,4	0,78±4,7	262,96±1	42,66±1	18,02±14	5,42±7
75	4,77±2,1	5,72±5,4	6,50±0,6	1,00±0,9	0,79±3,7	327,90±2	15,672±1,1	39,12±0,3	4,04±2
<b><i>G. albida</i></b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	4,16±2,1	4,56±1,3	15,40±1,7	1,01±0,8	0,71±3,1	119,50±1,7	41,05±0,9	46,59±2	5,74±11
35	3,71±2,4	5,67±3,5	14,84±5,3	1,16±1,7	0,78±7	102,77±5	33,13±1,9	125,71±1	4,68±6
75	4,30±3,9	1,25±2,2	6,81±1,1	1,17±2,7	0,68±3,3	121,48±7	21,01±1,3	186,37±1,3	2,97±2
<b><i>G. clarum</i></b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	4,76±4,5	9,56±2,1	31,68±3,6	1,40±1,9	0,79±5,4	138,76±2,9	42,50±1,7	64,61±0,6	5,31±2
35	5,36±1,2	7,44±1,3	25,31±1,3	0,92±2	0,87±7,8	142,22±2,7	44,28±1,4	65,05±1	6,17±2,4
75	4,93±1,9	9,17±1,7	10,90±0,7	1,64±3,1	0,89±6,4	139,50±3,7	28,76±0,7	183,29±2	3,82±5,7

Continua...

Tabela 1 Continuação...

Tratamento	Concentração								
	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	S (g kg <sup>-1</sup> )	Fe(mg kg <sup>-1</sup> )	Mn(mg kg <sup>-1</sup> )	Cu(mg kg <sup>-1</sup> )	Zn(mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Mix Paracatu</b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	2,16±1,1	3,56±4,5	21,25±4	0,41±1,7	0,79±3,3	109,50±0,7	31,05±1,9	36,59±1	3,08±2
35	3,31±2,1	2,67±1,9	14,54±2,3	0,56±3,2	0,67±6,8	110,77±0,5	23,13±0,9	115,71±1	5,31±6
75	4,56±4,9	1,54±1,2	3,40±2,1	0,67±1,3	0,82±3,4	114,48±0,7	11,01±1,3	176,37±2	3,82±7
<b>Mix de FMAs</b>									
<b>As (mg dm<sup>-3</sup>)</b>									
0	3,76±3,2	4,51±3,1	16,90±2,7	1,80±1,4	0,86±3,6	148,67±1,9	52,50±1,2	68,61±1,6	6,31±1,5
35	4,36±1,5	5,24±2,3	20,84±1,3	1,72±1,2	0,77±8	152,21±0,7	54,28±1,1	69,05±1	7,17±2,1
75	2,93±1,1	2,37±1,7	9,72±2,1	1,60±2,5	0,66±11	149,67±1,7	38,76±0,7	173,29±2	4,82±3,7

Em consequência do melhor estado nutricional das plantas de *L. leucocephala*, estas apresentaram maior crescimento e, conseqüentemente, maior produção de massa seca da parte aérea (vide Capítulo 3). As plantas desenvolvidas em solo sem adição de As apresentaram maior crescimento quando comparadas àquelas desenvolvidas em solos aonde foi acrescentado As. Nota-se ainda o efeito diferenciado de cada isolado de FMAs. Na concentração de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, as plantas apresentaram menor crescimento, com exceção do tratamento inoculado com *Glomus clarum* (Figura 1).

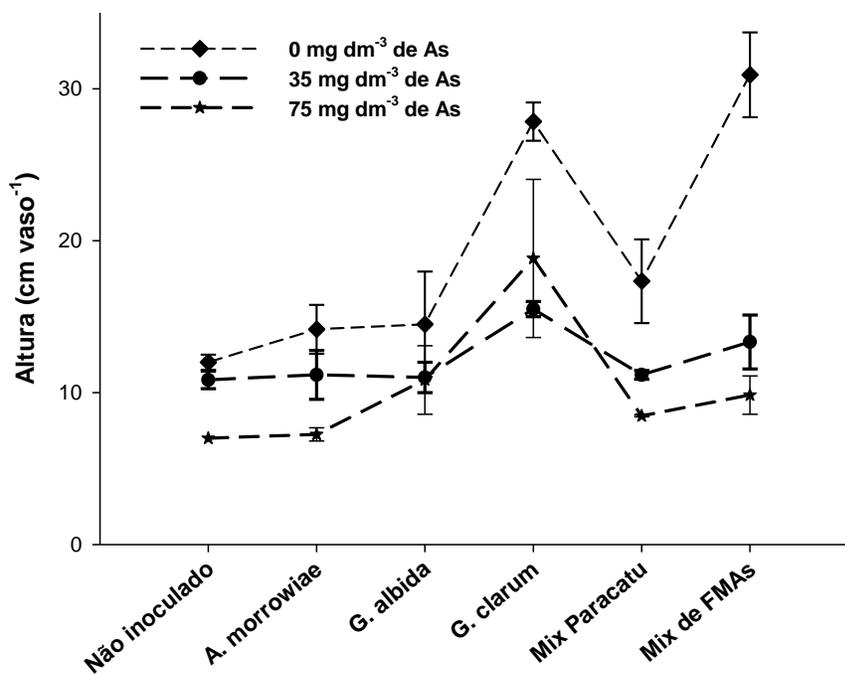


Figura 1 Altura de plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com diferentes fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a diferentes doses de arsênio, aos 147 dias de cultivo.

### 3.1 Efeito do As sobre a atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A exposição da *Leucaena leucocephala* ao As revelou aumento significativo na atividade da SOD nos tratamentos que receberam a inoculação de *Glomus clarum* e Mix de FMAs, tendo os maiores valores sendo observados em torno da dose mais elevada de As de 23,88 e 18,65 unidades de SOD g<sup>-1</sup> MF, respectivamente (Tabela 2). Conforme se verifica, tanto o incremento como a atividade absoluta de SOD em *L. leucocephala* inoculada com *G. clarum*, quando expostas ao As, foram significativamente superiores ao verificado nas demais espécies de FMAs, sugerindo ser o isolado capaz de eliminar mais ROS e portanto, sofrer menos danos oxidativos.

Tabela 2 Atividade da dismutase do superóxido em *Leucaena leucocephala* inoculada com diferentes isolados de FMAs submetida a diferentes concentrações de As em Neossolo Quartzarênico.

Tratamento de inoculação	Atividade de SOD (Unidades de SOD g <sup>-1</sup> MF)		
	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	1,42 Cd	2,78 Bd	7,44 Ae
<i>Acaulospora morrowiae</i>	2,62 Bc	3,50 Bc	8,10 Ad
<i>Gigaspora albida</i>	5,40 Bb	5,38 Bb	9,53 Ad
<i>Glomus clarum</i>	7,79 Ba	6,77 Ba	23,88 Aa
Mix Paracatu	2,17 Cc	4,68 Bb	12,33 Ac
Mix de FMAs	5,50 Cb	7,56 Ba	18,65 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05)

O radical superóxido e os seus derivados, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, são os principais causadores de danos oxidativos aos componentes celulares (MITTLER, 2002). Os radicais superóxidos transformam-se espontaneamente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém a reação é mais

efetiva se for catalisada pelas SODs. Entretanto, a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o  $H_2O_2$  é de fundamental importância, a fim de manter normal a quantidade de ROS nas células (VALKO et al., 2006). Dessa forma, a ação das dismutases do superóxido constitui-se na primeira defesa das plantas contra o estresse oxidativo, o que reforça a idéia de que a maior atividade dessas enzimas é importante característica de tolerância (APEL & HIRT, 2004).

O aumento na atividade de SOD com elevação da concentração de As no meio foi observado em *Pteris vittata* (CAO et al., 2004), em *Holcus lantus* (HARTLEY-WHITAKER et al., 2001), em *Lycopersicon esculentum* e em *Zea mays* (MITEVA & PEYCHEVA, 1999). Assim como nestas espécies, no presente trabalho, observa-se aumento na atividade de SOD após exposição ao As. Na maior concentração de As, entretanto, o efeito tóxico do As superou a atuação desta enzima, resultando, possivelmente, em estresse oxidativo.

Plantas submetidas a outros agentes tóxicos têm apresentado atividade de SOD análogas às desse estudo. *Hordeum vulgare* teve aumentos na atividade de SOD com a elevação da concentração de cádmio no meio (TIRYAKIOGLU et al., 2006), enquanto que *Ceratophyllum demersum* exibiu aumento da atividade quando exposta a elevadas concentrações de chumbo (MISHRA et al., 2006), ambas sofrendo diminuições em concentrações ainda maiores.

### **3.2 Efeito do As sobre a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

A atividade da CAT com o aumento da dose de As aplicada, independente da inoculação ou não dos isolados de FMAs (Tabela 3). A inoculação de *Leucaena leucocephala* aumenta a atividade da CAT, sendo este efeito diferenciado em função do tipo de espécie/isolado (Tabela 3).

Na dose de 75 mg dm<sup>-3</sup> de As, a atividade da CAT em *L. leucocephala* inoculada com Mix de FMAs foi significativamente maior que as demais inoculações, seguido de Mix Paracatu e *Glomus clarum* (Tabela 3).

Tabela 3 Atividade da catalase em *Leucaena leucocephala* inoculada com diferentes isolados de FMAs submetida a diferentes doses de As em Neossolo Quartzarênico.

Tratamento de inoculação	Atividade de CAT ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ )		
	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	10,17 Cd	17,12 Bd	20,15 Af
<i>Acaulospora morrowiae</i>	11,15 Cd	20,56 Bc	26,80 Ad
<i>Gigaspora albida</i>	11,69 Cc	19,87 Bc	23,27 Ae
<i>Glomus clarum</i>	16,80 Cb	24,19 Bb	32,67 Ac
Mix Paracatu	16,64 Cb	25,22 Bb	37,26 Ab
Mix de FMAs	20,43 Ca	37,72 Ba	41,31 Aa

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05)

A catalase é uma enzima antioxidante que é produzida por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados (SAIRAM et al., 1998). Cao et al. (2004), trabalhando com *Pteris vittata* submetidas a cinco diferentes concentrações de As, obtiveram resultados semelhantes aos observados neste estudo. A atividade da CAT sofreu aumentos apenas em altas concentrações, sendo sua atividade diminuída em menores concentrações do metalóide, analogamente aos resultados obtidos em milho submetido ao As (MYLONA et al., 1998). A inoculação dos diferentes FMAs também aumentou a atividade de CAT, sendo que os resultados do presente trabalho corroboram os de Farshiam et al. (2007) e de Latef (2011).

Latef (2011), trabalhando com pimenta inoculada com *Glomus mossae* e submetida a diferentes doses de Cu, concluiu que a simbiose se manteve eficiente, possibilitando o crescimento das plantas e reduzindo o estresse oxidativo ou aumentando a capacidade antioxidante. Em outro estudo sobre o

efeito da simbiose na atividade de enzimas antioxidantes, Farshiam et al. (2007) verificaram que a taxa de colonização micorrízica foi menor devido à exposição a Zn, porém os resultados obtidos mostraram que a simbiose é capaz de aumentar a tolerância ao estresse oxidativo.

Vários fatores podem afetar a atividade desta enzima, como o agente tóxico estressante, sua concentração, o tempo de exposição e a espécie vegetal, o que, de certa forma, pode fazer com que a atividade dessa enzima sofra grandes variações (PEREIRA et al., 2010). Tais observações ficam evidentes em diversos trabalhos, como o de Mishra et al. (2006), aonde foi observado aumento da atividade da catalase quando *Ceratophyllum demersum* foi exposta ao Pb. Entretanto, contrariamente, Tiryakioglu et al. (2006) não observaram variações na atividade de CAT ao expor *Hordeum vulgare* a diferentes concentrações de cádmio.

### **3.3 Efeito do As sobre a atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.1)**

De modo geral, foi observado que a exposição das plantas ao As resultou em aumento nas atividades de APX, embora tenham existido diferenças no padrão de resposta apresentado pelas espécies de FMAs inoculadas (Tabela 4). Nos tratamentos não inoculado e inoculado com Mix de FMAs, não ocorreram diferenças significativas nas doses de 35 e 75 mg dm<sup>-3</sup> de As. Os isolados de FMAs *G. clarum*, Mix de FMAs e Mix Paracatu apresentaram atividades de APX significativamente superiores aos demais isolados em qualquer doses de As (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade da peroxidase do ascorbato em *Leucaena leucocephala* inoculada com diferentes isolados de FMAs submetida a diferentes doses de As em Neossolo Quartzarênico.

Tratamento de inoculação	Atividade de APX ( $\mu\text{mol de ácido ascórbico min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$ )		
	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	1,51 Bc	3,62 Ad	4,98 Ae
<i>Acaulospora morrowiae</i>	1,56 Cc	4,42 Bc	7,14 Ad
<i>Gigaspora albida</i>	1,80 Cb	5,31 Bb	8,73 Ad
<i>Glomus clarum</i>	2,91 Ca	9,03 Ba	16,17 Aa
Mix Paracatu	2,55 Cb	6,79 Bb	10,17 Ac
Mix de FMAs	3,54 Ba	10,56 Aa	11,13 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott,  $P < 0,05$ )

As peroxidases do ascorbato agem contra os intermediários reativos de oxigênio, degradando o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mas, diferentemente de outras enzimas, a APX requer ascorbato e depende de um sistema de regeneração de glutatona reduzida, o ciclo ascorbato-glutatona (NOCTOR & FOYER, 1998). Os ROS formados durante o estresse oxidativo causado por elementos-traço parecem inibir diretamente a síntese de enzimas antioxidantes e também da rota da glutatona (PAWLIK-SKOWRONSKA et al., 2004). Entretanto, o incremento na atividade de APX nos tratamentos com adição de As nas plantas inoculadas com FMAs sugere um aumento na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com consequente aumento na atividade da GR podendo estar relacionado com a manutenção dos níveis de redução da glutatona intracelular necessária para a biossíntese de fitoquelatinas (GOMES-JUNIOR et al., 2006).

Dada a 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 (MISHARA et al., 2006; MOLLER et al., 2007). Como observado para *L. leucocephala* inoculada com *G. clarum* neste

trabalho, *Pteris vittata* submetida a diferentes concentrações de As (CAO et al., 2004) apresentou incremento na atividade de APX, mas em concentrações maiores a atividade dessa enzima foi diminuída, sugerindo que também nesta espécie os efeitos tóxicos do As superaram a atuação deste mecanismo antioxidante.

### 3.4 Efeito do As sobre a atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

Somente na atividade de GR em *L. leucocephala* inoculada com *G. clarum*, foi sempre superior àquela observada em outros isolados de FMAs. A atividade da enzima aumentou com a dose de As, atingindo maiores valores em torno de 1,0  $\mu\text{mol}$  de glutatona  $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  MF (Tabela 5).

Tabela 5 Atividade da glutatona em *Leucaena leucocephala* inoculada com diferentes isolados de FMAs submetida a diferentes doses de As em Neossolo Quartzarênico.

Tratamento de inoculação	Atividade de GR		
	( $\mu\text{mol}$ de glutatona $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ MF)		
	0	35	75
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		
Não inoculado	0,02 Ce	0,12 Bd	0,25 Ae
<i>Acaulospora morrowiae</i>	0,16 Cc	0,30 Bb	0,44 Ad
<i>Gigaspora albida</i>	0,35 Ba	0,52 Aa	0,53 Ac
<i>Glomus clarum</i>	0,35 Ca	0,66 Ba	1,35 Aa
Mix Paracatu	0,09 Cd	0,17 Bc	0,32 Ad
Mix de FMAs	0,19 Cb	0,52 Ba	0,81 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na mesma linha comparando doses e minúsculas na coluna comparando os diferentes isolados de FMAs, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott,  $P < 0,05$ )

Em *Lycopersicon esculentum* (DONG & ZHANG, 2006), *Sesbania drummondii* (ISRAR et al., 2006), *Dermatocarpon luridum* (MOLLER et al., 2007) e *Ceratophyllum demersum* (MISHRA et al., 2006) a atividade de GR também aumentou sob estresse oxidativo. Essa enzima participa do ciclo

ascorbato-glutationa, regenerando glutaciona reduzida, utilizando o NADPH como agente redutor. Sua participação nesse ciclo é imprescindível para a manutenção da homeostase celular durante o estresse causado por ROS (NOCTOR & FOYER, 1998). Assim, como as outras enzimas antioxidantes, a GR teve sua atividade aumentada em altas doses de As, sugerindo que esta enzima também pode apresentar susceptibilidade aos efeitos tóxicos de As em maiores concentrações. Reduções na atividade de GR também foram observadas em outros organismos quando expostos a altas concentrações de As (BHATTACHARYA & BHATTACHARYA, 2006).

No presente estudo, a adição de As em plantas de *L. leucocephala* resultou no incremento na atividade enzimática da SOD, CAT, APX e GR, indicando uma manifestação inicial de defesa antioxidante (MARQUEZ-GARCIA & CORDOBA, 2010). A inoculação com FMAs teve múltiplos efeitos benéficos no crescimento de *L. leucocephala*.

#### 4 CONCLUSÃO

A presença de arsênio em altas concentrações no solo promoverá o aumento na atividade enzimática da SOD, CAT, APX e GR em plantas de *Leucaena leucocephala* indicando uma manifestação inicial de defesa antioxidante.

A atividade de GR em *Leucaena leucocephala* inoculada com *Glomus clarum*, foi sempre superior aqueles observados em outros isolados de FMAs.

O isolado *Glomus clarum* foi mais eficiente em proteger o sistema oxidativo da *Leucaena leucocephala* cultivada em altas doses de arsênio no solo.

A inoculação com FMAs de maneira geral, proporciona um maior crescimento e melhor nutrição em plantas de *Leucaena leucocephala* o que aumenta a capacidade antioxidante quando submetidas a contaminação com arsênio.

## REFERÊNCIAS

ALDRICH, M.V. et al. Examination of arsenic (III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis spp.*) using X-ray absorption spectroscopy. **Science of the total Environment**, v. 379, n. 2-3, p. 249-255, July 2007.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedling. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, June 2004.

BARRETO, A.C. FERNANDES, M.F. Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1287-1293, Oct. 2001.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, Nov. 1971.

BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Induction of stress by arsenic in *Clarus batrachus*: involvement of peroxisomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p. 66, n. 2, p. 178-187, Feb. 2007.

BOULARBAH, A. et al. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. **Chemosphere**, v. 63, n. 5, p. 811-817, May. 2006.

CAO, X.; MA, L.Q.; TU, C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 128, n. 3, p. 317-325, Feb. 2004.

CARLBERG, C.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: MEISTER, A. (ed.), **Methods in Enzymology**, p. 488-495. New York, Academic Press. 1985.

CLEMENS, S. Evolution and function of phytochelatase synthases. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 319-332, Feb. 2006.

DONG, R. et al. Molecular cloning and characterization of a phytochelatase synthase gene, PvPCS1, from *Pteris vittata* L. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 11-12, p. 527-533, Nov.- Dec. 2006.

FARSHIAN, S.; KHARA, J.; MALEKZADEH, P. Effect of arbuscular mycorrhizal (*G. etunicatum*) Fungus on antioxidant enzymes activity under Zinc toxicity in *Lettuce* plants. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 1865-1869, Nov. 2007.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. Programas e Resumos... São Carlos, SP: UFSCar, 2000. P.235.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n.2, p. 309-314, Feb. 1977.

GOMES-JUNIOR, R. A. et al. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 44, n. 5-6, p. 420-429, May-June 2006.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; MEHARG, A.A. Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lantus* L., clones with differential sensitivity. **Plant Cell and Environmental**. v. 24, n. 7, p. 713-722, July 2001.

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

ISRAR, M. et al. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 591-598, Oct. 2006.

JEMIOLA-RZEMINSKA, M. et al. Interaction of arsenic compounds with model phospholipid membranes. **Thermochimica Acta**, v. 458, n. 1-2, p. 132-137, June 2007.

KATSNELSON, A. Microbe gets toxic response: Researchers question the science behind last week's revelation of arsenic-based life. **Nature**, v. 468, p. 741, Dec. 2010.

KITCHIN, K.T.; AHMAD, S. Oxidative stress as a possible mode of action of arsenic carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 137, n. 1-2, p. 3-13, Jan. 2003.

LATEF, A.A.H.A. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper. **Mycorrhiza**, DOI 10.1007/s00572-010-0360-0, Jan. 2011 (*in press*).

LINS, C.E.L. et al. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit., in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n.3, p. 181-185, Mar. 2006.

MARQUES-GARCIA, B.; CORDOBA, F. Antioxidant system in wild populations of *Erica andevalensis*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 58-65, Mar. 2010.

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

MISHRA, S. et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**. v. 65, n. 6, p. 1027-1039, Nov. 2006.

MITEVA, E.; PEYCHEVA, S. Arsenic accumulation and effect on peroxidase activity in green bean and tomatoes. **Bulgarian Journal of Agriculture Science**, v. 5, n. 5, p. 737-740, May. 1999.

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

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N.; SCANDALIOS, J.G. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 576-585, Set. 1998.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, June 2007.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, June 1998.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

PEREIRA, F. J. et al. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes em milho "Saracura". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 450-456, Mai. 2010.

PAIVOKÉ, A.E.A.; SIMOLA, L.K. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicology and environmental Safety**, v. 49, p. 111-121, 2001.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B. et al. Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 201-212, Dec. 2004.

PEIXOTO, P.H.P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, Aug. 1999.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86-92, Jan. 2002.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SAXENA, D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. **Biologia Plantarum**, v. 41, n. 3, p. 387-394, Mar. 1998.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B; MAZUR, N. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, p.419-432.

SCHMOGER, M.E.V.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, v. 122, p. 793-802, Mar. 2000.

TAPIO, S.; GROSCHE, B. Arsenic in the aetiology of cancer. **Mutation Research**, v. 612, n. 3, p. 215-246, June 2006

TIRYAKIOGLU, M. et al. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. **Journal of Trace in Medicine and Biology**, v. 20, n. 3, p. 181-189, Sept. 2006.

USEPA, UNITED STATES ENVIROMENMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3ed. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2008.

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

WOLFE-SIMON, F. et al. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. **Scienceexpress**. P.1-9, Dec. 2010.

WONG, M.H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 775-780, Feb. 2003.

ZHANG, W. et al. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p.337-345, Oct. 2004.

## CAPÍTULO 5

### ASPECTOS ANATÔMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Leucaena leucocephala* INOCULADA COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO CONTAMINADO COM ARSÊNIO

#### RESUMO

O arsênio (As) é um metalóide, com características tóxicas e carcinogênicas, encontrado basicamente em todos os ambientes. Diversos estudos evidenciam a possível aplicação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em práticas de remediação, porém ainda existem poucas informações disponíveis sobre o potencial dos FMAs em aumentar a tolerância das plantas ao As, bem como a respeito dos mecanismos envolvidos nesse processo de desintoxicação de ambientes contaminados com As. Um estudo anatômico e ultraestrutural analisou alguns aspectos dessa associação simbiótica bem como possíveis efeitos associados a fitoproteção da parte aérea e raízes de *Leucaena leucocephala* em solo contaminado com As. Para isso, foi realizado um experimento em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da UFLA, utilizando-se três isolados de FMAs de solos não contaminados e três isolados provenientes de áreas contaminadas com As, em Paracatu (MG). Como substrato, utilizou-se um Neossolo Quartzarênico (RQ), o qual foi contaminado com  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas doses de 35 e 75  $\text{mg dm}^{-3}$  de As. Após 147 dias de cultivo as raízes e a parte aérea das plantas foram coletadas. Os resultados evidenciaram danos em todos os tratamentos, tendo os danos se agravado gradualmente, com o aumento da dose de As no solo. Observaram-se alterações ultraestruturais nas folhas de *L. leucocephala*, tais como, degradação de cloroplastos, vesículas e apoptoses celulares, principalmente com a adição de 75  $\text{mg dm}^{-3}$  de As. Nas raízes, foi evidente o aumento do adensamento das células corticais, desintegração do tecido parenquimático e acúmulo de substâncias fenólicas, acompanhado de desestruturação celular e empilhamento de paredes das células radiculares, principalmente no xilema secundário.

Palavras-chave: Micorrizas. Fitoproteção. Microscopia de Luz. Microscopia eletrônica.

## ABSTRACT

Arsenic (As) is a toxic and carcinogenic element that has caused severe environmental and health problems worldwide. Arsenic (As) is an ubiquitous trace metalloid found in all environmental media. Many studies demonstrate the potential application of mycorrhizal fungi (AMF) in remediation practices, but there is little information available about the potential of AMF to enhance plant tolerance to As and the mechanisms involved in this process of detoxification of environments contaminated with As. An anatomical and ultra-structural study examined aspects of this symbiotic association and some characteristics of shoots and roots of *Leucaena leucocephala* in As-contaminated soils. For this, an experiment was conducted in a greenhouse at the Department of Soil Science at Federal University of Lavras UFLA using three AMF isolates from uncontaminated soils and three isolates from areas contaminated with arsenic. The soil (PSAMENT) was contaminated with  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at the doses of 35 and 75 mg of As  $\text{dm}^{-3}$  of soil. After 147 days, the roots and shoots of plants were collected. The results showed damage in all treatments, but the damage had worsened gradually with increasing the dose of As in the soil. We observed ultra-structural changes in leaves of *L. leucocephala*, such as degradation of chloroplasts, vesicles, and cellular apoptosis, especially with the addition of 75 mg  $\text{dm}^{-3}$  of As. In roots, there was an increased density of cortical cells, disintegration of the parenchyma and accumulation of phenolic substances, followed by cell disruption and stacking of the root cell walls, especially in the secondary xylem.

Keywords: Mycorrhizae. Phytoprotection. Light microscopy. Electron microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento de atividades industriais e de mineração tem alterado o ciclo geoquímico e a liberação de arsênio (As) na biosfera. Estudos em locais próximos a complexos industriais e de refino de minério indicam concentrações elevadas de As no solo, as quais podem afetar a produtividade, biodiversidade e sustentabilidade dos ecossistemas, induzindo danos muitas vezes irreversíveis do equilíbrio biológico. O As é um elemento tóxico encontrado em vários minérios e rejeitos, processados na indústria mineral, especialmente na extração de ouro. Alterações de ordem físico-químicas em áreas de mineração podem desestabilizar o As contido nos minérios, permitindo seu transporte para os diferentes compartimentos ambientais, o que se constitui num risco potencial à saúde humana (VEADO et al., 2000).

No Brasil, a legislação ambiental exige que áreas degradadas devam ser recuperadas, mas apesar da exigência legal, a recuperação de substratos remanescentes de mineração pode ser uma tarefa difícil. A presença de As e metais em concentrações que comprometem o estabelecimento de plantas e colocam em risco corpos d'água mostra-se como um sério complicador do processo de recuperação ambiental.

O arsênio, mesmo não sendo um elemento essencial, é absorvido pelas plantas e, em altas concentrações, pode interferir em processos metabólicos, inibindo o crescimento da vegetação, podendo levá-la à morte. O acúmulo de arsênio em tecidos vegetais varia com a sua disponibilidade e com o metabolismo da planta, que está diretamente relacionado a mecanismos de tolerância (ZHAO et al., 2009).

Várias técnicas têm sido utilizadas visando a reabilitação de áreas contaminadas com As, porém a mais vantajosa é a fitorremediação, que consiste no uso de plantas e sua microbiota associada para absorver, transformar e

remover poluentes do solo (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Esta técnica tem sido utilizada sem, no entanto, dispensar maiores cuidados aos fatores que afetam a atividade dos microrganismos do solo, especialmente daqueles envolvidos na transformação dos poluentes ou na absorção destes pelas plantas remediadoras. Entre estes, e de interesse particular, estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que atuam ampliando o sistema radicular das plantas, facilitando a absorção de água e nutrientes, favorecendo assim o estabelecimento das plantas no solo e a ação filtrante e purificadora do solo (SAFIR et al., 1990).

Estudos realizados em todo o mundo têm demonstrado o papel crucial das simbioses micorrízicas na proteção das plantas ao excesso de elementos-traço por meio de vários efeitos nutricionais e não-nutricionais que contribuem para o aumento da tolerância das plantas a estes elementos (CARNEIRO et al., 2002; KLAUBERG-FILHO et al., 2005; SILVA et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2007; SOARES & SIQUEIRA, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar aspectos anatômicos e ultraestruturais da parte aérea e raízes de *Leucaena leucocephala* inoculadas com FMAs e a contribuição destes para a proteção das plantas e para o estabelecimento de cobertura vegetal em áreas contaminadas com As.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um experimento em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo – DCS da Universidade Federal de Lavras – UFLA, no período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010, utilizando-se três isolados de FMAs de solos não contaminados provenientes da coleção da UFLA (*Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum* e *Gigaspora albida*), um inóculo misto proveniente da mistura desses três isolados (Mix de FMAs) e um inóculo misto de três isolados provenientes de áreas contaminadas com As em Paracatu-

MG (*Acaulospora morrowiae*, *Glomus clarum* e *Paraglomus occultum*). Como substrato, utilizou-se um Neossolo Quartzarênico (RQ), o qual foi contaminado com  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nas doses de 35 e 75  $\text{mg dm}^{-3}$  de As.

Após 147 dias de cultivo uma avaliação anatômica e ultraestrutural na parte aérea e raízes de *Leucaena leucocephala* foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural-LME, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-UFLA. Para essas avaliações raízes e folhas das plantas de *L. leucocephala* foram coletadas. Foram selecionadas folhas (pecíolo e folíolos) com sintomas de fitotoxidez com As e, ou, quarta folha da planta de *L. leucocephala* por repetição. As raízes foram lavadas em água corrente para completa remoção do solo, e em seguida, uma amostra de raízes secundárias (cerca de 4 cm) por repetição foi acondicionada em ependorf contendo uma solução Karnovsky modificada pH 7,2, sendo, posteriormente, armazenadas em câmara fria. Amostras de raízes e folhas permaneceram em solução Karnovsky modificada pH 7,2, em câmara fria (4°C), até a realização das análises.

## **2.1 Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi instalado em delineamento totalmente casualizado, em esquema fatorial 3 x 6, utilizando-se três doses de As e seis tratamentos com inoculação de FMAs, com três repetições, totalizando 54 parcelas. Para avaliação anatômica e ultraestrutural foi selecionada uma repetição de cada tratamento.

## 2.2 Avaliações anatômicas e análises ultraestruturais

Raízes e folhas de *Leucaena leucocephala* inoculadas com diferentes isolados de FMAs foram fixadas em Karnovsky. Foram realizados cortes transversais em micrótomo de mesa (LEICA MT-ULTRACUT), do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestruturais (LME) da UFLA. As secções transversais foram coradas com azul de toluidina, pH 4,0 (O'BRIN & MCCULLY, 1981) e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se Permount (Fisher Scientific) como meio de montagem. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX-60 acoplado a uma câmera digital Canon Poxer Shot A620.

## 2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de raízes secundárias e folhas fixadas em solução Karnovisky modificada a pH 7,2 foram transferidas para glicerol 30% (30 min) e foram efetuados os cortes transversais em nitrogênio líquido de segmentos de aproximadamente 2 mm. Os fragmentos foram lavados em água destilada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 1-2 horas, para posterior desidratação em gradiente crescente de acetona (25, 50, 70, 90 por 10 minutos e três vezes por 10 minutos em 100%). Em seguida, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico. Os fragmentos foram montados em suportes de alumínio (*stubs*), com fita de carbono duplface colocada sobre uma película de papel alumínio, procedendo-se, a seguir, ao processo de metalização com ouro. Em seguida, realizou-se a observação em alto vácuo com microscópio eletrônico de varredura modelo LEO Evo 40.

## 2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Para estudos da ultraestrutura celular das raízes e folhas de *L. leucocephala*, as amostras fixadas em solução Karnovsky modificada pH 7,2 foram lavadas em tampão cacodilato, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 4 horas, à temperatura ambiente, em uma capela. Em seguida, lavadas com água destilada por duas vezes (15 min), transferidas para solução a 0,5% de acetato de uranila durante 12 h a 4°C e em seguida, lavadas novamente em água destilada e desidratados em gradiente crescente de acetona (25, 50, 70, 90 e 100% por três vezes). Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30% (8 h), 70% (12 h) e 100% duas vezes por 24 h cada, sendo os espécimes montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 48 h.

Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo LEICA MT-ULTRACUT, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestruturais (LME) da UFLA, e coletados em telas de cobre de 200 mesh. A contrastação foi realizada tratando-se os cortes com solução aquosa de acetato de uranila 2% por 3 min. A seguir, os cortes foram lavados em água destilada deionizada e logo após, foram tratados com citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> por 3 min. A seguir, os cortes foram lavados em água destilada deionizada e postos para secar em raques especiais para as telinhas.

Após 24 h, as telas foram levadas para a observação em microscópio eletrônico de transmissão (MET), marca Zeiss, modelo EM 109 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **3.1 Análises ultraestruturais das folhas *Leucaena leucocephala***

Na Figura 1 pode ser observada a secção transversal da folha de *L. leucocephala*. Notam-se porções do parênquima paliçádico (acima) e do parênquima esponjoso (abaixo). Embora o parênquima paliçádico pareça mais compacto do que o parênquima esponjoso, a maior parte das paredes verticais das células em paliçada fica exposta aos espaços intercelulares, e a superfície dessas células é maior do que a do parênquima esponjoso (Figura 1A). De forma geral, com auxílio da microscopia eletrônica de varredura não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Observou-se um maior número de grãos de amiloplastos no parênquima paliçádico (Figura 1A, B e C).

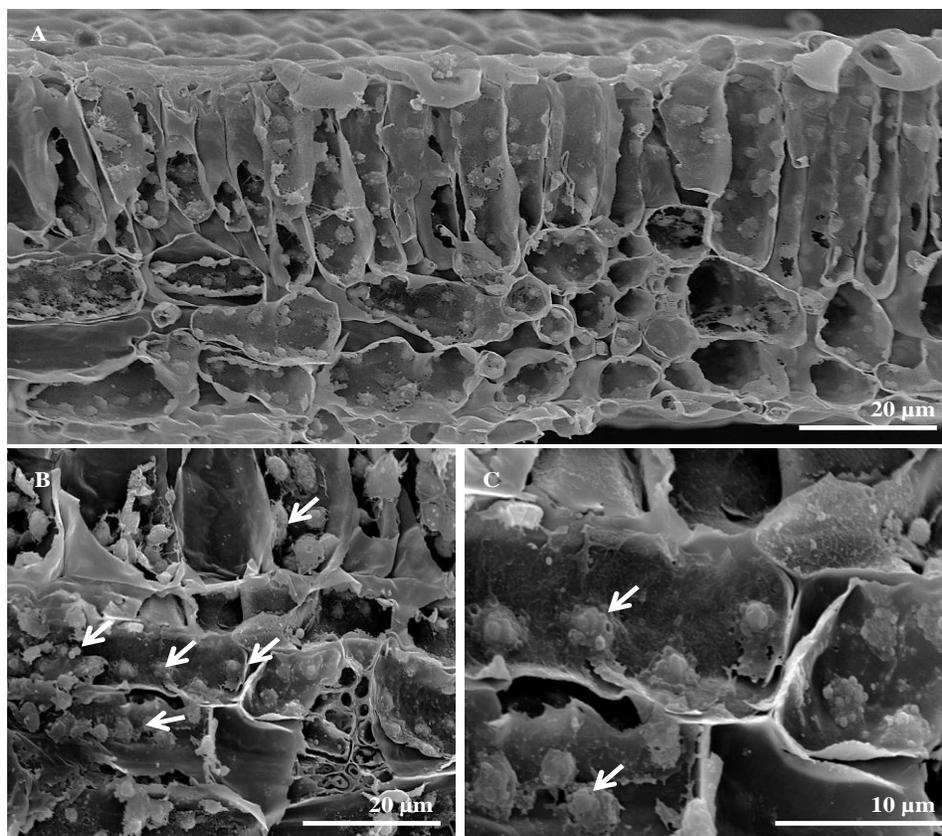


Figura 1 Eletromicrografia de varredura da folha de *Leucaena leucocephala*. A) Secção transversal da folha no tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com Mix de FMAs. B) Amiloplastos distribuídos no parênquima esponjoso (setas) no tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com Mix de FMAs. C) Amiloplastos (setas).

Entretanto, no tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculadas com *Glomus clarum* observaram-se estruturas diferenciadas nos espaços intracelulares nas células do parênquima esponjoso (Figura 2C e D). Além da presença dessas estruturas diferenciadas, é possível notar uma diferença na estrutura e arranjo dos amiloplastos (Figura 2A e B).

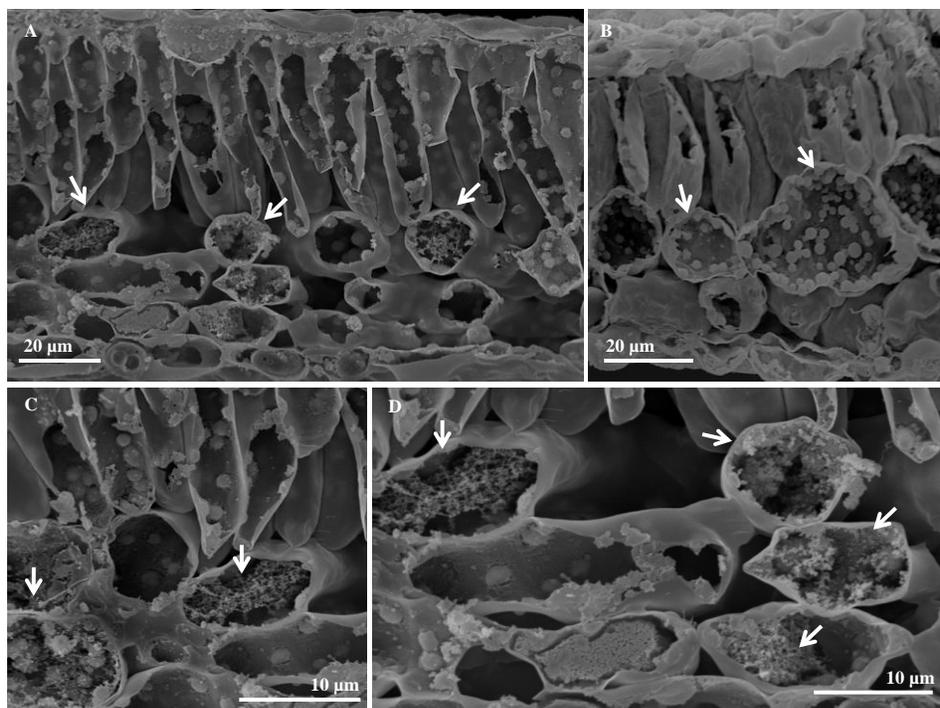


Figura 2 Eletromicrografia da folha de *Leucaena leucocephala*. A) Seção transversa da folha de *L. leucocephala* no tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com *Glomus clarum*. Setas indicam estruturas diferenciadas distribuídas no lúmen celular da folha. B) Amiloplastos no parênquima esponjoso (setas) no tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com *Glomus clarum*. C e D) Estruturas diferenciadas no lúmen das células (setas) no tratamento com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculadas com *G. clarum*.

A análise da ultraestrutura das folhas de *L. leucocephala* pode ser observada na Figura 3. A presença de organelas como cloroplastos com acúmulo de lipídios pode ser observada em todos os tratamentos. Nota-se que nos tratamentos com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, os cloroplastos encontram-se bem desenvolvidos (Figura 3A). Por outro lado, nos tratamentos que receberam  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, pode ser observado um processo de degradação dos cloroplastos, microvesículas e morte das células (Figura 3 B, C e D), sendo estes danos possivelmente atribuídos ao As.

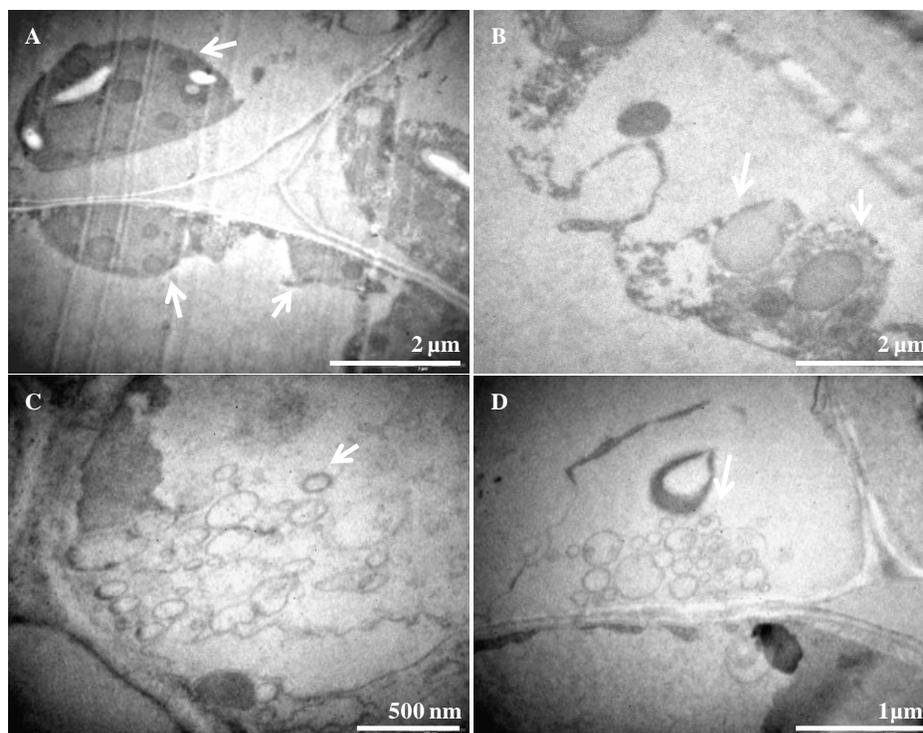


Figura 3 Eletromicrografias de transmissão de folhas de *Leucaena leucocephala*. A) Cloroplastos (setas) no tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As. B) Cloroplastos (setas) no tratamento com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As. C e D) Microvesículas, apoptoses e morte de células (setas) com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As.

Há relatos da interferência do As no processo amilolítico, promovendo queda na atividade das  $\alpha$ -amilases com consequente déficit energético (ABEDIN et al., 2002; LIU et al., 2005). As  $\alpha$ -amilases são enzimas ativadas pelas giberelinas, cuja via metabólica de produção é altamente dependente de compostos fosfatados (ARTECA, 1995). Dessa forma, a disponibilidade destes compostos, se afetada pelo As, pode ocasionar a redução nas taxas de produção desse hormônio, interferindo na ativação das  $\alpha$ -amilases. O As, então, provoca decréscimo da fotossíntese, redução na absorção e no transporte de nutrientes (ZHAO et al., 2009), danos às membranas, distúrbios hormonais e alteração na

atividade de várias enzimas (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1992), resultando em eventual morte das plantas. Já no estelo, este elemento segue essencialmente via xilema e, em suas relações com as células vizinhas, podem induzir alterações na diferenciação do próprio sistema vascular, uma vez que, em concentrações menores, alcançam as folhas, podendo alterar a estrutura e a funcionalidade das células fotossintéticas (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1992; ARIAS et al., 2010).

### 3.2 Análises ultraestruturais em raízes *Leucaena leucocephala*

Após o período de exposição ao As, verificou-se a ocorrência de alterações anatômicas, principalmente nas raízes de *Leucaena leucocephala*, em todas as doses de As utilizadas, tendo os danos se agravado gradualmente, com o aumento da dose de As no solo (Figura 4). No tratamento com a adição de 35 mg dm<sup>-3</sup> de As, as células epidérmicas, assim como as células parenquimáticas mais externas do córtex, adquiriram aspecto colapsado e formato achatado. As células das camadas mais internas do córtex apresentaram paredes ligeiramente sinuosas (Figura 4 B e B'). No tratamento com 75 mg dm<sup>-3</sup> de As os danos foram mais severos, verificando-se a desintegração do tecido parenquimático e na região do cilindro vascular da raiz, ocorrendo redução dessa região e um adensamento das células corticais, ressaltando-se que esse efeito foi marcante no tratamento com 75 mg dm<sup>-3</sup> de As no solo (Figura 4C e C').

Nota-se ainda que nos tratamentos com adição de As, existe um acúmulo de substâncias, coradas pelo azul de toluidina, podendo ser acúmulo de compostos fenólicos, principalmente no xilema secundário, não tendo o mesmo ocorrido no tratamento controle (Figura 4 B, B', C e C').

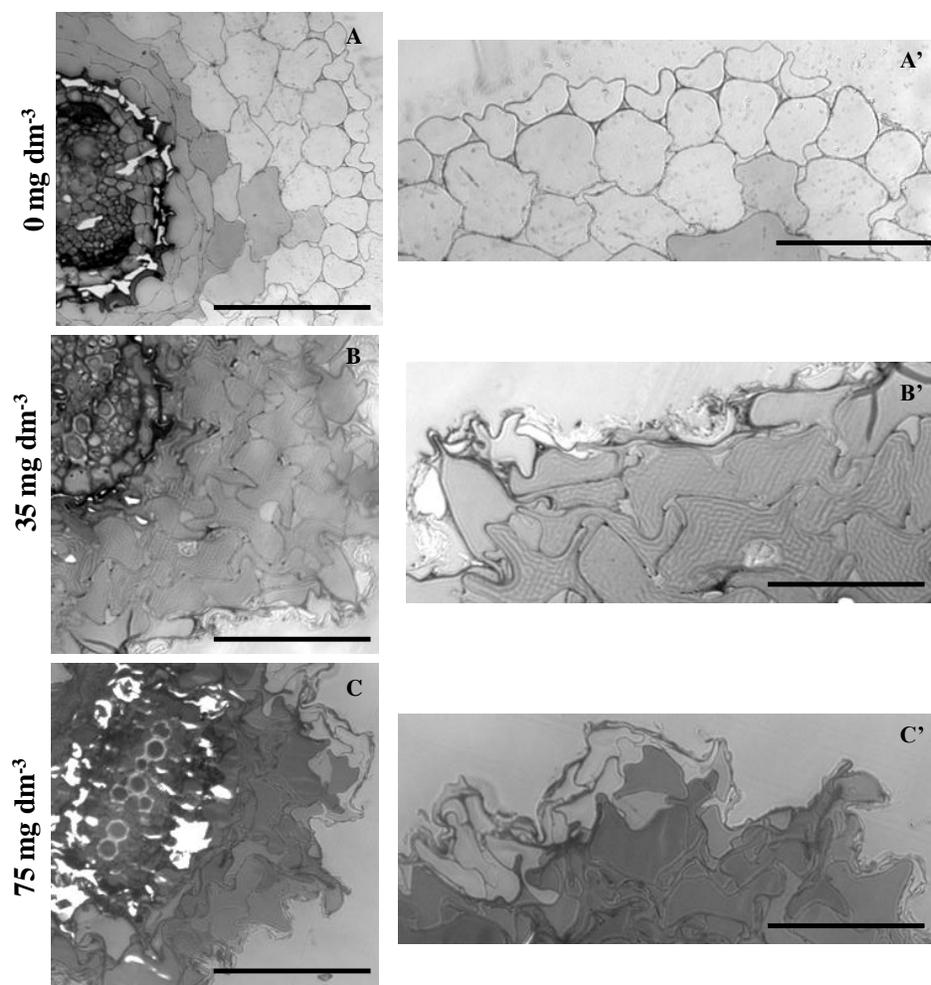


Figura 4 Efeito de doses crescentes de arsênio nas raízes de *L. leucocephala* (Microscopia de luz, coloração com azul de toluidina) A e A') Tratamento controle, sem adição de arsênio; B e B') Perda de turgidez das células parenquimáticas e das camadas mais externas do córtex. Tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As; C e C') Córtex constituído por células colapsadas. Redução do comprimento das células do córtex, que apresentam paredes extremamente sinuosas. Tratamento com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

Os danos proporcionados pela adição de As no solo, também foram evidentes com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 5). Na

Figura 5A, mostra a secção transversal da raiz de *L. leucocephala* no tratamento sem adição de As inoculada com Mix de FMAs, notam-se células da epiderme, córtex e cilindro vascular bem desenvolvidas. A medida que se aumenta as doses de As no solo, verifica-se que os danos são severos tanto nas células da epiderme e córtex com perda de turgidez e colapsadas, reduções do comprimento das células do córtex, que apresentam paredes extremamente sinuosas e desintegração do cilindro vascular (Figura 5B, C e D).

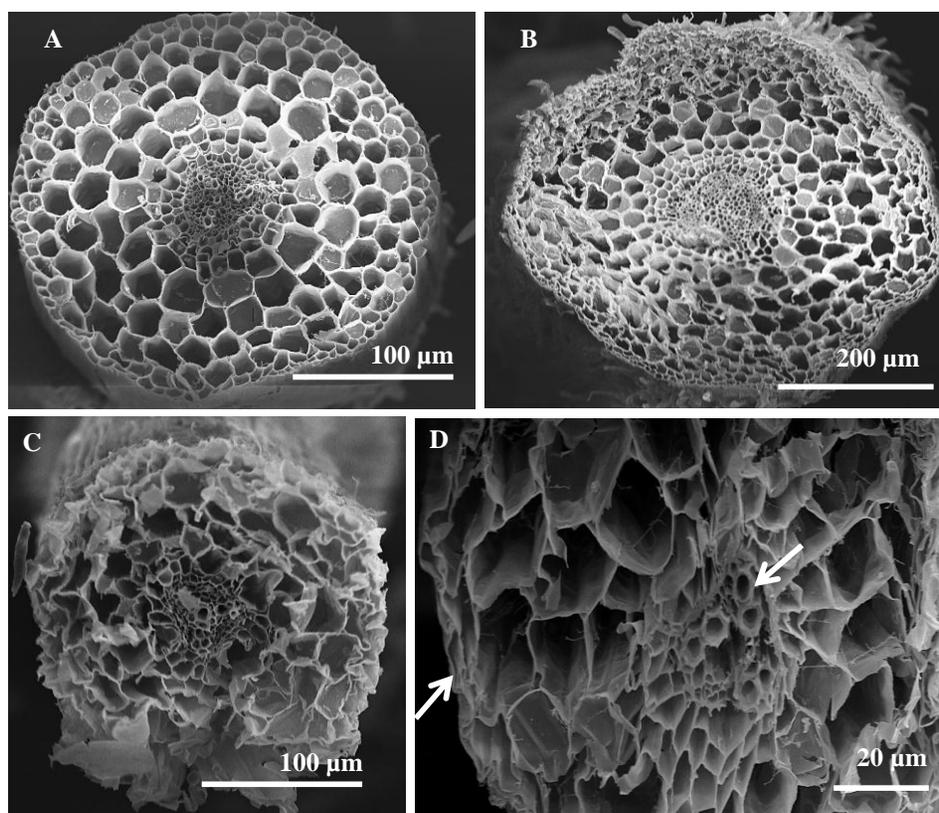


Figura 5 Eletromicrografias de varredura de raízes de *Leucaena leucocephala*. A) Secção transversal de raiz no tratamento sem adição de As inoculada com Mix de FMAs. B) Secção transversal de raiz no tratamento com  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com Mix de FMAs. C e D) Secção transversal de raiz no tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com Mix de FMAs. Setas indicam danos nas células da epiderme e córtex que apresentam paredes extremamente sinuosas e desintegração do cilindro vascular.

Presenças de estruturas fúngicas foram observadas nos espaços inter e intracelulares nas células do córtex radicular (Figura 6). Nota-se a existência de diferença na distribuição e espessura das hifas de FMAs, podem esse fato ser atribuído ao As (Figura 6B, C e D).

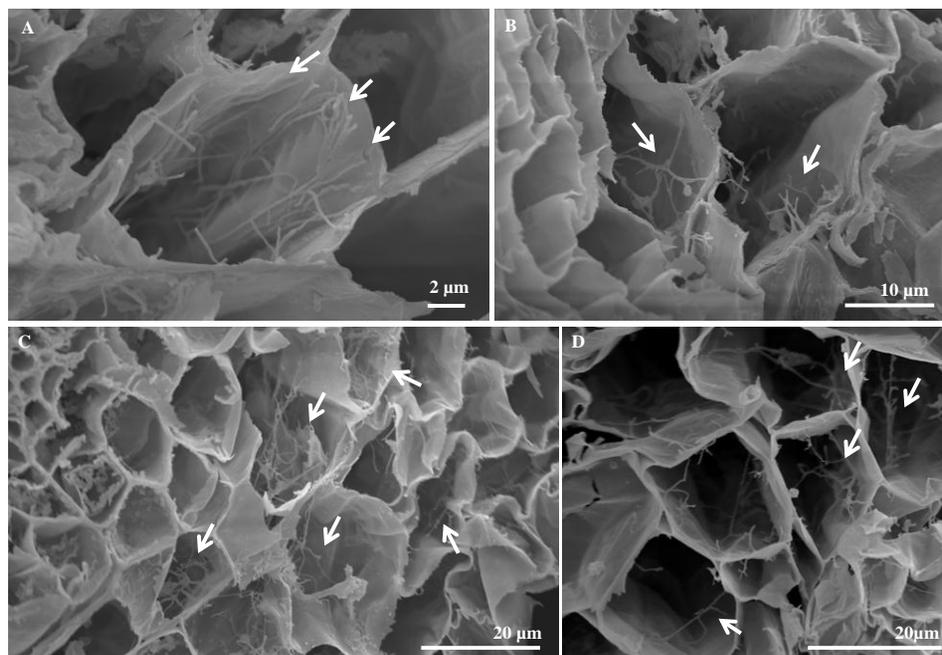


Figura 6 Eletromicrografias de varredura de raízes de *L. leucocephala*. A) Hifas micorrízicas (setas) no tratamento sem adição de As inoculada com *G. clarum*. B) Hifas micorrízicas (setas) no tratamento sem adição de As inoculada com Mix FMAs. C) Hifas micorrízicas (setas) no tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com *G. clarum*. D) Hifas micorrízicas (setas) no tratamento com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com *G. clarum*.

Nos tratamentos com  $35$  e  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As além das estruturas fúngicas foram observadas estruturas diferenciadas nos espaços intracelulares nas células do córtex radicular e a presença de amiloplastídeos. Essas alterações podem ser atribuídas à presença de As, pois o mesmo não foi observado para os tratamentos controle (sem adição de As) (Figura 7 A, B, C e D).

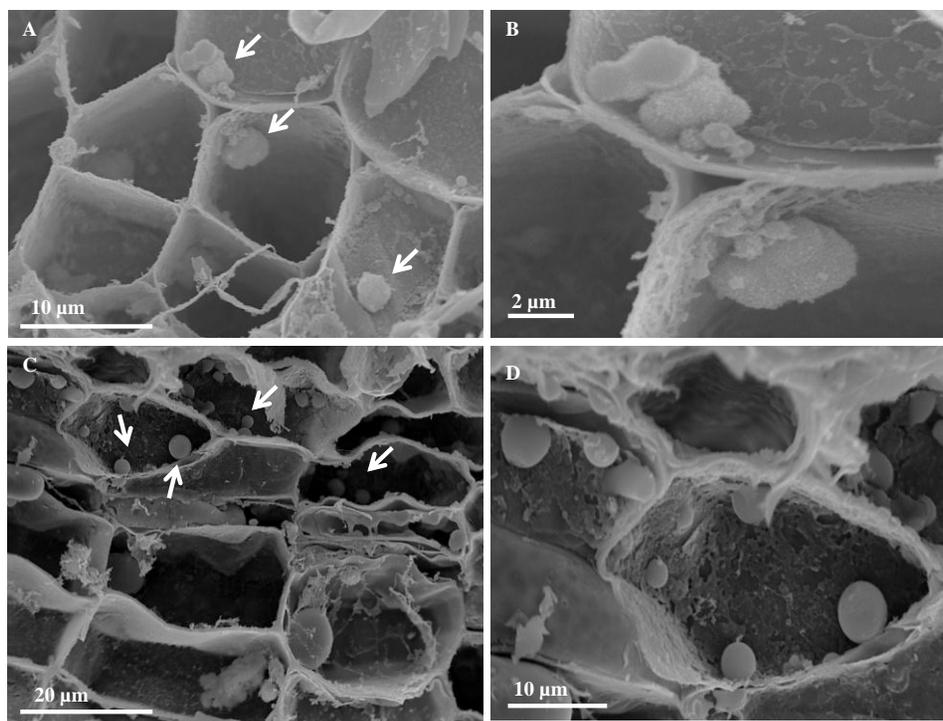


Figura 7 Eletromicrografias de varredura de raízes de *L. leucocephala*. A e B) Estruturas diferenciadas nas células do córtex (setas) no tratamento com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As sem inoculação de FMAs. C e D) Amiloplastídeos (setas) no lúmen da célula no tratamento com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculada com *G. clarum*.

Na análise ultraestrutural das raízes de *L. leucocephala* podem ser observadas estruturas de FMAs (Figura 8A). Nos tratamentos sem adição de As, as paredes celulares mostram-se relativamente delgadas. As organelas mostram-se distribuídas pelo citoplasma de maneira uniforme, ocupando o pequeno espaço entre a membrana do vacúolo e a membrana plasmática (Figura 8A e B).

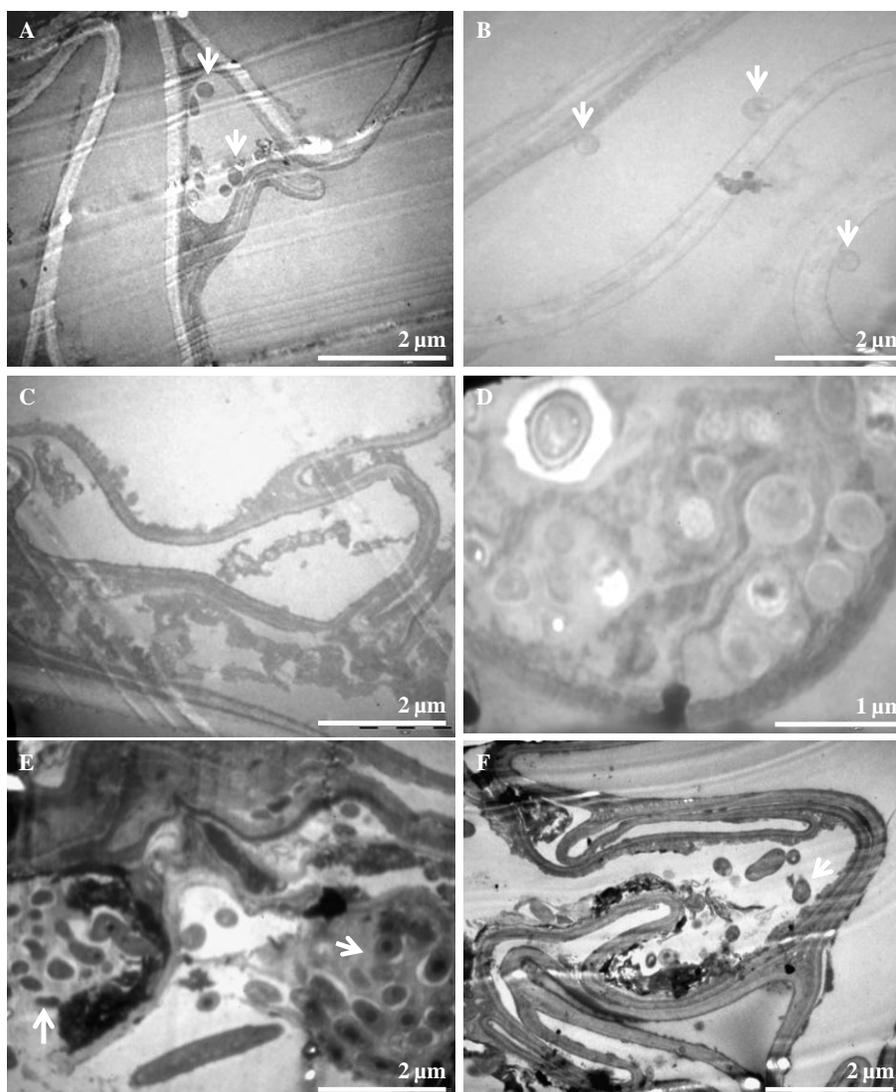


Figura 8 Eletromicrografias de transmissão de raízes de *L. leucocephala* colonizadas por diferentes isolados de FMAs. A) Hifas de *G. clarum* (setas) no tratamento sem adição de As. B) Evaginações da membrana plasmática (setas) sem adição do As. C e D) Compostos fenólicos no parênquima e microvesículas degradadas com adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As. E e F) Desintegração e degradação de vesículas e empilhamento de paredes celulares (setas) com adição de  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As inoculado com Mix FMAs.

Com a adição de  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, foram evidenciadas alterações na estrutura celular; Um considerável aumento no número de vesículas e de grânulos eletrondensos (Figura 8C e D). Verifica-se ainda que, com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, ocorre degradação de vesículas e empilhamento de paredes celulares. Na parede celular, observa-se uma desfibrilação na região voltada para a lamela média. Os espaços periplasmáticos tornaram-se mais evidentes entre a membrana plasmática e a parede celular, que se mostrou toda retorcida, com camadas superpostas de regiões eletrondensas (Figura 8E e F).

Em todos os tratamentos com As ( $35$  e  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As), foram observadas células corticais e epidérmicas com aspecto colapsado, correspondente à perda de turgidez devido à ocorrência de déficit hídrico na raiz, assim como uma aparente redução nos espaços intercelulares, além da degradação de organelas e vesículas. Uma tentativa de se mensurar os espaços intercelulares foi feita, porém, a compactação do córtex, em conjunto com a sinuosidade nas paredes celulares inviabilizou o processo, uma vez que praticamente não foi possível visualizar os espaços, tão característicos do parênquima.

A redução na emissão de raízes laterais nas plantas expostas ao As é um fator que explica, pelo menos em parte, a baixa taxa de absorção de água em função da redução na área de absorção de água e nutrientes. Além disso, é possível que o efeito negativo do As sobre a respiração celular tenha ocasionado uma menor disponibilidade de energia para a raiz, comprometendo a manutenção do potencial hídrico e, conseqüentemente, a absorção de água. Cabe salientar que a absorção de água pela raiz é dependente da existência de um potencial osmótico negativo no interior do órgão em função da absorção de íons, o que envolve gasto de energia (TAIZ & ZEIGER, 1998). Logo, se a disponibilidade energética da raiz é prejudicada pelo As, a absorção de água pode ser afetada, o que explica a perda de turgidez das células do córtex

radicular. O conjunto de células com menor volume em função da perda de turgidez, por sua vez, torna o córtex menos desenvolvido, o que resultou no aumento relativo, na área em secção transversal, do cilindro vascular das raízes expostas ao As, no tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As. Na verdade, o As não proporcionou o aumento do cilindro vascular, mas sim a redução da área ocupada pelo córtex.

O alongamento celular ocorre em função da expansão da célula vegetal, a qual resulta de dois processos físicos independentes: pressão de turgor (dependente da absorção de água de forma eficiente) e produção de parede celular (MCCANN et al., 2001). Aparentemente, estes dois processos foram prejudicados nas raízes das plantas de *L. leucocephala* expostas ao As, levando à redução no alongamento das células corticais. Com relação à expansão da parede celular, ressalta-se que na região mais periférica das raízes, principalmente do tratamento com  $75 \text{ mg dm}^{-3}$  de As, foi possível notar aumento no espessamento das paredes celulares, que se coraram intensamente com o azul de toluidina, indicando alterações. Tais alterações foram confirmadas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Além disso, notou-se o acúmulo de substâncias, possivelmente fenólicas nas células das raízes expostas à concentração máxima de As utilizada, o que possivelmente resultou da mudança da composição da parede celular e, ou, desintegração das mesmas.

O acúmulo de compostos fenólicos é mais um indicativo da sensibilidade de *L. leucocephala* ao As, visto que estas substâncias são componentes dos mecanismos de defesa não-enzimáticos contra fatores causadores de estresse (VAUGHN & DUKE, 1984). Alguns compostos fenólicos podem atuar na interceptação do elemento estressor, ligando-se a este e inibindo sua ação oxidante, ou atuar no reparo, removendo intermediários reativos de oxigênio (MICHALAK, 2006), possivelmente gerados pela presença do As no meio intracelular.

#### 4 CONCLUSÃO

Nas folhas de *L. leucocephala* foram evidenciadas estruturas diferenciadas nos espaços intracelulares nas células do parênquima esponjoso em plantas inoculadas com *Glomus clarum* na maior dose de arsênio estudada. Além disso, foi possível verificar a degradação de cloroplastos, vesículas, apoptoses celular nos tratamentos com máxima dose de As.

A presença de arsênio promoveu alterações anatômicas nas raízes de *Leucaena leucocephala*. Logo, a anatomia vegetal mostrou-se uma importante ferramenta na caracterização da sensibilidade de *L. leucocephala* ao poluente.

Foram observados danos em todas as doses do poluente, tendo os danos se agravado gradualmente, com o aumento da dose de As no solo. Foi evidente o aumento do adensamento das células corticais, desintegração do tecido parenquimático e acúmulo de substâncias fenólicas, principalmente no xilema secundário, não tendo o mesmo ocorrido no tratamento sem adição de arsênio. Ainda foi possível notar a desestruturação celular, empilhamento de paredes e apoptoses nas células radiculares atribuídas à presença de As.

Sugere-se a realização de estudos complementares usando micro-análise com energia de dispersão por raios-X e comprimento de onda dispersivo, visando à elucidação dos mecanismos de resposta de *L. leucocephala* e associações simbióticas em ambientes contaminados com As.

## REFERÊNCIAS

ABEDIN, M.J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A.A. Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1120-1128, Feb. 2002.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. & SCHAEFER, C.E., ed. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 299-352, Jul. 2000.

ARIAS, J.A. et al. Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: Enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 2, p. 139-148, Apr. 2010.

ARTECA, R.N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall. 1995, 332 p.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, v.2, p.345-361, 1992.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p.1629-1638, Nov. 2002.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.85-144, Jul. 2005.

LIU, X. et al. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere**, v. 6, n. 2, p. 293-301, Oct. 2005.

MCCANN, M.C.; ROBERTS, K.; CARPITA, N.C. Plant cell growth and elongation. In: **Encyclopedia of life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons. 2001.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, Mar. 2006.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, vol. 41, n. 12, p. 1749-1757, Dec. 2006.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-306, Dez. 2007.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833-841, Jan. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. **Publishers Sunderland**. 1998, 792 p.

VAUGHN, K.; DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 60, n. 1, p. 106-112, Jan. 1984.

VEADO, M. A. R. V. et al. Analysis of water quality and sediment composition in the Paraopeba and Das Velhas Rivers, Brazil. **Water SA**, Pretoria, v. 26, n. 2, p. 49-254, Apr. 2000.

ZHAO, F.J.; MA, J.F.; MEHARG, A.A.; McGRATH, S.P. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, v. 181, n. 4, p. 777-794, Mar. 2009.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação do solo por elementos-traço acarreta sérias consequências para os componentes funcionais dos ecossistemas, representando um sério risco à qualidade de vida. Atualmente, a legislação ambiental de vários países do mundo, incluindo o Brasil, exige que as áreas degradadas pela contaminação por estes elementos devam ser recuperadas. Quando se pretende estabelecer procedimentos para a remediação destas áreas, devem-se concentrar esforços nos vários aspectos de solo, planta e organismos, os quais são componentes essenciais para a recuperação funcional do solo e a estabilização dos ecossistemas. Dessa forma, para se obter sucesso em programas de revegetação de áreas degradadas por elementos-traço, torna-se necessário o conhecimento da toxicidade dos contaminantes para as espécies vegetais e os mecanismos de tolerância envolvidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da contaminação do solo com arsênio (As) na comunidade e atividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e os efeitos desse isolados fúngicos sobre a *Leucaena leucocephala*, que se trata de uma espécie promissora para a revegetação de áreas degradadas por estes elementos. Os resultados revelam que, apesar do acentuado efeito inibitório da contaminação do solo com As sobre a colonização micorrízica, verificou-se que a inoculação com fungos micorrízicos contribuiu para o crescimento da *L. leucocephala* e reduziu proporcionalmente o estresse antioxidativo, proporcionando defesa antioxidante na parte aérea das plantas. Entretanto, este efeito da micorrização não foi relacionado com o aumento da absorção de P pela *L. leucocephala*, indicando a provável existência de outros mecanismos envolvidos na proteção das plantas micorrizadas ao excesso de As, os quais precisam ser avaliados futuramente. Torna-se importante conhecer a localização e a compartimentalização deste elemento em raízes micorrizadas e

tecidos fúngicos empregando-se técnicas analíticas e de microscopia tais como espectrometria de energia dispersiva de raios-X e, ou, de comprimento de onda dispersivo acoplado ao microscópio de varredura e, ou, microscópio de transmissão. Estudos desta natureza serão de fundamental relevância, visando entender melhor os mecanismos de proteção dos FMAs a elementos-traço para as plantas hospedeiras.

## ANEXOS

Tabela 1 Distribuição do tamanho, média e erro padrão do diâmetro de 20 esporos isolados de FMAs em área de mineração de ouro em Paracatu/MG e de suas respectivas espécies nos sites do INVAM e Blaszkowski.

Isolado	Distribuição de tamanho		
	-----µm-----		
	Paracatu/MG	INVAM	Blaszkowski
<i>Glomeraceae</i> (PIROZ & DALPÉ)			
<i>Glomus clarum</i>	99-198(145±2,99)	100-260(182)	70-150(106)
<i>Glomus intraradices</i>	82-145(103±2,08)	40-140(93,3)	30-120(92)
<i>Glomus minutum</i>	23-55(34±1,19)	-----	18-65(39)
<i>Glomus fasciculatum</i>	65-93(80±1,31)	-----	50-130(105)
<i>Paraglomeraceae</i> (MORTON, J.B. & REDECKER, D.)			
<i>Paraglomus occultum</i>	70-87(75±0,78)	60-100(71,5)	-----
<i>Acaulosporaceae</i> (MORTON, J.B. & BENNY)			
<i>Acaulospora mellea</i>	97-133(120±1,47)	90-140 (120)	98-140(116)
<i>Acaulospora morrowiae</i>	65-87(75±1,03)	60-100(75,6)	70-120(80)
<i>Acaulospora sp#1</i>	71-87(76±1,50)	-----	-----
<i>Acaulospora sp#2</i>	91-139(110±2,30)	-----	-----
<i>Acaulospora spinosa</i>	152-187(162±3,66)	140-220(171,3)	-----
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	91-143(124±0,61)	80-160(120,3)	90-135(120)
<i>Acaulospora tuberculata</i>	137-182( 156±0,89)	120-280(202)	-----
<i>Acaulospora paulinae</i>	71-87(77±1,19)	-----	60-95(72)
<i>Acaulospora excavata</i>	100-165(140±2,33)	-----	-----
<i>Acaulospora colombiana</i>	88-141(113±1,64)	100-140(121)	-----
<i>Gigasporaceae</i> (MORTON, J.B. & BENNY)			
<i>Gigaspora margarita</i>	204-369(254±3,66)	260-400(321)	260-405(357)
<i>Scutellospora pellucida</i>	148-198(176±1,03)	120-240(189)	130-235(195)
<i>Scutellospora fulgida</i>	150-202(180±1,54)	120-240(180)	165-280(229)
<i>Scutellospora heterogama</i>	149-204(182±1,84)	120-200(159)	-----
<i>Scutellospora biornata</i>	270-344(290±2,34)	260-450(360,5)	-----
<i>Scutellospora sp#1</i>	121-202(154±3,44)	-----	-----
<i>Racocetra castanea</i>	165-280(198±5,67)	-----	-----
<i>Racocetra persicae</i>	240-350(290±5,92)	240-360(313)	250-380(320)

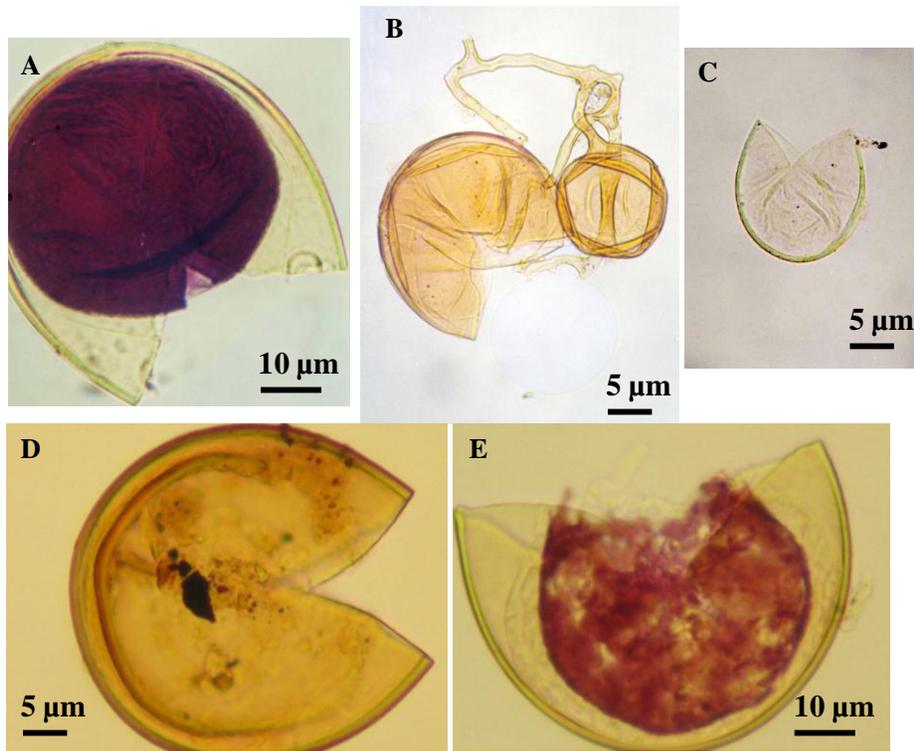


Figura 1 Esporos de fungos micorrízicos arbusculares encontradas nas áreas de mineração de ouro em Paracatu/MG. *Acaulospora morrowiae* (A), *Glomus intraradices* (B), *Paraglomus occultum* (C), *Acaulospora* sp#1 (D), *Acaulospora colombiana* (E)

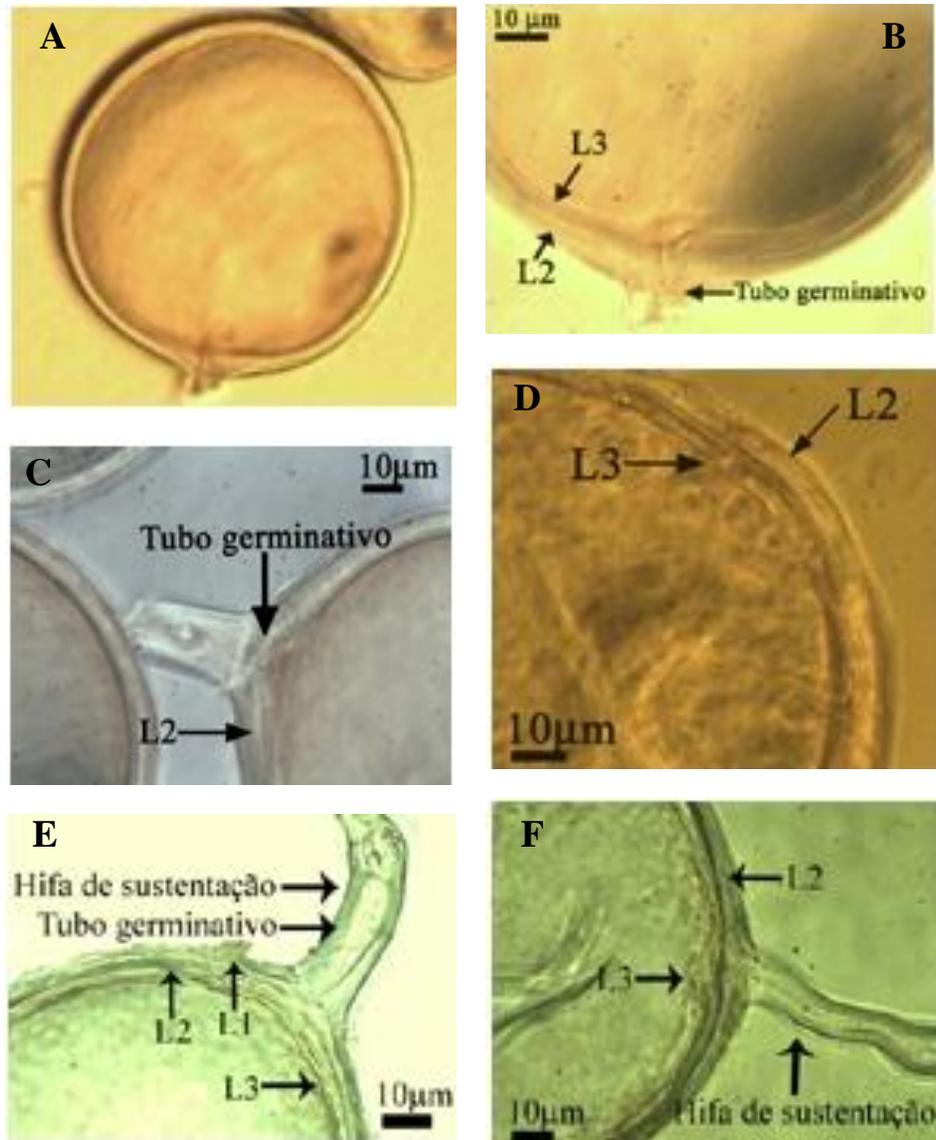


Figura 2 *Glomus clarum*. Detalhes das camadas da parede do esporo, hifa de sustentação e tubo germinativo (A, B, C, D, E e F).

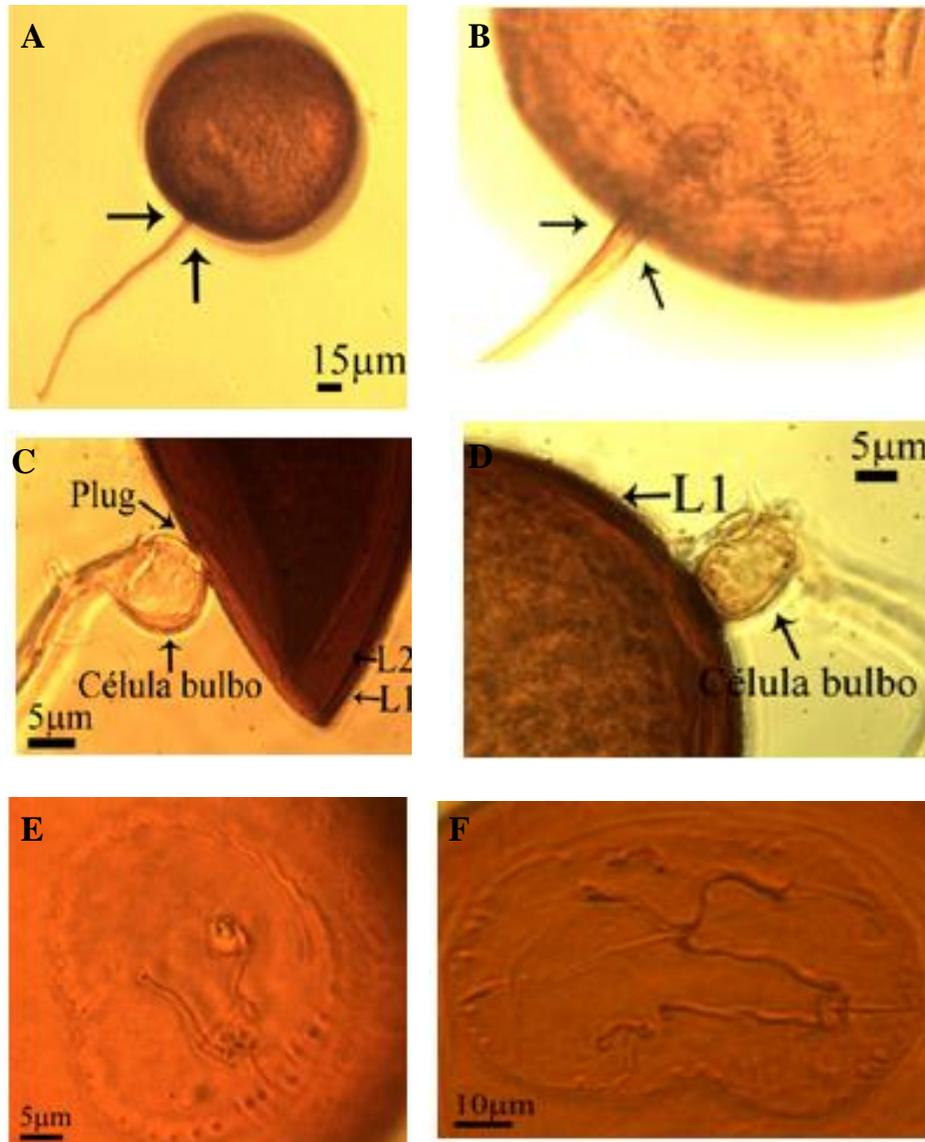


Figura 3 *Scutellospora heterogama*. Célula bulbo e camadas da parede do esporo (C e D), detalhe do escudo germinativo (A, B, E e F).

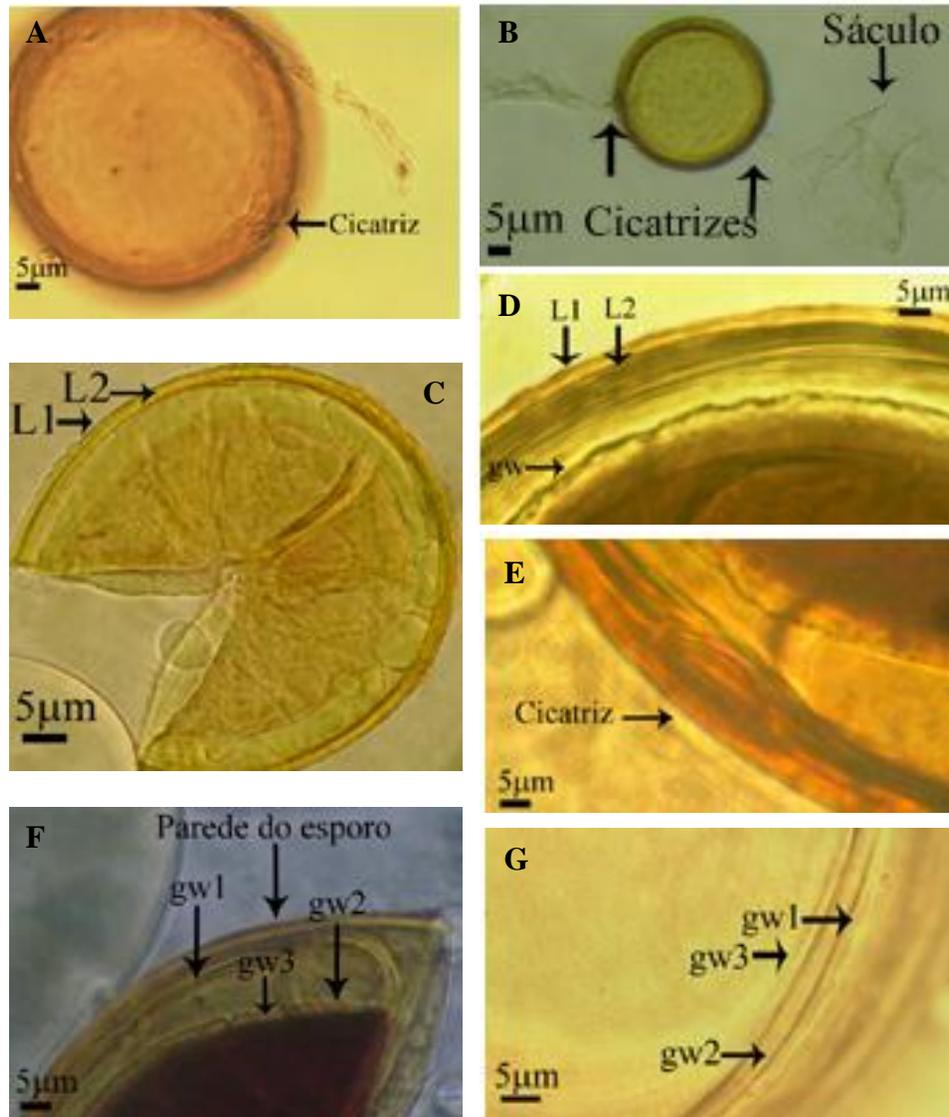


Figura 4 *Acaulospora colombiana*. Esporo individual mostrando a cicatriz (A e E), sáculo e hifa de sustentação (B), detalhes das camadas da parede do esporo (C, D, F e G).

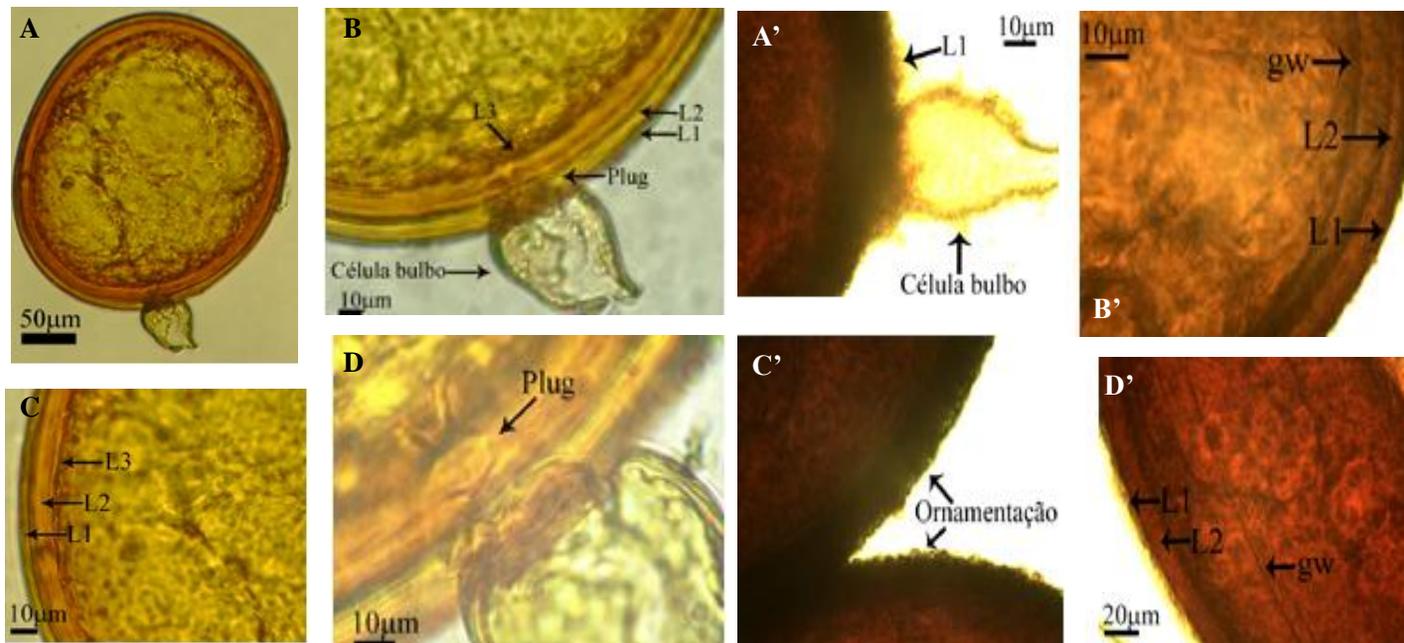


Figura 5 *Gigaspora margarita*. Esporo individual (A). Detalhe das camadas da parede do esporo (B, C e D), célula bulbo e plug (B,D). *Scutellospora biornata* Detalhe da célula do bulbo (A'), camadas L1 e L2 da parede do esporo, camada germinativa (B' e D') e ornamentação da parede do esporo (C').

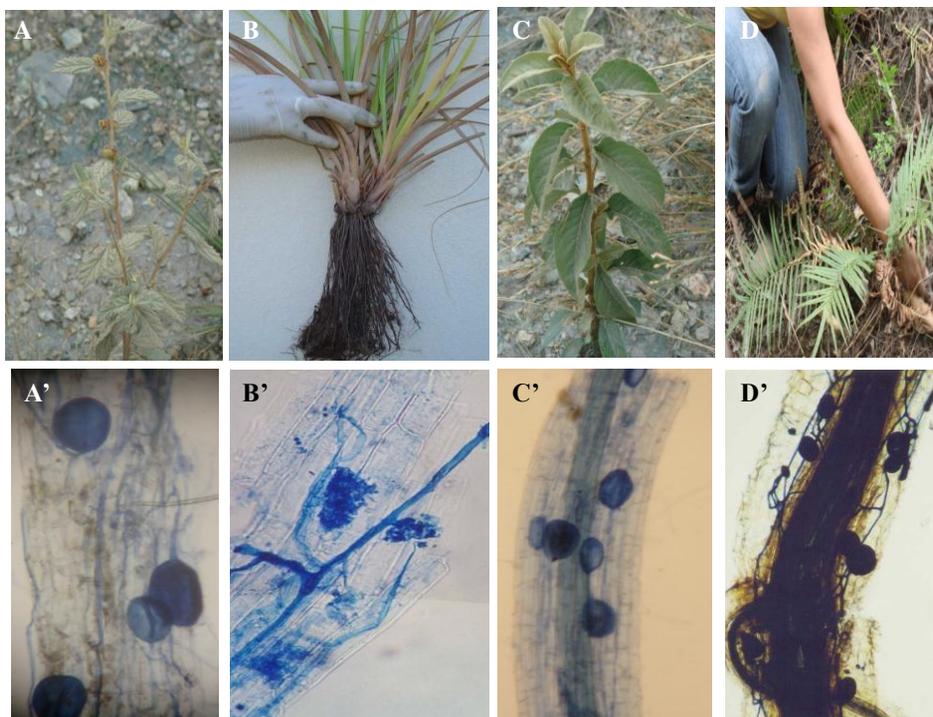


Figura 6 Plantas com crescimento espontâneo na área de mineração de ouro em Paracatu/MG. Coleta em setembro de 2009. Planta do gênero *Turmira* encontrada na área de Estéril e estruturas de colonização radicular micorrízica (A e A'). *Brachiaria* sp. encontrada na área de Estéril e estrutura de colonização radicular micorrízica (B e B'). Planta da família *Turmeraceae* coletada na área de B1 e estruturas de colonização radicular micorrízica (C e C'). Planta do gênero *Pteris* encontrada na área de B1 e estrutura de colonização radicular micorrízica (D e D').