

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**MACRÓFITAS AQUÁTICAS CULTIVADAS EM ÁGUAS DE
DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

Michelle Barbeiro da Cruz
Doctor Scientiae

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C957m
2011

Cruz, Michelle Barbeiro da, 1982-
Macrófitas aquáticas cultivadas em águas de drenagem
ácida de mina / Michelle Barbeiro da Cruz. – Viçosa, MG,
2011.
vi, 81f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas aquáticas - Efeito dos metais pesados. 2. Plantas
aquáticas - Anatomia. 3. Fitorremediação. 4. Metais pesados.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 581

MICHELLE BARBEIRO DA CRUZ

**MACRÓFITAS AQUÁTICAS CULTIVADAS EM ÁGUAS DE
DRENAGEM ÁCIDA DE MINA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

MICHELLE BARBEIRO DA CRUZ

MACRÓFITAS AQUÁTICAS CULTIVADAS EM ÁGUAS DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de abril de 2011.

Dr^a. Sylvia Therese Meyer Ribeiro

Prof. Antônio Teixeira de Matos

**Prof. Jaime Wilson Vargas de Mello
(Co-orientador)**

**Dr. Décio Karam
(Co-orientador)**

**Prof^a. Rosane Maria de Aguiar Euclides
(Orientadora)**

Aos que amo profundamente,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, à pós-graduação em Botânica, à CAPES e ao CNPq.

À Prof^a. Dr^a. Rosane Aguiar, pela orientação, paciência e amizade demonstradas durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaime Wilson Vargas Mello por me deixar fazer parte do projeto, pelo apoio financeiro, de infraestrutura e conselhos.

À Prof^a. Marília Contin Ventrella pela co-orientação, amizade, e por ter cedido o espaço para fazer as análises de anatomia.

Ao Dr. Décio Karam da EMBRAPA Milho e Sorgo, pelos conselhos, amizade, apoio, e principalmente pelos incentivos constantes.

À Dr^a. Kacilda Naomi Kuki pelo encorajamento, as injeções de ânimo, conselhos científicos e de amizade sincera.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal e da Unidade de Crescimento de Plantas, em especial ao Rogério Gomide.

Aos amigos e companheiros dos laboratórios (UCP e Anatomia Vegetal).

Aos amigos de horas boas e ruins Caroline Müller, Patrícia Luísa e Rogério Gomide.

À reta da UFV que me proporcionou momentos de reflexão intensos.

Ao Anderson, meu marido, companheiro, amigo e confidente, com quem tenho compartilhado momentos inesquecíveis da minha vida.

Aos meus irmãos Larissa e Vladmir, pela torcida, apoio, carinho e, acima de tudo, amor incondicional.

Aos meus pais Isaac e Ana, eternos incentivadores, que, com muito amor, não mediram esforços e sacrifícios para que eu finalizasse mais essa etapa.

E em especial, à Deus, por ser a minha esperança!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. JUSTIFICATIVA	5
3. HIPÓTESE	5
4. OBJETIVOS GERAIS	5
5. MATERIAL E MÉTODOS	6
5.1. Produção artificial de drenagem ácida	6
5.2. Obtenção de macrófitas aquáticas flutuantes livres	6
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO I	10
Cultivo de macrófitas aquáticas em solução contendo drenagem ácida de mina. ..	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
3. RESULTADOS	16
3.1. Sintomas de toxicidade	16
3.2. Teores de pigmentos fotossintéticos	21
3.3. Produtividade	23
3.4. Nutrientes	25
4. DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO II	50
Efeito de drenagem ácida de mina sobre o acúmulo e nas características morfo- anatômicas de <i>Eichhornia crassipes</i> e <i>Spirodela polyrrhiza</i>	50
RESUMO	51
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
3. RESULTADOS	57
3.1. Produção de biomassa seca	57
3.2. Teor de pigmentos fotossintéticos	58
3.3. Nutrientes	60
3.4. Alterações morfo-anatômicas	65
4. DISCUSSÃO	71
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

RESUMO

CRUZ, Michelle Barbeiro da. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Macrófitas aquáticas cultivadas em águas de drenagem ácida de mina**, Orientadora: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-orientadores: Jaime Wilson Vargas Mello, Marília Contin Ventrella e Décio Karam.

A mineração é apenas um dos caminhos pelos quais os metais são liberados no ambiente, sendo que a principal fonte de contaminação por metais tem sido as pilhas de rejeitos e materiais estéreis. A presença de minerais sulfetados em depósitos de minério é fonte de drenagem ácida de minas (DAM), a qual é reconhecida como poluente multifator, sendo a importância de cada fator dependente dos sistemas afetados. Os principais fatores de poluição são pH, sais, íons metálicos e não-metálicos, além dos processos de sedimentação. A presença de metais pesados no meio ambiente é o principal problema relacionado à drenagem ácida de mina, pois pode afetar os sistemas aquáticos de diversas formas, sendo que os efeitos podem ser categorizados como químicos, físicos, biológicos e ecológicos. A recuperação de ambientes contaminados requer tecnologias, muitas vezes de custo elevado, entretanto a fitorremediação apresenta-se como uma tecnologia eficiente e de baixo custo. Esta tecnologia pode ser aplicada in situ com a utilização de espécies vegetais e microorganismos associados, que degradam e seqüestram elementos contaminantes presentes no meio. Devido à inerente capacidade das espécies *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* de absorverem diferentes metais, é possível que as mesmas sejam capazes de absorver e acumular, simultaneamente, metais e arsênio presentes na água de drenagem ácida, sem o possível comprometimento do crescimento e do desenvolvimento das plantas. O presente estudo teve como objetivos avaliar o acúmulo de Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As no tecido vegetal, além da tolerância e o desenvolvimento de *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* expostas a sistema artificial de cultivo contendo soluções diluídas de drenagem ácida de minas. Dentre as espécies estudadas, *E. crassipes* foi a mais tolerante às referidas soluções, seguida por *S. polyrrhiza* e, por fim, *P. stratiotes*. No entanto, *E. crassipes* e *P. stratiotes* se destacaram por apresentar sistemas radiculares bem desenvolvidos e, desta forma, permitir acúmulo substancial de metais em suas raízes, favorecendo a rizofiltração. Porém, apenas *E. crassipes* apresentou capacidade de sobreviver em soluções contendo DAM sem que fosse registrado o surgimento de danos severos na morfologia externa e anatomia, embora seu crescimento tenha sido inibido com o aumento na concentração de DAM.

ABSTRACT

CRUZ, Michelle Barbeiro da. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011. **Aquatic macrophytes in acid mine drainage solutions**, Adviser: Rosane Maria de Aguiar Euclydes. Co-advisers: Jaime Wilson Vargas Mello, Marília Contin Ventrella and Décio Karam.

Mining is one of the paths in which metals are released into the environment, tailings piles and sterile materials are the main source of metal contamination. The presence of sulfide minerals in ore deposits is a source of acid mine drainage (AMD), which is recognized as a multifactor pollutant, and each factor varies depending on the systems affected. As main factors can be quoted pH, salts, metal and non-metallic ions, and sedimentation processes. The presence of heavy metals in the environment is the main problem related to acid mine drainage due to its effects on aquatic ecosystems. The effects may be categorized as chemical, physical, biological and ecological. The recovery of contaminated environments requires technologies, often expensive, however the phytoremediation is an efficient and low cost technology. It can be applied in situ using plants and microorganisms, which degrade and uptake contaminants. Due to the inherent ability of *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* and *Spirodela polyrrhiza* to uptake different metals, it is possible that they are able to uptake and accumulate both metals and arsenic, without compromising growth and plant development in solutions with acid mine drainage. This study aimed to evaluate Cu, Fe, Mn, Ni, Zn and As accumulation, tolerance and development of three species of macrophyte (*E. crassipes*, *P. stratiotes* and *S. polyrrhiza*) exposed to aqueous solutions containing acid mine drainage. Among the studied species, *E. crassipes* was the most tolerant to acid mine drainage solutions, followed by *S. polyrrhiza*, and finally, *P. stratiotes*. *E. crassipes* and *P. stratiotes* stood out for its well-developed root system that allows substantial metals accumulation in their roots, benefiting rhizofiltration. But, only *E. crassipes* showed ability to survive in solutions containing acid mine drainage without severe damages on its morphology and anatomy, and growth was inhibited with increasing concentration of acid mine drainage.

1. INTRODUÇÃO GERAL

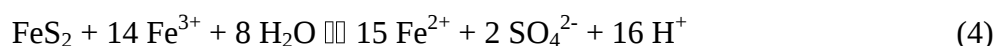
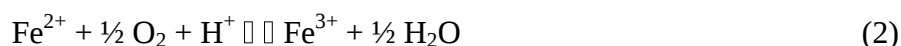
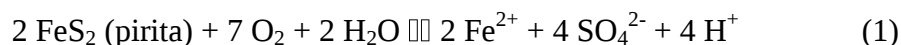
Os metais são importantes para o desenvolvimento das sociedades modernas, sendo utilizados como matéria-prima em diversos setores da indústria. Porém o impacto ambiental gerado na sua exploração pode proporcionar alterações relevantes no solo, no ar, na poluição sonora, no meio aquático e na fauna e flora locais (Dias, 2001).

A atividade mineradora tem impacto pontual, isto é, afeta áreas específicas, entretanto, na maioria das vezes é capaz de provocar alterações de elevada intensidade, mesmo em locais distantes de sua origem. A mineração é apenas um dos caminhos pelos quais os metais são liberados no ambiente, sendo que a principal fonte de contaminação por estes tem sido as pilhas de rejeitos e materiais estéreis (Salomons, 1995).

A presença de minerais sulfetados em depósitos de minério é fonte de drenagem ácida de minas (DAM), sendo que a pirita (FeS_2), a pirrotita (FeS) e a arsenopirita (AsFeS) os mais importantes sulfetos que ocorrem em corpos de minério aurífero. Com a exposição destes materiais na atmosfera, ocorre a oxidação dos sulfetos e a liberação de elementos potencialmente tóxicos para o meio ambiente.

O processo de geração de DAM decorre de um conjunto de reações químicas, eletroquímicas e microbiológicas, desencadeadas a partir da exposição do material sulfetado ao oxigênio e à água (Sengupta, 1993). Como consequência, verifica-se uma série de reações que levam a produção de ácido sulfúrico (H_2SO_4), decréscimo no pH e aumento na solubilidade e do risco de lixiviação de elementos tóxicos (Singer & Stumm, 1970).

As reações envolvidas na oxidação da pirita, em presença de água e oxigênio, para produção de ácido sulfúrico, de acordo com Singer & Stumm (1970), são as seguintes:



Inicialmente, a pirita é oxidada pelo oxigênio presente na água, gerando o cátion ferroso (Fe^{2+}), sulfato e íons H^+ (1). O cátion ferroso é, então, oxidado a ferro férrico (Fe^{3+}), reação relativamente lenta (2) que pode ser catalisada pela bactéria

Acidithiobacillus ferrooxidans. Esta reação é a principal limitante da taxa de formação de águas ácidas. Com valores de pH acima de 3,0, pode haver precipitação de hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (3). Por outro lado, sob condições com pH abaixo de 3,0, o ferro férrico, em contato com a pirita não oxidada, é consumido pela oxidação do sulfeto (4), por se tratar de um oxidante. Isto significa que o oxigênio somente é necessário para iniciar a oxidação da pirita.

Dentre os vários elementos que podem ser solubilizados e lixiviados no processo de drenagem ácida, destacam-se o Fe, S e As, sendo que o último apresenta alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (Duker et al., 2005).

O arsênio existe na natureza em diversas formas químicas, incluindo espécies orgânicas, como o íon monometilarsônico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA), e inorgânicas, como o As(III) (arsenito) e As(V) (arsenato), sendo estas últimas espécies consideradas as mais tóxicas. As variedades de formas químicas são resultados da participação do arsênio em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais, como a manufatura de certos vidros, materiais semicondutores e fotocondutores, entre outros (Anderson et al., 1986).

A DAM é reconhecida como poluente multifator e a importância de cada fator depende dos sistemas afetados. Os principais fatores de poluição são pH, sais, íons metálicos e não-metálicos, além dos processos de sedimentação. O impacto em si é amplamente controlado não somente pela natureza do lixiviado drenado das pilhas de rejeito, mas pela capacidade tamponante da água receptora e da sua diluição (Gray, 1997).

A presença de metais pesados no meio ambiente é o principal problema relacionado à drenagem ácida de mina, pois esta afeta os sistemas aquáticos de diversas formas, sendo que os efeitos podem ser categorizados como químicos, físicos, biológicos e ecológicos. O impacto como um todo na estrutura da comunidade é a eliminação de espécies, diminuindo as interações na cadeia alimentar e, assim, reduzindo significativamente a estabilidade ecológica (Gray, 1997). Consequentemente, a saúde humana, a fauna e a flora são comprometidas de maneira direta e indireta, especialmente por meio da água contaminada e, por esta razão, a qualidade de águas superficiais e subterrâneas merece atenção especial em áreas propensas à contaminação (Deschamps, 2003; Duker et al., 2005).

A recuperação de ambientes contaminados requer tecnologias, muitas vezes de custo elevado, entretanto a fitorremediação se apresenta como uma tecnologia eficiente e de baixo custo. Esta tecnologia pode ser aplicada in situ com a utilização de espécies

vegetais e microorganismos associados, que degradam e seqüestram elementos contaminantes presentes no meio (Pilon-Smits, 2005; Mishra et al., 2008).

A drenagem ácida de minas apresenta diversos metais pesados essenciais ou não às plantas e que podem assumir um caráter tóxico dependendo da concentração e da susceptibilidade da espécie exposta.

A concentração dos íons presentes na solução será determinada a partir dos processos de decantação, sedimentação, sorção, co-precipitação, troca catiônica, fotodegradação, biodegradação, atividade microbiana, fitoacumulação e absorção por plantas. Porém, estes processos se dão simultaneamente, o que dificulta a explicação do que realmente ocorre, ou quais reações acontecem neste meio. As plantas aquáticas, neste caso, contribuem proporcionando filtração, adsorção, troca catiônica, e processos bioquímicos induzidos por microorganismos (Karanthanas & Johnson, 2003; Sheoran & Sheoran, 2006).

Diversas macrófitas aquáticas têm sido utilizadas para a remoção de metais pesados de efluentes contaminados, existindo trabalhos abordando diferentes aspectos como a remoção (Miretzky et al., 2004; Hassan et al., 2007), a toxicidade dos metais nas plantas (Drost et al., 2007), o uso das plantas como biofiltros para água poluída (Dunbabin & Bowmer, 1992) e o biomonitoramento de ambientes contaminados por metais (Cardwell et al., 2002).

A fitorremediação pode ser classificada de acordo com as diferentes técnicas de remoção dos elementos tóxicos, como: fitoextração, fitofiltração ou rizofiltração, fitovolatilização, fitodegradação e fitoestabilização (Salt et al., 1998). A fitoextração e a fitofiltração são as técnicas mais desenvolvidas e empregadas na fitorremediação de metais. A fitofiltração é eficiente e economicamente atrativa quando realizada em locais com baixa concentração de contaminantes e grandes volumes de água (Raskin et al., 1997).

A disponibilidade de elementos químicos para as plantas depende de vários fatores ambientais, tais como concentração no ambiente, fatores abióticos, tempo de exposição, especiação do elemento, período de amostragem, entre outros (Baldantoni et al., 2004; Kumar et al., 2006; Mishra et al., 2008).

As macrófitas aquáticas diferem tanto na sua capacidade de absorver elementos através dos tecidos da raiz, como na proporção de elementos transferidos para as partes aéreas (Baldantoni et al., 2004). A absorção pelas folhas pode ser significativa (Guilizzoni, 1991; Peng et al., 2008), sendo que a acumulação dos elementos químicos nos tecidos varia entre as espécies.

As plantas aquáticas, por apresentarem plasticidade na sua adaptação, podem ser utilizadas para reduzir, ou até mesmo neutralizar, os efeitos da drenagem ácida de mina sobre as características e a composição dos corpos d'água (Sheoran & Sheoran, 2006; Manios et al., 2003).

Estudos demonstraram que as macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* têm elevada taxa de crescimento e capacidade de sobrevivência em condições não favoráveis ao crescimento (Holm et al., 1969), como em ambientes com altas concentrações de elementos, além de acumular metais (Rai et al., 1995; Maine et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Cardwell et al., 2002; Soltan & Rashed, 2003; Miretzky et al., 2004; Olivares-Rieumont et al., 2007; Rahman et al., 2007), sendo estas características são desejáveis para as plantas com potencial para a fitorremediação.

Eichhornia crassipes (Mart. e Zucc.) Solms é uma espécie de planta aquática monocotiledônea, da família das Pontederiaceae, também conhecida por aguapé ou jacinto d'água. É uma macrófita aquática flutuante livre perene, constituída de raízes, rizomas, estolões, pecíolos flutuadores, folhas e inflorescências. Formam colônias rapidamente devido a sua capacidade de reprodução elevada, por meio de processos vegetativos, e formação dos estolões. A reprodução sexuada pode ocorrer por autopolinização, e as sementes são liberadas dentro da água no início da estação fria, as quais podem permanecer viáveis por um período mínimo de sete anos. Por apresentar facilidade de adaptação a diversos locais, essa espécie deixou de ser típica da América do Sul e, atualmente, tem sido encontrada em diferentes regiões do mundo como planta invasora de difícil manejo e controle (Malik, 2007; Penfound & Earle, 1948; Holm et al., 1969).

Pistia stratiotes Linn. (alface-d'água) está amplamente distribuída pelo mundo e também é considerada planta daninha. É uma monocotiledônea pertencente à família Araceae, apresenta folhas grandes cor verde claro e pubescentes nos dois lados; estas se desenvolvem em forma de rosetas, com formação de raízes longas e fibrosas entre elas. Apresenta reprodução assexuada por meio dos estolões, e também sexuada por meio de produção de sementes (Holm et al., 1969; Sculthorpe, 1967).

Spirodela polyrrhiza (L.) Schleiden (lentilha-d'água) pertence, atualmente, à família Araceae, subfamília Lemnoideae. É uma pequena planta aquática flutuante livre, com até 10 mm de comprimento. Esta planta se resume a um talo achatado que flutua sobre a água, com formato de folha ovalada e globular, com duas a doze raízes pendulares de até 3 cm de comprimento, e coifa conspícua. Normalmente presente na

natureza como colônias de três ou mais talos; reproduzindo através de talo-filha, originado de bolsos marginais presentes no lado oposto à região nodal basal de cada talo (Sculthorpe, 1967).

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas tem aumentado a preocupação pública com os danos causados ao ambiente resultantes das atividades de mineração, em particular da drenagem ácida de minas (DAM), a qual é uma das principais fontes de contaminação por metais no meio ambiente, podendo vir a causar problemas à saúde humana. No Brasil, os estudos sobre os problemas ambientais ocasionados pela contaminação resultante da drenagem ácida de mina ainda são incipientes, mas o problema tem sido constatado principalmente em regiões industriais e de mineração nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

Os estudos de remoção de metais por plantas aquáticas ainda são restritos a poucas espécies, e focados na remoção de apenas um a três tipos de metais (Hassan et al., 2007; Rahman et al., 2007; Mkandawire & Dudel, 2005; Miretzky et al., 2004; Oliveira et al., 2001; Maine et al., 2000). Desta forma, existe grande necessidade de informações sobre a absorção simultânea de diferentes elementos que contaminam o ambiente aquático, em especial aqueles provenientes da drenagem ácida de mina.

3. HIPÓTESE

Devido à capacidade das espécies *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* de absorverem diferentes metais pesados, é possível que sejam capazes de absorver e acumular, simultaneamente, metais pesados presentes na água de drenagem ácida, e sejam tolerantes.

4. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivos avaliar o acúmulo de Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As nos tecidos vegetais, além da tolerância e desenvolvimento de três espécies de macrófitas aquáticas (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*) expostas em solução aquosa contendo soluções diluídas de drenagem ácida de minas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão descritas as metodologias que foram comuns aos experimentos realizados.

5.1. Produção artificial de drenagem ácida

As águas ácidas utilizadas nos experimentos foram provenientes de material sulfetado, gerador de águas ácidas, elaboradas e produzidas no Laboratório de Geoquímica, do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Viçosa/UFV. A drenagem ácida de mina (DAM) foi gerada em escala piloto a partir de rejeito de mineração de ouro (Paracatu – MG) e água destilada. Foram utilizadas colunas de lixiviação, contendo uma camada de lã de vidro, seguida de uma camada de aproximadamente 2 cm com brita de quartzo (< 8 mm). Sobre estas, uma camada constituída por rejeito misturado com britas de quartzo e, na parte superior da coluna, uma camada de 2 cm de britas de quartzo. A mistura de brita de quartzo e o rejeito tiveram como finalidade aumentar a macroporosidade e, conseqüentemente, facilitar a lixiviação e a oxidação do sulfeto.

5.2. Obtenção de macrófitas aquáticas flutuantes livres

Exemplares das macrófitas aquáticas flutuantes livres (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*) foram coletados em lagoas do Horto Botânico, pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV/UFV), e foram cultivadas em caixas de 40 litros, contendo solução nutritiva a ¼ da força iônica (Clark, 1975) sob condições de casa de vegetação.

Para a montagem dos ensaios, foram selecionados indivíduos com características e tamanhos similares (número de folhas e peso fresco). Após a seleção, as plantas foram lavadas em água desionizada para remoção do excesso de resíduos presentes nas raízes e nas folhas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E. 1986. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part 1 - Reaction Media. **Analyst**, 111:1143-1152.
- BALDANTONI, D.; ALFANI, A.; Di TOMMASI, P.; BARTOLI, G.; DE SANTO, A.V. 2004. Assessment of macro and microelement accumulation capability of two aquatic plants. **Environmental Pollution**, 130:149–156.
- CARDWELL, A.; HAWKER, D.; GREENWAY, M. 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. **Chemosphere**, 48:653–663.
- CLARK, R.B. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal agricultural Food Chemistry**, 23:458-460.
- DESCHAMPS, M. E., CIMINELLI, V. S. T., WEIDLER, P. G., Ramos, A. Y. 2003. Arsenic sorption onto soils enriched in Mn and Fe minerals. **Clays and Clay Minerals**, 51(2):197-204.
- DIAS, E. G.C.S. 2001. Avaliação de impacto ambiental de projetos de mineração no Estado de São Paulo: a etapa de acompanhamento. **Tese (Doutorado em Engenharia Mineral)**. Universidade de São Paulo. São Paulo. 283 p.
- DROST, W.; MATZKE, M.; BACKHAUS, M. 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. **Chemosphere**, 67: 36–43.
- DUKER, A. A., CARRANZA, E. J. M.; HALE, M. 2005. Applied geochemistry and health. **Environmental International**, 31:631-641.
- DUNBABIN, J.S.; BOWMER, K.H. 1992. Potential use of constructed wetlands for treatment industrial waste water containing metals. **Science of the Total Environment**, 111:151–168.
- GRAY, N.F. 1997. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. **Environmental Geology**, 30:62-71.
- GUILIZZONI, P. 1991 The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submersed macrophytes. **Aquatic Botany**, 41:87-109.
- HASSAN, S.H.; TALAT, M.; RAI, S. 2007. Sorption of cadmium and zinc from aqueous solutions by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Bioresource Technology**, 98:918–928.

- HOLM, L. G.; WELDON, L. W.; BLACKBURN R. D. 1969. Aquatic weeds. **Science**, v. 166, p. 699.
- KARANTHANASIS, A.D.; JOHNSON, C.M. 2003. Metal removal potential by three aquatic plants in an acid mine drainage wetland. **Mine, Water and the Environment**, 22:22-30.
- KUMAR, J.I.N.; SONI, H.; KUMAR, R.N. 2006. Biomonitoring of selected freshwater macrophytes to assess lake heavy metal contamination: a case study of Nal Sarovar Bird Sanctuary, Gujarat, India. **Jornal of Limnology**, 65: 9–16.
- MAINE, M.; DUARTE, M.; SUNE, N. 2000. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research**, 35:2629–2634.
- MALIK, A. 2007. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. **Environmental International**, 33:122-138.
- MANIOS, T.; STENTIFORD, E.I.; MILLNER, P.A. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. **Ecological Engineering**, 20:65-74.
- MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; FERNANDEZ CIRELLI, A. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, 57:997–1005.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAYA, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. 2008. Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, 99:930–936.
- MKANDAWIRE, M; DUDEL, E.G.. 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. **Science of the Total Environment**, 336:81– 89.
- OLIVARES-RIEUMONT, S.; LIMA, L.; DE La ROSA, D.; GRAHAM, D.W.; COLUMBIE, I.; SANTANA, J.L.; SANCHEZ, M.J. 2007. Water hyacinths (*Eichhornia crassipes*) as indicators of heavy metal impact of a large landfill on the Almendares river near Havana, Cuba. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, 79:583–587.
- OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; JORDÃO, C. P. 2001. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13(3): 329-341.
- PENFOUND, W.M.T.; EARLE, T. T. 1948. **Ecological Monographs**, 18(4):447-472.

- PENG, K.; LUO, C.; Lou, L.; Li, X.; Shen, Z. 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, 392: 22–29.
- PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, 56:15–39
- RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H.; UEDA, K.; MAKI, T.; OKUMURA, C.; RahMan, M.M. 2007. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.): A good option for phytoremediation. **Chemosphere**, 69(3):493-499.
- RAI, U.N.; SINHÁ, S.; TRIPATHI, R.D.; CHANDRA, P. 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: Removal of heavy metals. **Ecological Engineering**, 5:5-12.
- RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Plant biotechnology**, 8:221-226.
- SALOMONS, W. 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. **Journal of Geochemical Exploration**, 52:5-23.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:643–68.
- SCULTHORPE, C.D., 1967. **The Biology of Aquatic Vascular Plants**. Edward Arnold, London, 610 p.
- SENGUPTA, M. 1993. **Environmental impacts of mining – Monitoring, Restoration and Control**. Boca Raton, Lewis Publishers. 494 p.
- SHEORAN, A.S.; SHEORAN, V. 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. **Minerals Engineering**, 19:105-116.
- SINGER, P.E.; STUMM, W. 1970. Acid mine drainage: the rate determining step. **Science**, 167:1121-1123.
- SOLTAN; M.E.; RASHED, M.N. 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. **Advances in Environmental Research**, 7:321–334.

CAPÍTULO I

Cultivo de macrófitas aquáticas em solução contendo drenagem ácida de mina.

Comportamento de macrófitas aquáticas em solução contendo drenagem ácida de mina.

RESUMO

A drenagem ácida de mina (DAM) afeta os sistemas aquáticos devido ao seu baixo pH e elevada concentração de contaminantes e micronutrientes, que podem se tornar tóxicos, resultando no comprometimento do ecossistema. Entre os elementos presentes na DAM estão o Cu, Zn, Mn, Ni, Fe e As. Devido à capacidade das espécies *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* absorverem diferentes metais pesados, é possível que as mesmas sejam capazes de absorver e acumular, simultaneamente, os metais pesados presentes na drenagem ácida, sem comprometer o crescimento e desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* submetidas à drenagem ácida de mina em diferentes faixas de pH, assim como o acúmulo de Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As nos tecidos vegetais. Para tanto, indivíduos das três espécies foram submetidos, durante três dias, a meios contendo soluções de DAM e Água, com diferentes faixas de pH (2,5; 3,5; 4,5). O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com cinco repetições e sete tratamentos no total. *E. crassipes* se mostrou mais resistente às condições proporcionadas pelo cultivo em solução contendo drenagem ácida de mina que as demais espécies estudadas, que foram susceptíveis a baixos valores de pH e elevada concentração de metais. Os teores de pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* foram menos afetados que os de *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza*, no entanto as três espécies tiveram decréscimos nos valores de biomassa seca quando submetidas a baixo pH e drenagem ácida de mina. O acúmulo de metais e arsênio, presentes nos tratamentos contendo drenagem ácida de mina – independente do pH –, foi significativo nas três espécies, com maior acúmulo nas raízes de *E. crassipes* e *P. stratiotes*, o que caracteriza essas espécies como potenciais para rizofiltração de ambientes aquáticos contaminados.

Palavras-chave: fitorremediação, metal pesado, rizofiltração, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Spirodela polyrrhiza*

Behavior of aquatic macrophytes in solution containing acid mine drainage.

ABSTRACT

The acid mine drainage (AMD) affect aqueous streams with due to the low pH and high concentrations of contaminant and micronutrients that may become toxic, implicating in ecosystem disturbance. Cu, Zn, Mn, Ni, Fe, and As are among the trace elements present in AMD in high concentration. Due to the inherent capacity of *E. crassipes*, *P. stratiotes* and *S. polyrrhiza* to uptake different metals, there is a possibility that those plants are able to uptake and accumulate, simultaneously, heavy metals present in AMD, without negative influence in growth and development. The aim of the present work was to evaluate the development of *E. crassipes*, *P. stratiotes* and *S. polyrrhiza* when exposed to AMD solutions in different pH ranges, as well as the uptake of Cu, Fe, Mn, Zn and As. Three species of aquatic macrophytes were tested for survival and removal of Cu, Fe, Mn, Ni, Zn and As, in AMD and water solutions with different pH values (2,5; 3,5; 4,5) during three days in a green house experiment. Results revealed *E. crassipes* as the most resistant to AMD hazard and low pH than the other studied species. Photosynthetic pigments in *E. crassipes* were less affected, however all three species had their dry biomass decreased by low pH and AMD. *E. crassipes* and *P. stratiotes* accumulated significant amounts of heavy metal and arsenic in roots, regardless the pH solution. That capacity characterizes those plants as potentials to rhizofiltration technology in contaminated aquatic ecosystems.

Keywords: phytoremediation, heavy metal, rizofiltration, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Spirodela polyrrhiza*.

1. INTRODUÇÃO

A drenagem ácida de mina (DAM), com toda sua complexidade e seus efeitos multifatores, afeta os sistemas aquáticos de diversas maneiras, resultando no comprometimento da estrutura trófica das comunidades que formam o ecossistema aquático e o equilíbrio ecológico. Os efeitos podem ser severos a ponto de suprimir a capacidade de recuperação do meio, em consequência às alterações químicas (aumento da acidez, solubilização de metais e redução da capacidade tamponante do meio); físicas (alterações no substrato em função da sedimentação, adsorção de metais e turbidez); biológicas (alteração no comportamento biológico e fisiológico, além de morte de espécies vegetais e animais); e ecológicas (modificação do habitat, redução do nicho, bioacumulação de metais e alterações na cadeia trófica) (Gray, 1997).

O impacto da drenagem ácida de mina é muito difícil de prever, devido à sua variabilidade de composição e concentração de elementos químicos, que podem variar de acordo com a estação do ano e o meio que receberá o efluente (Gray, 1997).

Vários metais pesados presentes na DAM são micronutrientes essenciais para as plantas, como o Cu, Zn, Mn, Ni e Fe, sendo o último requerido em maior quantidade (Kunze et al., 2002). Porém, estes elementos, quando em excesso no ambiente, podem se tornar tóxicos como os elementos não essenciais (As, Cd, Pb e Hg) (Mishra et al., 2008c; Liu et al., 2007).

Apesar das elevadas concentrações de contaminantes, cada vez mais frequentes nos ecossistemas aquáticos, tem se observado que algumas macrófitas aquáticas, tais como *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor*, *Spirodela polyrrhiza*, *Salvinia intermedia* e *Typha domingensis*, se desenvolvem espontaneamente nesses ambientes (Zocche et al., 2010; Mishra et al., 2008abc; Miretzky et al., 2004). A partir da seleção de espécies de macrófitas adaptadas a condições de estresse, pesquisas podem ser realizadas visando a diminuição no impacto gerado pela DAM nos ecossistemas aquáticos. A utilização de diferentes técnicas de fitorremediação, como a fitoextração e a rizofiltração, que podem ser opções de baixo custo para a recuperação de ecossistemas aquáticos degradados pela DAM (Lasat, 2002; Dushenkov et al., 1995).

Devido à inerente capacidade das espécies *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* de absorverem diferentes metais do ambiente (Rai et al., 1995; Maine et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Cardwell et al., 2002; Soltan & Rashed, 2003; Miretzky et al., 2004; Olivares-Rieumont et al., 2007; Rahman et al., 2007), é possível que as

mesmas sejam capazes de absorver e acumular, simultaneamente, os metais presentes na drenagem ácida, sem comprometer o desenvolvimento das plantas.

Portanto, este trabalho teve como objetivos avaliar o desenvolvimento e a capacidade de acumulação de metais de *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* submetidas ao cultivo em soluções contendo drenagem ácida, ou água, em condições de pH diferentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho foram selecionadas as espécies *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*. Três experimentos foram realizados (um para cada espécie) em condições de casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (DBV/UFV).

Os tratamentos utilizados nos experimentos estão descritos na Tabela 1, assim como as concentrações dos metais e As presentes nos tratamentos e a grande variação entre eles. A seleção destes elementos químicos foi realizada a partir da informação contida na Resolução do CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), referente às condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos d'água.

Tabela 1 – Tratamentos aplicados para análise de desenvolvimento e acúmulo de *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, os respectivos valores de pH e concentrações dos metais e As no início do período experimental.

Tratamentos		Concentração (mg L ⁻¹)					
Meio ¹	pH	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As
DAM ²	2,5	1,17 ³	123,12	21,65	1,39	7,08	6,02
	3,5	1,09	25,18	19,67	1,30	6,69	0,83
	4,5	0,62	1,67	17,91	1,14	5,58	0,25
Água	2,5	- ⁴	0,77	0,11	-	0,025	0,24
	3,5	-	0,72	0,05	-	0,010	0,22
	4,5	-	0,82	0,04	-	0,010	0,24
Controle	6,5	-	0,71	0,15	-	0,017	0,23
CONAMA	5 - 9	1,0	15,0	1,0	2,0	5,0	0,5

1 – Todos os tratamentos continham solução nutritiva de Clark (1975) a ¼ da força iônica; 2 – Drenagem ácida de mina; 3 – Média entre as concentrações dos três experimentos; 4 – abaixo do limite de detecção.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com cinco blocos e sete tratamentos. Vasos com capacidade para 10 L foram usados como parcela experimental. Cada parcela experimental constava de dois indivíduos de *E. crassipes* ou *P. stratiotes*. O experimento com *S. polyrrhiza* foi realizado em vasos de 0,5 L, onde 0,5 g da espécie foram colocados para a análise do desenvolvimento. Os recipientes foram revestidos com sacos plásticos resistentes para evitar a contaminação dos vasos.

Para os tratamentos foram determinados três valores de pH (2,5; 3,5; 4,5), os quais foram obtidos com a adição de NaOH ou HCl nas soluções até que o valor do pH determinado se mantivesse constante. Durante os ensaios, o pH das soluções foi medido diariamente e corrigido quando necessário, de acordo com os tratamentos, utilizando NaOH (hidróxido de sódio) e HCl (ácido clorídrico), ambos a 1 mol L⁻¹.

A duração de cada experimento foi de 72 h. Ao final desse período, foram registradas as alterações morfológicas ocorridas nas folhas das três espécies por meio de registro fotográfico. Discos de 0,59 cm² da superfície foliar das plantas foram coletados para determinação de clorofila total e carotenóides, conforme protocolo descrito por Wellburn (1994), utilizando-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator.

Posteriormente, as plantas foram recolhidas e lavadas durante um minuto em água desionizada e separadas em partes (raiz, pecíolo e folha – *E. crassipes*; raiz e folha – *P. stratiotes*; e planta inteira – *S. polyrrhiza*). As plantas foram colocadas em sacos de papel devidamente identificados e postas para secar em estufa de circulação forçada a 65 °C, até atingir massa constante. Em seguida, o material vegetal foi finamente triturado em moinho Willey, e 0,3 g do material moído foi adicionada a frascos contendo 10 mL de solução ácida nítrico:perclórico (3:1), sendo mantidos em pré-digestão à temperatura ambiente pelo período de 24 h (Tedesco et al., 1995). Após essa fase, os frascos foram colocados em chapa aquecedora, com temperatura gradualmente elevada a 180 °C, permanecendo assim até a completa digestão da matéria orgânica.

Após o resfriamento, as amostras foram filtradas e diluídas até o volume de 25 mL com água desionizada. Os extratos vegetais e as amostras de água iniciais e finais foram analisados para Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As utilizando-se espectrometria de emissão atômica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP-OES (MODELO-3300 DV, Perkin Elmer Optima, EUA), no Laboratório de Espectrometria Atômica, do Departamento de Solos (DPS/UFV).

A partir da quantidade de elementos químicos acumulados nas plantas de *E. crassipes* e *P. stratiotes*, foi calculado o índice de translocação, de acordo com Abichequer & Bohnen (1998), segundo a equação:

$$IT (\%) = \frac{[\text{elemento}] \text{ na parte aérea}}{[\text{elemento}] \text{ na planta inteira}} \times 100$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas com o controle pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Também foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson, a 5%, entre os nutrientes acumulados na biomassa seca total das plantas submetidas ao cultivo em soluções com drenagem ácida de mina.

3. RESULTADOS

3.1. Sintomas de toxicidade

Foi possível visualizar danos fitotóxicos mais intensos nas plantas submetidas à drenagem ácida do que nas que foram cultivadas apenas em água, em diferentes faixas de pH, ou seja, os danos foram intensificados devido à composição química da drenagem ácida (Figuras 1, 2 e 3).

As plantas de *Eichhornia crassipes* se mostraram mais tolerantes às soluções contendo DAM do que as demais espécies estudadas (Figuras 1, 2 e 3). Injúrias acentuadas foram visualizadas em *E. crassipes* nos tratamentos em que as plantas foram cultivadas em soluções com o pH 2,5, tanto em água quanto em soluções contendo DAM. Nestes tratamentos as folhas mais velhas foram afetadas com surgimento de murcha seguida de necrose das bordas, aumentando em direção ao centro da folha. As folhas mais jovens, presentes próximas à base, permaneceram sadias durante o período de exposição devido ao curto período experimental (Figura 1).

Os indivíduos de *Pistia stratiotes* foram sensíveis tanto à acidez do meio quanto à exposição à DAM. Poucas horas após o início da exposição aos tratamentos, as plantas mostraram sinais de murcha e clorose, com rápida evolução para necrose, na solução com DAM. As plantas que estavam apenas em água, nas diferentes faixas de pH, tiveram menor porcentagem de danos (Figura 2). Os danos se desenvolveram da margem superior do limbo em direção ao centro. Na Figura 2 (D e F) observa-se que a clorose nas folhas foi intensificada quando cultivadas em solução contendo drenagem ácida.

No que se refere à *Spirodela polyrrhiza*, foi observado resultado semelhante aos obtidos com *E. crassipes*, com efeitos mais acentuados em faixa de pH mais baixa (2,5), inclusive com desenvolvimento de necrose (Figura 3B). No tratamento Água pH 2,5

(Figura 3C) indivíduos não sofreram injúrias, porém, caso o tempo de exposição ao tratamento fosse prolongado, provavelmente os sintomas de fitotoxicidade (clorose e necrose) se intensificariam. No tratamento com solução de DAM em pH 3,5, após três dias de exposição, as plantas apresentavam pequenas manchas cloróticas nas margens da folha, mostrando lento desenvolvimento da clorose, possivelmente devido à concentração dos metais no meio. A partir de valores de pH superiores a 3,5 os indivíduos de *S. polyrrhiza* não apresentaram danos visuais representativos.

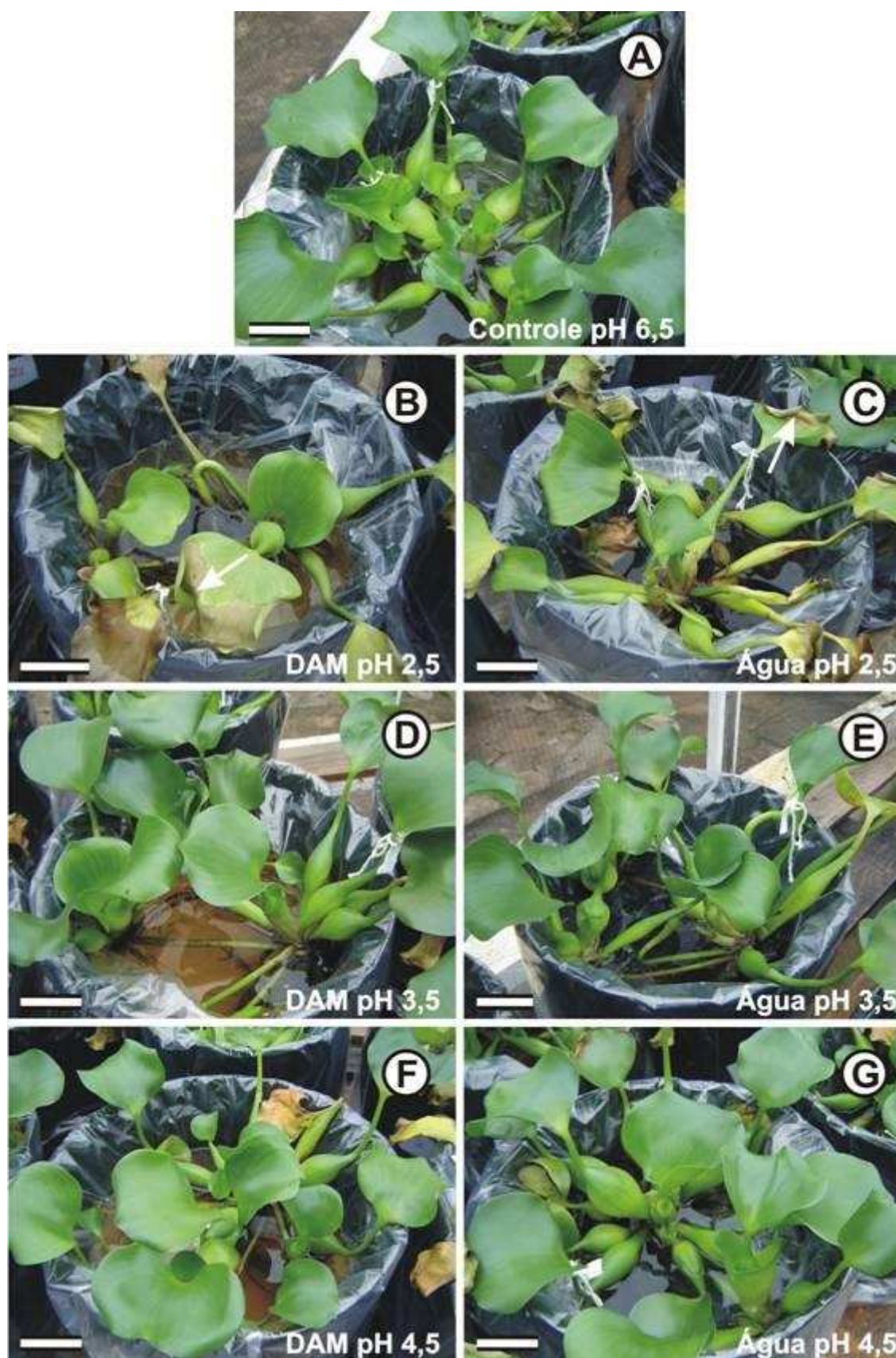


Figura 1 – Efeito sobre o desenvolvimento de plantas de *Eichhornia crassipes* quando cultivadas em meio aquoso com diferentes faixas de pH, contendo ou não drenagem ácida de mina (DAM), após três dias de exposição. Setas brancas indicam lesões. Barra = 5 cm.

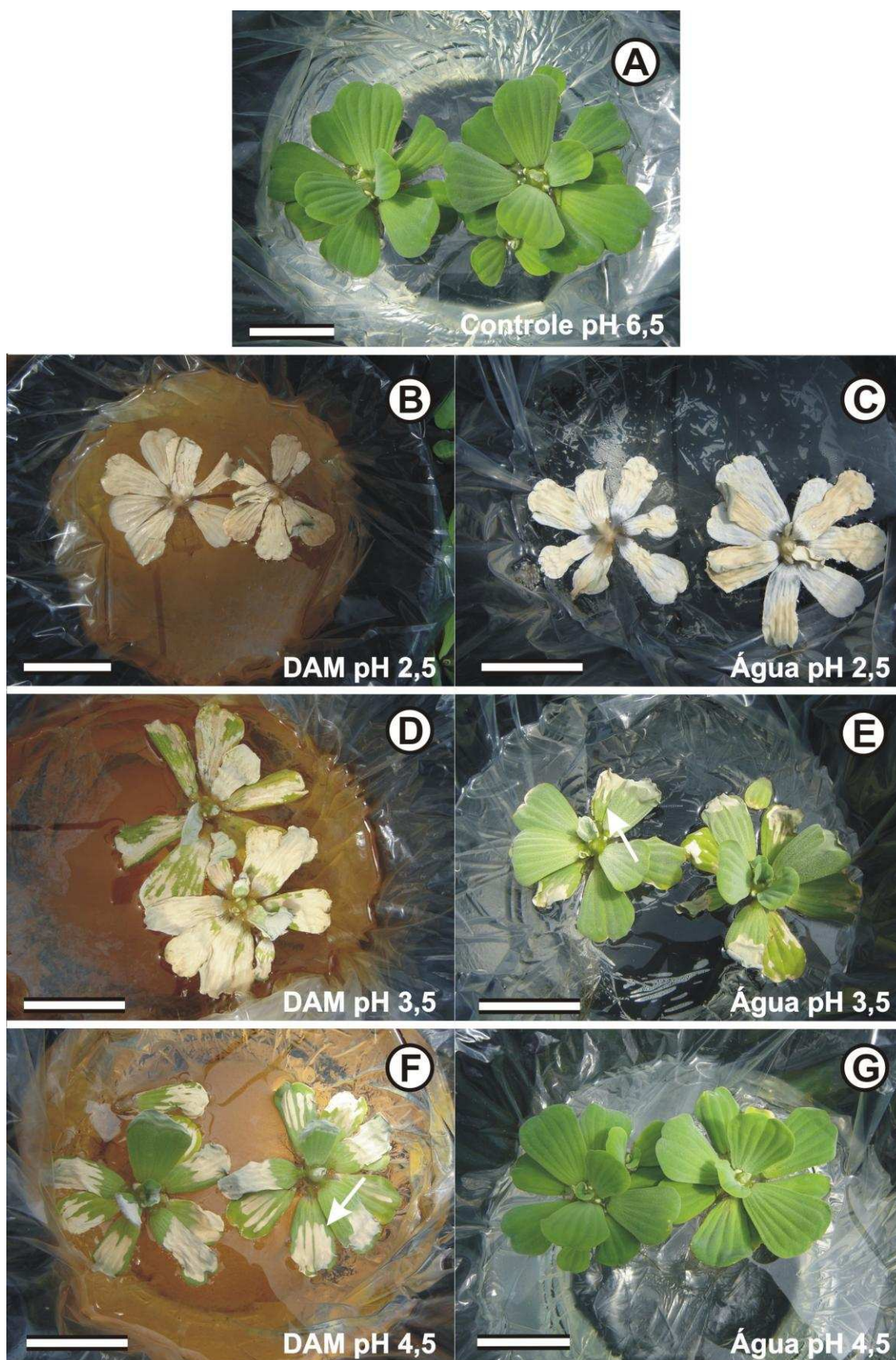


Figura 2 – Efeito sobre o desenvolvimento de plantas de *Pistia* quando cultivadas em meio aquoso com diferentes faixas de pH, contendo ou não drenagem ácida de mina (DAM), após três dias de exposição. Setas brancas indicam lesões. Barra = 5 cm.

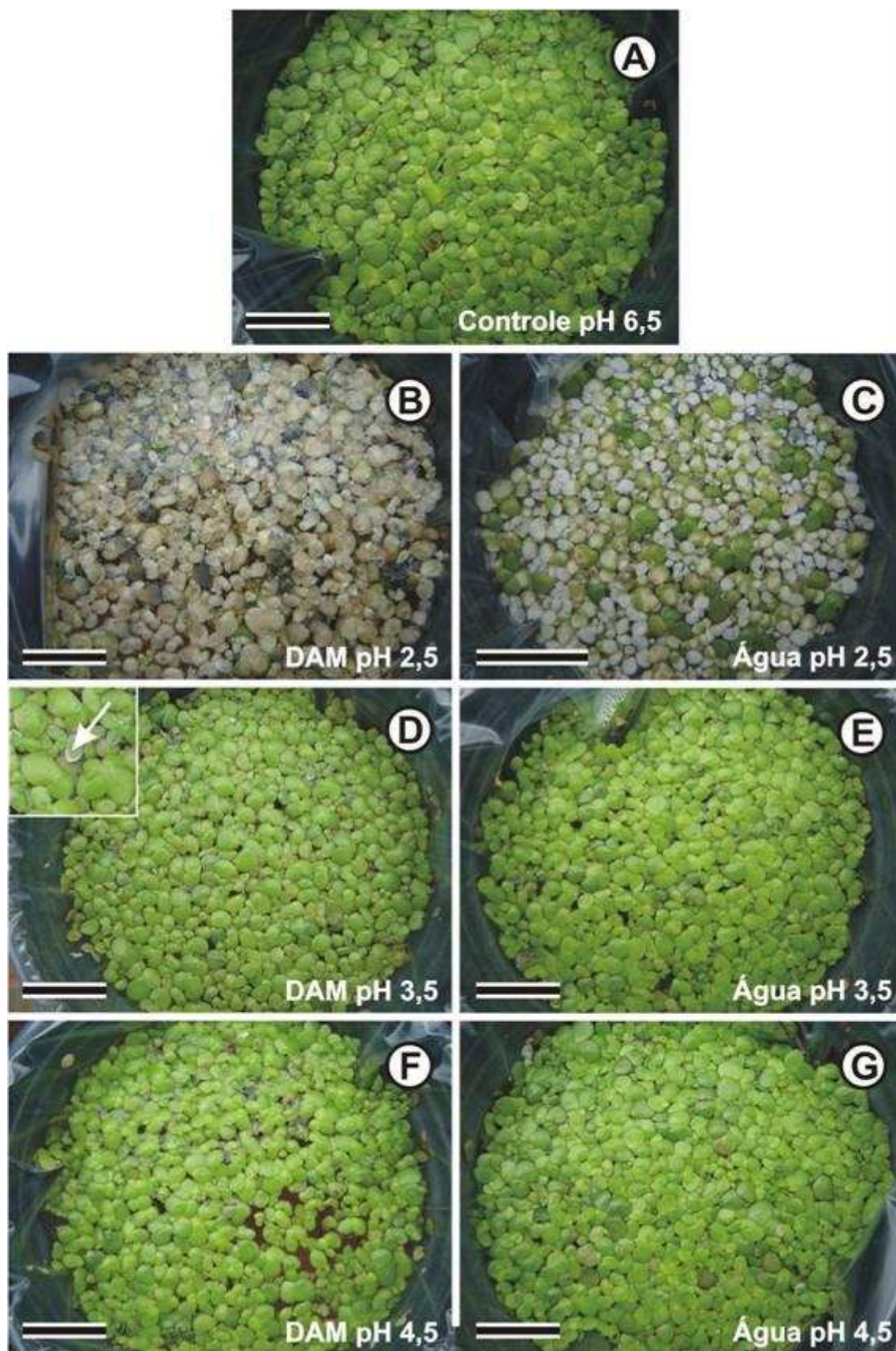


Figura 3 – Efeito sobre o desenvolvimento de plantas de *Spirodela polyrrhiza* quando cultivadas em meio aquoso com diferentes faixas de pH, contendo ou não drenagem ácida de mina (DAM), após três dias de exposição. Seta branca indica clorose. Barra = 2 cm.

3.2. Teores de pigmentos fotossintéticos

Na quantificação da clorofila total para *E. crassipes*, houve diminuição nos teores quando do cultivo em meios mais ácidos, porém, com a comparação das médias, os tratamentos DAM - 3,5 e DAM - 4,5 apresentaram maiores valores no teor clorofila total. Para o teor de carotenóides, o resultado foi semelhante, com maiores teores nas plantas cultivadas nos tratamentos DAM -3,5 e DAM - 4,5.

Os teores de clorofila total e carotenóides para *P. stratiotes* foram afetados significativamente quando em meio mais ácido (Figura 4), como resultado da intensa clorose e necrose das folhas, porém, pode-se observar que a partir dos tratamentos de pH 3,5 houve aumento no teor de clorofila total e carotenóides. No entanto, apenas o tratamento Água em pH 4,5 se assemelhou ao controle para o conteúdo de clorofila total, enquanto que para carotenóides, os tratamentos Água - 3,5 e DAM e Água - 4,5, não apresentaram diferenças em relação ao controle.

Para *S. polyrrhiza* o teor de clorofila total foi maior nos tratamentos com pH acima de 3,5, assim como para carotenóides (Figura 4). Nos meios com pH 2,5 estas variáveis foram afetadas, e foi possível observar que não houve diferença estatística as entre os meios. Não houve diferença no teor de clorofila total entre as plantas expostas à DAM e água, no pH 3,5.

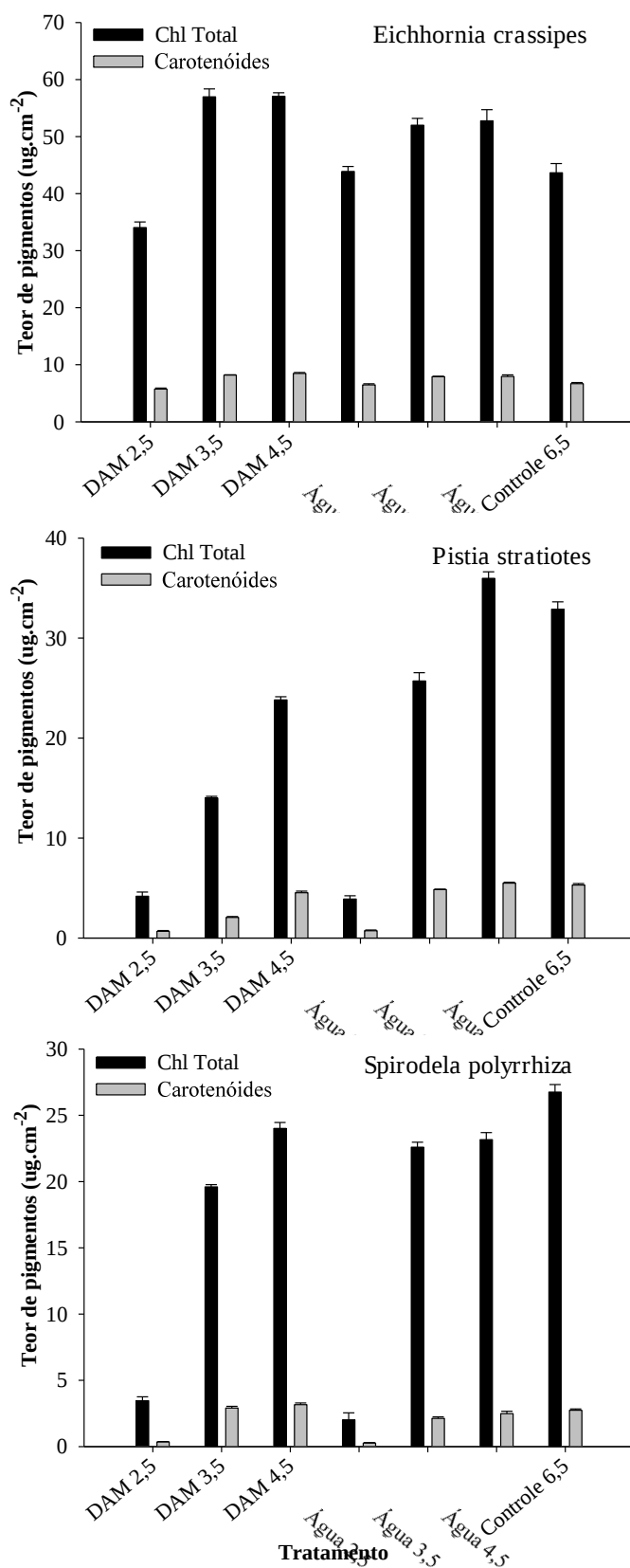


Figura 4 – Efeito de diferentes faixas de pH em drenagem ácida de mina (DAM) e água no teor de clorofila total e carotenóides em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*.

3.3. Produtividade

A produtividade das plantas foi afetada quando expostas às faixas de pH mais ácidas, causando reduções nesta variável (Figura 5). Em pH 2,5 os indivíduos das três espécies apresentaram decréscimos na produtividade, da ordem de 32% (DAM) e 16% (água) para *E. crassipes*; 40% (DAM) e 53% (água) para *P. stratiotes*; e 42% (DAM) e 55% (água) para *S. polyrrhiza*.

Para tratamento com pH igual ou superior a 3,5 soluções, as reduções foram menores, porém mais intensas nos indivíduos expostos a DAM, comprovando as observações visuais discutidas nas Figuras 1, 2 e 3. Nesta situação, a produtividade de *E. crassipes* reduziu 27% (DAM) e 10% (Água); *P. stratiotes*, 37% (DAM) e 30% (Água); e *S. polyrrhiza*, 20% (DAM) e 11% (Água).

Na faixa de pH 4,5, as reduções foram abaixo de 20%, exceto para *P. stratiotes* quando exposta a DAM, a qual teve redução de 28% em sua produtividade.

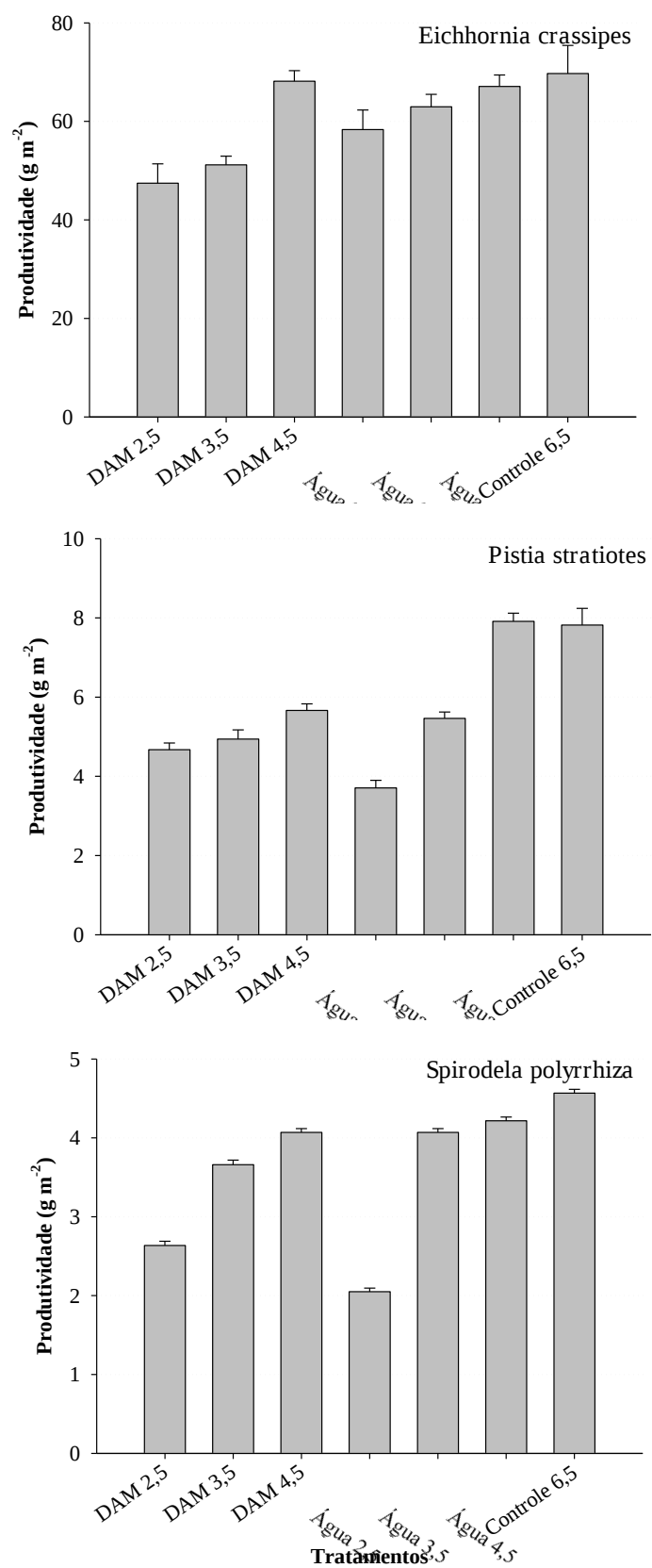


Figura 5 – Produtividade de três espécies de macrófitas após três dias de cultivo em soluções com drenagem ácida de mina (DAM) ou água em diferentes faixas de pH.

3.4. Nutrientes

Os resultados de acúmulo e índice de translocação (%) de Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As mostrados nas Figuras 6, 7 e 8, devendo ser considerado que, de acordo com os resultados de sintomatologias (toxicidade), as plantas de *P. stratiotes* dos tratamentos DAM e Água - 2,5, e DAM - 3,5 morreram, assim como os indivíduos de *S. polyrrhiza*, nos tratamentos DAM e Água - 2,5. Portanto, os valores obtidos nesses tratamentos se devem aos elementos acumulados pelos órgãos vegetais mortos. As médias e o teste de comparação (Tukey) encontram-se apresentados na Tabela 2.

3.4.1. Cobre (Cu)

O cobre foi acumulado em maior quantidade nas plantas cultivadas em solução contendo drenagem ácida (Figura 6), que, naturalmente, apresenta maior concentração desse metal. Para *E. crassipes*, apesar do maior acúmulo total de Cu em DAM com pH 4,5 (290,40 mg kg⁻¹), a translocação para as folhas foi mais eficiente nos tratamentos com Água, já para o pecíolo, o efeito foi contrário, com maior translocação nas plantas submetidas a DAM (Figura 6). Tanto para *E. crassipes* quanto para *P. stratiotes*, o acúmulo total de Cu estava diretamente relacionado com o aumento no pH da solução de cultivo. Para *S. polyrrhiza* o maior acúmulo de Cu foi em DAM - 3,5 com diminuição no pH 4,5.

Em *E. crassipes* e *P. stratiotes* a absorção de Cu apresentou correlação negativa com a absorção de Fe e As. Porém, em *P. stratiotes* o acúmulo de Cu apresentou correlação positiva com o acúmulo de Mn, Ni e Zn quando as plantas foram expostas a DAM (Tabela 3).

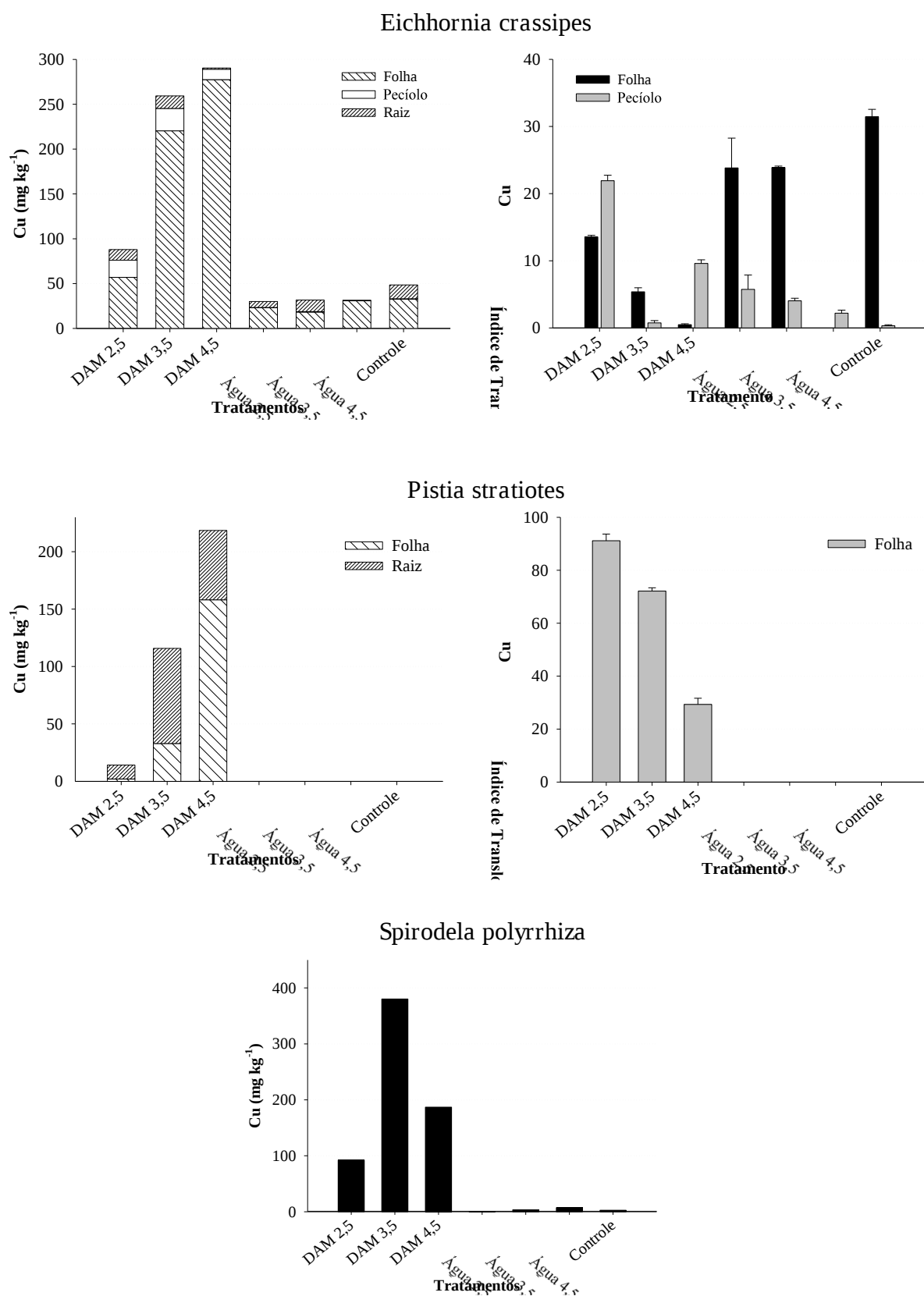


Figura 6 – Acúmulo e índice de translocação (%) de cobre (Cu) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

3.4.2. Ferro (Fe)

O acúmulo de ferro nas três espécies foi inversamente proporcional ao pH da solução (Figura 7), sendo que as concentrações foram maiores para os tratamentos de DAM. Este resultado pode ser atribuído à concentração de ferro inicial nas soluções (Tabela 2), pois nos tratamentos de DAM, a concentração de Fe diminuiu com o aumento do pH, enquanto que em tratamento com Água a concentração se manteve, independente do pH. O maior índice de translocação para *E. crassipes* foi observado no pecíolo das plantas submetidas à DAM - 2,5 (13,84 %), com redução deste índice nos demais tratamentos. Nas folhas os maiores índices de translocação ocorreram nos tratamentos com Água, independente do pH (Figura 7). Para *P. stratiotes*, o acúmulo foi mais significativo na biomassa morta, assim como em *S. polyrrhiza*, que apresentou diferença no acúmulo de ferro somente entre o tratamento DAM -2,5 e o Controle.

De acordo com a análise de correlação de Pearson, o Fe apresentou alta correlação com o acúmulo de As na biomassa seca total das três espécies estudadas.

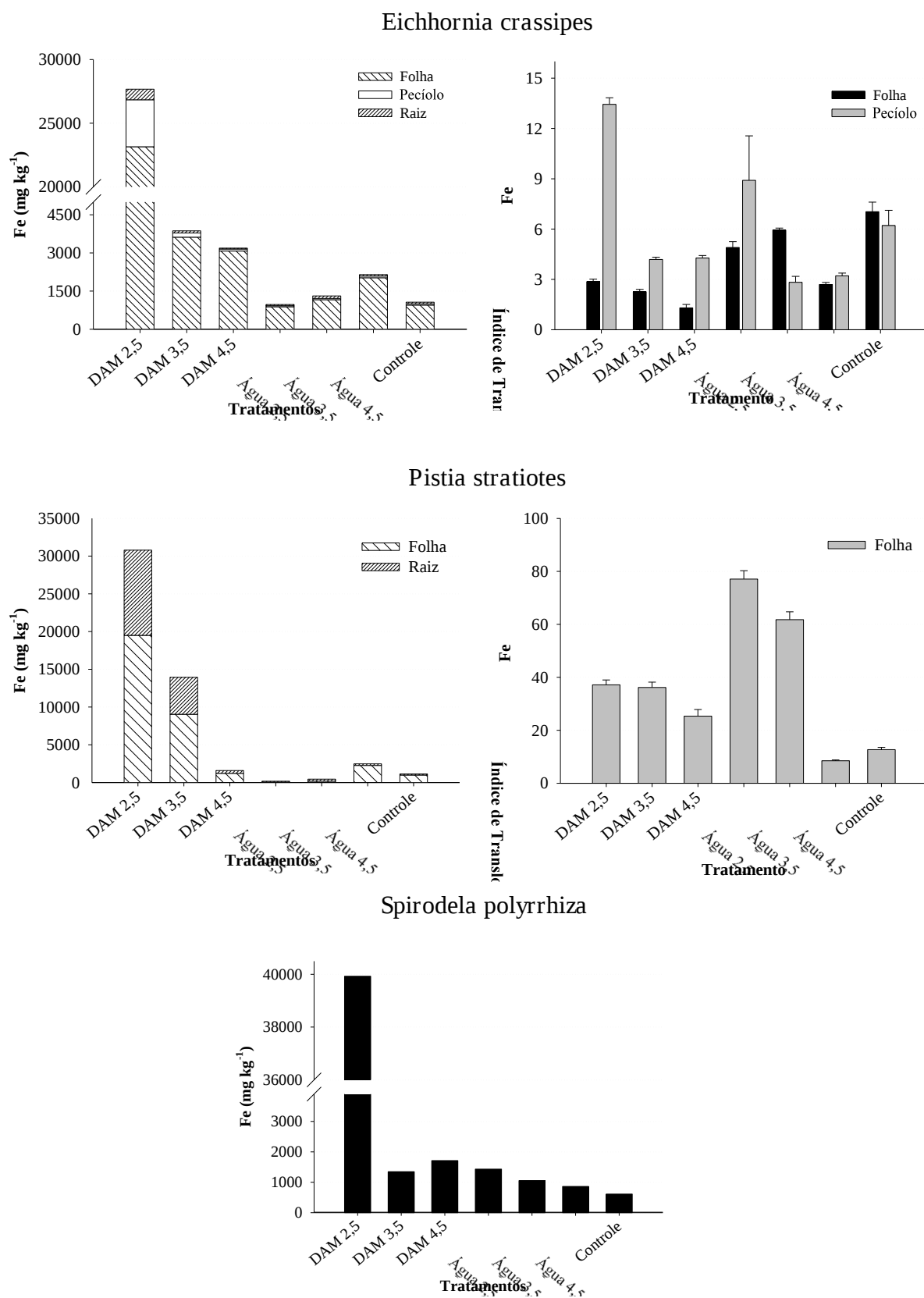


Figura 7 – Acúmulo e índice de translocação (%) de ferro (Fe) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

3.4.3. Manganês (Mn)

O acúmulo de manganês nas três espécies estudadas foi maior nos tratamentos contendo DAM (Figura 8) em relação aos tratamentos com Água. Para *E. crassipes*, o maior acúmulo ocorreu nas plantas submetidas à DAM – 2,5 (1249,61 mg kg⁻¹), porém o índice de translocação foi maior nos tratamentos com água. A translocação para a parte aérea desta espécie diminuiu gradualmente com o aumento do pH do meio. O acúmulo de manganês por *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* foi maior nos tratamentos DAM e água 4,5. A quantidade de manganês translocado para as folhas de *P. stratiotes* foi da ordem de 70% em DAM – 4,5 e 77% em água – 4,5; as plantas crescidas em água pH 6,5 (Controle) apresentaram o menor índice em relação aos demais tratamentos (18,6%) (Figura 8).

Para o acúmulo de Mn, foi observada alta correlação com a absorção de Ni e Zn em *P. stratiotes*, enquanto que para as demais espécies a correlação, para todos os elementos analisados, não foi significativa a 5% de probabilidade (Tabela 3).

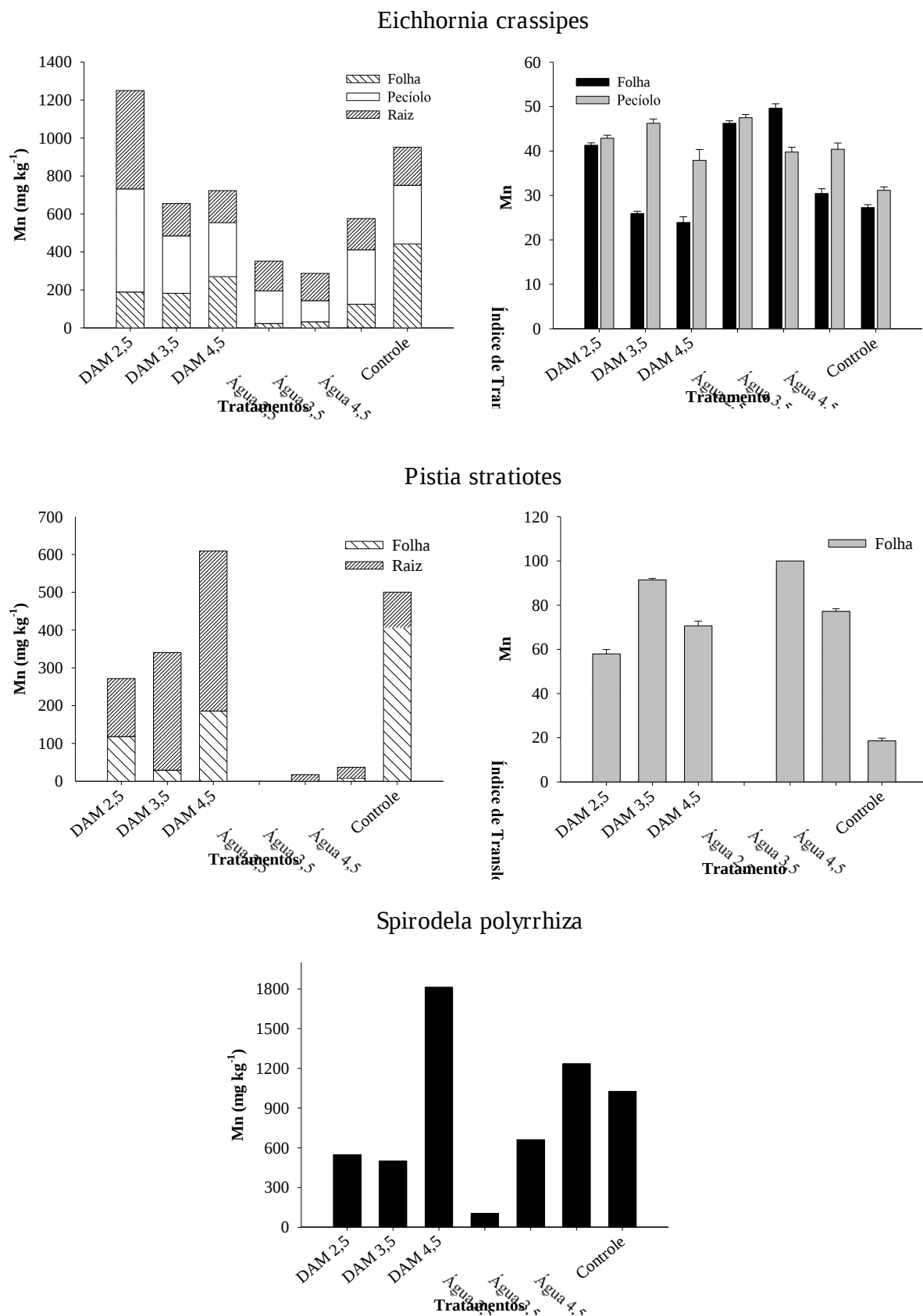


Figura 8 – Acúmulo e índice de translocação (%) de manganês (Mn) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

3.4.4. Níquel (Ni)

Concentrações de níquel só foram observadas em tratamentos contendo DAM (Figura 9). Para *E. crassipes* foi observado maior acúmulo ($50,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e a translocação de níquel para a parte aérea em pH 2,5 (61,7%). O pecíolo foi o órgão para o qual houve maior translocação deste elemento. Para *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* o acúmulo foi diretamente proporcional ao aumento do pH com Índice de Translocação em *P. stratiotes* de 89% no tratamento DAM – 3,5.

Do acúmulo de Ni, houve correlação positiva com Zn, Cu e Mn para *P. stratiotes*, enquanto que *S. polyrrhiza* observou-se apenas correlação significativa com o Zn (Tabela 3).

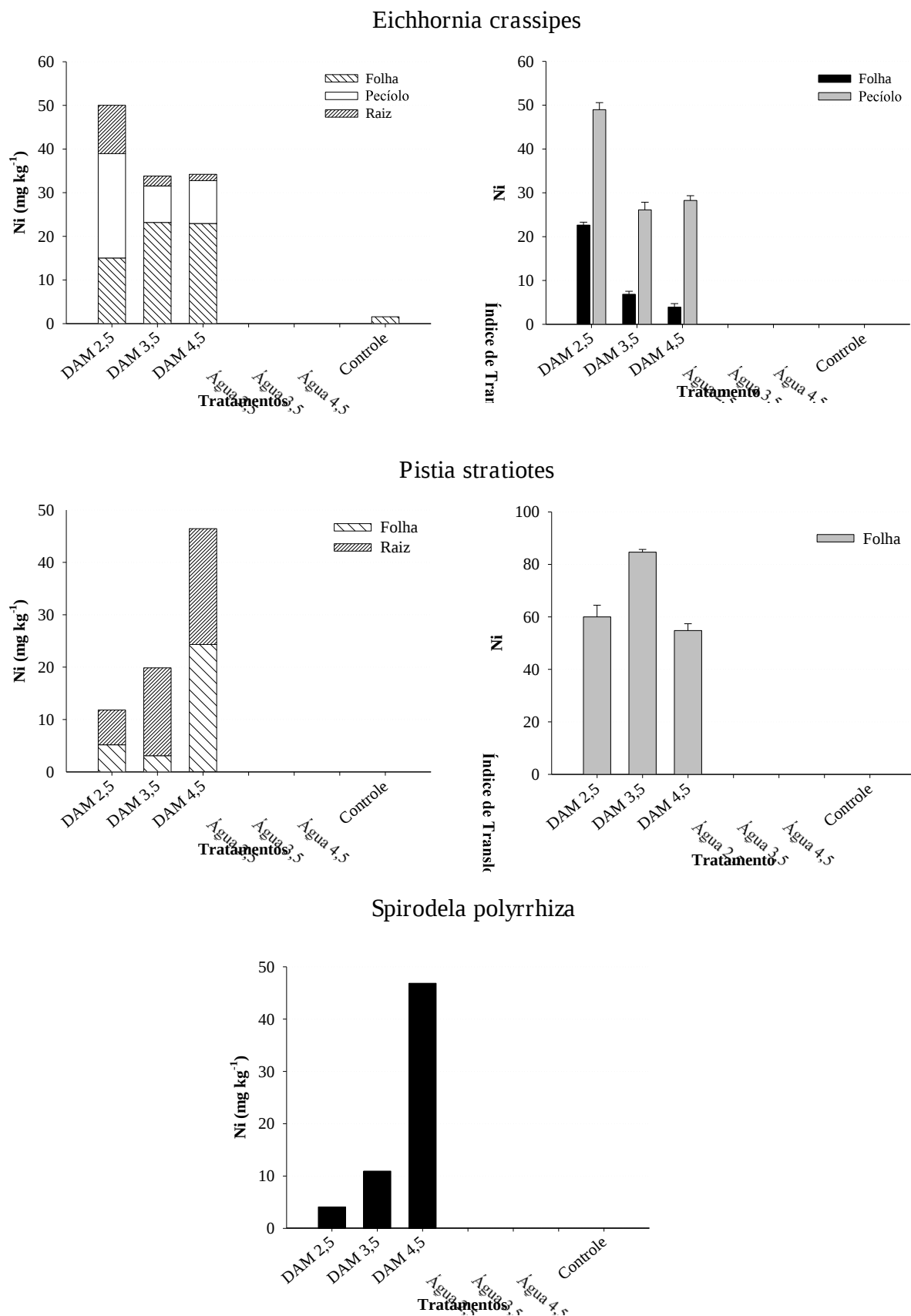


Figura 9 – Acúmulo e índice de translocação (%) de níquel (Ni) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

3.4.5. Zinco (Zn)

Os maiores valores de acúmulo de Zn foram encontrados nos tratamentos contendo DAM, para todas as espécies (Figura 10). Para *E. crassipes*, não houve diferença significativa entre a variação de pH em DAM. Nas demais situações, o acúmulo de zinco foi proporcional ao aumento do pH. O zinco translocado para a parte aérea de *E. crassipes* foi maior para o pecíolo, chegando a atingir um valor máximo de 58,8% no tratamento DAM 2,5. O Índice de Translocação, tanto para pecíolo quanto para folha dessa espécie, foi reduzido gradativamente com o aumento do pH. Para *P. stratiotes* o índice de translocação exibiu comportamento semelhante, com maior translocação para a folha quando cultivadas em soluções com DAM, com decréscimo no índice com o aumento do pH.

O Zn apresentou alta correlação com o acúmulo de Cu, Mn e Ni em *P. stratiotes*, enquanto a correlação foi negativa com o Fe. Já para *S. polyrrhiza* a correlação foi alta apenas com o acúmulo de Ni.

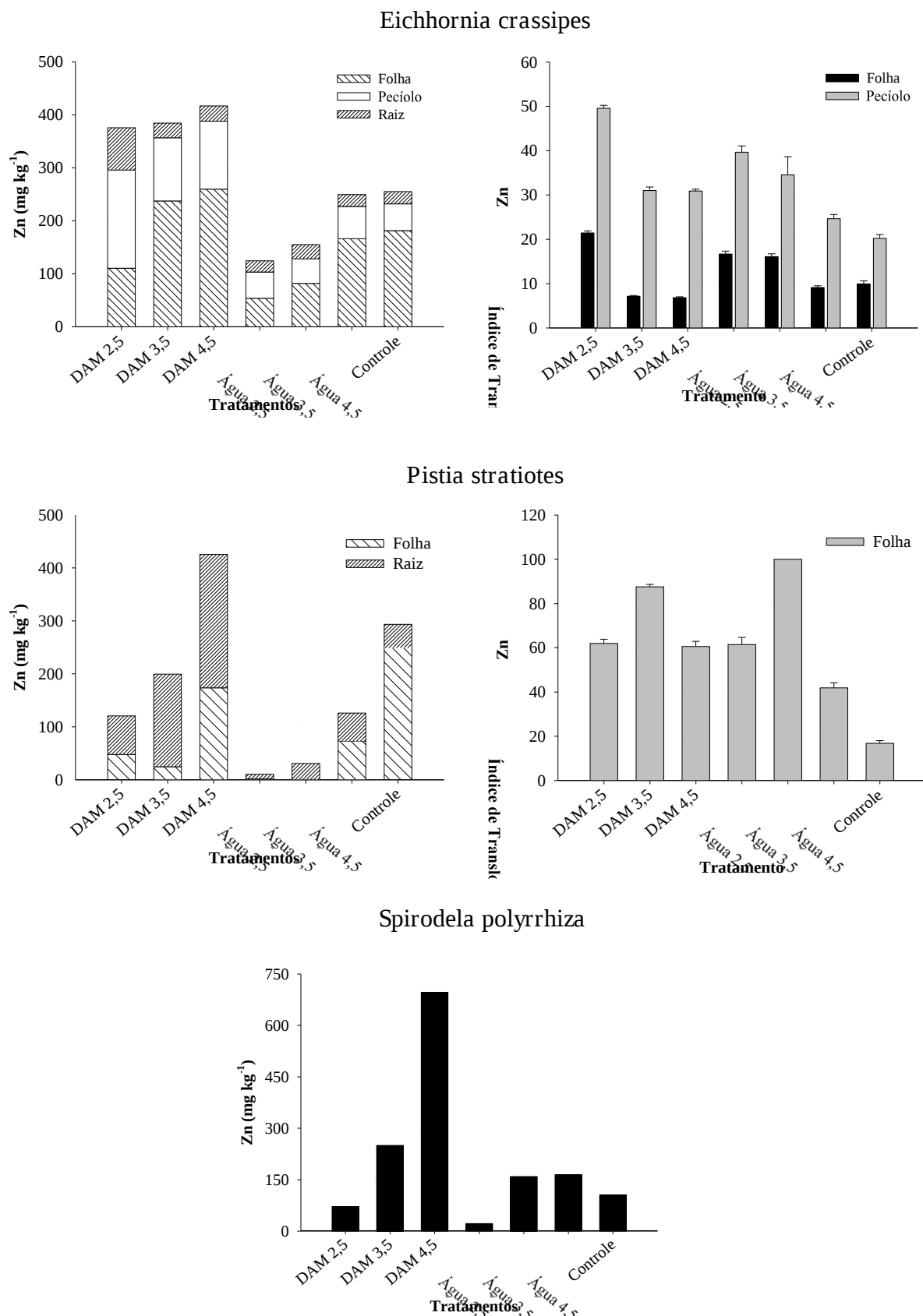


Figura 10 – Acúmulo e índice de translocação (%) de zinco (Zn) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

3.4.6. Arsênio (As)

Maior acúmulo de arsênio (Figura 11) foi observado nos tratamentos com DAM, sendo que o aumento do pH diminui a absorção de As para as três espécies avaliadas. Vale salientar que *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* apresentaram elevada absorção pela biomassa morta. *E. crassipes* acumulou ($5965,74 \text{ mg kg}^{-1}$) e translocou arsênio em maior quantidade para o tratamento com DAM – 2,5 (5,3%). Entretanto, a translocação de As foi pequena e a maior parte do metalóide permaneceu acumulada nas raízes de *E. crassipes*.

Nas três espécies de macrófitas estudadas foi observada alta correlação com a absorção de Fe, enquanto que para Cu a correlação foi negativa (Tabela 3).

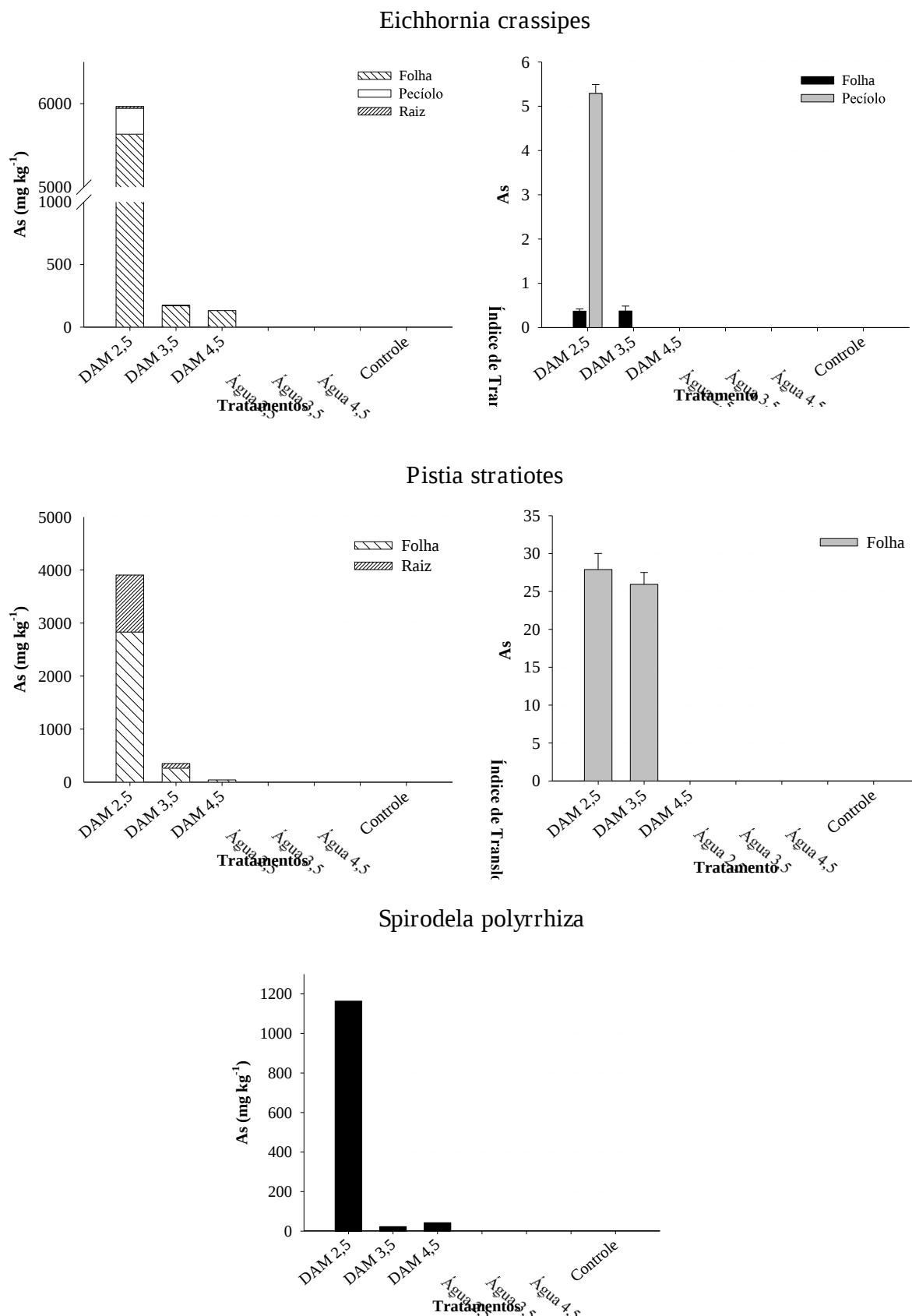


Figura 11 – Acúmulo e índice de translocação (%) de arsênio (As) em *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, após 72 horas de cultivo em soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) e água em faixas de pH.

Tabela 2 – Acúmulo dos metais no início e ao final do período de exposição de *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* aos meios de crescimento.

Meio	pH	Cobre (Cu) (mg Kg ⁻¹)							
		Eichhornia crassipes				Pistia stratiotes			Spirodela polyrrhiza
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM**	2,5	11,87 ab*	19,10 ab	56,96 c	87,93 b	12,18 b	2,02 c	14,20 c	92,20 c
	3,5	13,93 a	25,05 a	220,33 b	259,31 a	82,88 a	32,92 b	115,80 b	380,15 a
	4,5	1,39 cd	11,62 b	277,39 a	290,40 a	60,41 a	158,08 a	218,49 a	186,85 b
Água	2,5	6,66 cb	0,29 c	23,08 d	30,02 c	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,35 d
	3,5	12,80 a	0,51 c	18,28 d	31,59 c	0,00 b	0,00 c	0,00 c	3,50 d
	4,5	0,00 d	0,68 c	30,76 cd	31,44 c	0,00 b	0,00 c	0,00 c	7,30 d
Controle	6,5	15,37 a	0,18 c	32,90 cd	48,45 c	0,03 b	0,00 c	0,03 c	2,65 d
Ferro (Fe) (mg Kg ⁻¹)									
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM	2,5	832,42 a	3688,15 a	23149,28 a	27669,84 a	11288,46 a	19499,96 a	30788,42 a	39928,80 a
	3,5	82,71 b	163,43 b	3620,53 b	3866,68 b	4907,52 b	9040,03 b	13947,55 b	1348,65 b
	4,5	35,87 b	78,53 b	3073,49 b	3187,89 b	368,09 c	1219,23c	1587,32 c	1711,65 b
Água	2,5	46,71 b	40,41 b	884,21 b	971,33 b	127,01 c	45,12 d	172,13 d	1432,80 b
	3,5	97,55 b	48,64 b	1162,82 b	1309,00 b	268,18 c	181,57 d	449,75 d	1054,30 b
	4,5	54,97 b	65,83 b	2025,66 b	2146,45 b	208,88 c	2269,84 c	2478,72 c	861,55 b
Controle	6,5	62,68 b	49,61 b	950,96 b	1063,25 b	139,89 c	991,41 c	1131,30 c	612,95 b
Manganês (Mn) (mg Kg ⁻¹)									
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM	2,5	517,75 a	542,71 a	189,15 b	1249,61 a	153,29 c	118,29 bc	271,58 b	548,00 bc
	3,5	169,98 ab	302,52 ab	182,34 b	654,84 bc	311,32 b	29,20 cd	340,52 b	501,60 bc
	4,5	168,88 ab	284,05 ab	270,18 a	723,11 bc	423,60 a	185,54 b	609,14 a	1812,75 a
Água	2,5	157,35 ab	171,22 b	23,26 c	351,84 bc	0,00 e	0,00 d	0,00 c	105,70 c
	3,5	143,37 b	111,71 b	32,09 c	287,17 c	17,20 e	0,00 d	17,20 c	661,60 bc
	4,5	164,13 ab	286,81 ab	124,85 b	654,79 bc	28,56 e	3,19 d	31,74 c	1236,10 ab
Controle	6,5	200,12 ab	308,51 ab	442,48 a	951,12 b	93,66 d	406,49 a	500,14 a	1026,75 ab

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade; ** DAM: drenagem ácida de mina.

Tabela 2 – Continuação

Meio	pH	Níquel (Ni) (mg Kg ⁻¹)							
		Eichhornia crassipes				Pistia stratiotes			Spirodela polyrrhiza
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM	2,5	11,08 a	23,91 a	15,03 a	50,02 a	6,64 c	5,18 b	11,82 b	4,10 b
	3,5	2,26 b	8,38 b	23,17 a	33,81 b	16,77 b	3,10 b	19,87 b	10,95 b
	4,5	1,43 b	9,83 b	22,94 a	34,20 b	26,69 a	24,32 a	51,01 a	46,85 a
Água	2,5	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
	3,5	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
	4,5	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
Controle	6,5	0,00 b	0,00 c	1,57 b	1,57 c	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
Zinco (Zn) (mg Kg ⁻¹)									
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM	2,5	79,88 a	185,28 a	110,39 cd	375,56 a	73,05 c	47,60 b	120,65 cd	71,30 c
	3,5	27,76 b	119,14 b	237,49 ab	384,39 a	174,87 b	24,65 b	199,52 bc	249,85 b
	4,5	28,73 b	128,35 b	259,70 a	416,78 a	251,87 a	173,67 a	425,53 a	695,85 a
Água	2,5	21,05 b	49,57 c	53,72 d	124,35 c	8,64 e	1,68 c	10,32 e	22,00 c
	3,5	26,87 b	46,36 c	81,73 d	154,96 bc	30,64 de	0,00 c	30,64 de	159,05 bc
	4,5	22,51 b	60,83 c	166,14 bc	249,48 b	53,02 cd	72,98 b	126,00 cd	164,60 bc
Controle	6,5	23,17 b	50,49 c	181,43 abc	255,09 b	44,34 cd	249,18 a	293,52 b	105,60 c
Arsênio (As) (mg Kg ⁻¹)									
		Folha	Pecíolo	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total	Total
DAM	2,5	20,83 a	311,46 a	5633,44 a	5965,73 a	1076,19 a	2829,83 a	3906,02 a	1163,80 a
	3,5	0,61 b	0,00 b	172,64 b	173,25 b	88,99 b	262,32 b	351,32 b	22,80 b
	4,5	0,00 b	0,00 b	132,01 b	132,01 b	0,00 c	42,15 b	42,15 c	42,60 b
Água	2,5	0,00 b	0,00 b	2,63 b	2,63 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
	3,5	0,02 b	0,00 b	0,04 b	0,06 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
	4,5	0,00 b	0,00 b	1,10 b	1,10 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Controle	6,5	0,64 b	2,08 b	0,00 b	2,72 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade; ** DAM: drenagem ácida de mina.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os metais concentrados nos órgãos de *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza* que se desenvolveram em drenagem ácida de mina (DAM).

E. crassipes						
	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As
Cu	-					
Fe	-0.94	-				
Mn	-0.71	0.74	-			
Ni	-0.66	0.75	0.60	-		
Zn	0.32	-0.29	0.08	0.08	-	
As	-0.93	0.99	0.69	0.75	-0.27	-
P. stratiotes						
	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As
Cu	-					
Fe	-0.85	-				
Mn	0.88	-0.72	-			
Ni	0.92	-0.76	0.97	-		
Zn	0.92	-0.80	0.98	0.98	-	
As	-0.77	0.93	-0.57	-0.59	-0.65	-
S. polyrrhiza						
	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As
Cu	-					
Fe	-0.69	-				
Mn	-0.36	-0.35	-			
Ni	0.04	-0.56	0.45	-		
Zn	0.15	-0.66	0.48	0.98	-	
As	-0.69	0.99	-0.35	-0.55	-0.66	-

4. DISCUSSÃO

Durante o período de exposição aos tratamentos, os sintomas de toxicidade foram registrados nas folhas das três espécies de macrófitas estudadas. A sintomatologia foi caracterizada pela ocorrência de murcha, com evolução para necrose foliar, a qual resulta na morte das células do mesofilo.

A fitotoxicidade apresentada pelas plantas pode ser atribuída, particularmente, a dois aspectos: ao pH ácido e à presença de íons metálicos na solução com efeito nocivo para as células da planta, resultando em alterações morfológicas, fisiológicas e murcha das plantas (Soltan & Rashed, 2003). Na drenagem ácida, as concentrações dos elementos químicos vão variar de acordo com a composição do depósito de minério, sendo que a carga de metais que é carregada para o ambiente caracteriza fator mais importante do que a acidez (Sheoran & Sheoran, 2006; Mishra et al., 2008a).

De modo geral, as plantas de *E. crassipes* foram as mais resistentes em relação às demais espécies, quando cultivadas em pH mais ácido, independente das soluções onde as plantas cresceram. Por outro lado, *P. stratiotes* se mostrou mais sensível à DAM e valores de pH abaixo de 3,5. Para *S. polyrrhiza* o comportamento foi intermediário, e as plantas apresentaram sensibilidade aos meios com pH 2,5.

Os metais Cu, Zn, Mn, Fe e Ni são micronutrientes essenciais para as plantas. Porém, em concentrações muito elevadas, tais elementos podem ser considerados tóxicos, da mesma maneira que os elementos não essenciais como Cd, Hg, Pb e As (Kunze et al., 2002; Zhang et al., 2002).

As plantas apresentam diversos mecanismos para responder, combater e superar as adversidades ambientais com redução da fitotoxicidade por meio de mecanismos que variam desde adaptação, limitação de absorção, desintoxicação e/ou até mesmo a resistência genética (Salt et al., 1998).

Com a redução da área foliar os efeitos da toxicidade sobre a produção de pigmentos fotossintéticos foi prejudicada, em especial nos tratamentos contendo drenagem ácida. No entanto, *E. crassipes* apresentou os maiores teores de clorofila total e carotenóides quando submetida a drenagem ácida em pH acima de 3,5. Marschner (1995) relatou que o aumento na produção de pigmentos fotossintéticos pode estar relacionado à elevada concentração, no meio, de elementos que são essenciais para a síntese desses produtos, como o ferro (Keller & Hammer, 2004). Portanto, é possível que a composição da DAM tenha estimulado a produção de pigmentos fotossintéticos para *E. crassipes*. Quando plantas de *Lemna polyrrhiza* foram submetidas ao Zn, Ni e

Pb, houve acréscimo no teor de clorofila em 48 h de exposição, porém após este período, este teor diminuiu (Sharma & Gaur, 1995). Da mesma maneira, em *Lemna minor* tratada com 0,05 mg L⁻¹ de Cu²⁺, a produção de pigmentos fotossintéticos foi estimulada, porém acima dessa concentração, as plantas passaram a apresentar decréscimo neste aspecto (Hou et al., 2007). No entanto, a maior parte dos trabalhos relata a diminuição no teor de clorofila quando plantas aquáticas são expostas a metais pesados, como o Fe, Cu, Zn, Cd, Cr, Ni e Pb (Mishra & Tripathi, 2008; Gardea-Torresdey et al., 2005; Manios et al., 2003; Sharma & Gaur, 1995).

Apesar dos aumentos nos teores de clorofila total e carotenóides em plantas de *E. crassipes* submetidas à DAM, não houve aumento na produtividade, ou seja, o acréscimo na produção de clorofila não resultou, necessariamente, em maior produção de fotoassimilados. Independente do teor de pigmentos, o período de 72 h de exposição não foi suficiente para serem observadas alterações significativas na produtividade das três espécies de macrófitas estudadas. A curva de crescimento para estas espécies, em condições normais de cultivo – solução de Clark (1975) e pH entre 5,0 e 6,0 – resultou na produtividade média para *E. crassipes* de 6,73 g m²/dia, para *P. stratiotes* de 4,01 g m²/dia e para *S. polyrrhiza*, 0,43 g m²/dia. Desta forma, pode-se afirmar que a redução na produtividade das plantas expostas aos meios de cultivo ácidos e DAM, foi o resultado da perda de raízes e da morte do tecido foliar, e não a inibição no desenvolvimento da planta.

A sensibilidade de *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* à acidez e às soluções de DAM resultaram na morte dos indivíduos submetidos ao estresse. Não obstante, verificou-se o acúmulo dos metais estudados em quantidades significativas nos tecidos mortos das plantas. Weis & Weis (2004) relataram que tecidos senescentes podem se tornar detritos e fontes de elementos contaminantes, e afirmaram que a concentração de metais aumentou em plantas mortas e nos detritos durante a sua decomposição, especialmente pela adsorção e pela imobilização dos contaminantes pelos microorganismos.

A ordem da concentração dos elementos presentes nas soluções contendo DAM foi: Fe > Mn > As > Zn > Ni > Cu. Enquanto que nas três espécies estudadas, observou-se a seguinte ordem de acúmulo dos elementos: Fe > As > Mn > Zn > Cu > Ni.

Vários fatores podem afetar a absorção e a distribuição dos metais nas plantas. Entre eles podem ser citadas as propriedades físico-químicas dos contaminantes (solubilidade, peso molecular, coeficiente de partição), a temperatura, as propriedades do meio (matéria orgânica, pH, dureza), e as características das plantas (sistema radicular, área foliar). Além disso a remoção dos metais pode ser limitada pela

disponibilidade para a planta, com base na solubilidade e difusão do elemento pela raiz (Clemens et al., 2002; Lombi et al., 2001).

Apesar do aumento da concentração de todos os metais na biomassa seca das três espécies em relação aos devidos controles, foi observado que Cu, Mn, Ni e Zn mantiveram ou aumentaram suas concentrações nas soluções após a exposição das macrófitas aquáticas a DAM, enquanto que apenas Fe e As apresentaram redução das suas concentrações nas soluções. Soltan & Rached (2003) atribuíram o aumento da concentração de metais na solução, após a exposição de plantas aquáticas, à liberação dos metais que estavam presentes na matéria morta das plantas na solução.

A remoção de metais do meio aquático pelas macrófitas aquáticas pode apresentar três diferentes padrões: (a) exclusão, onde os metais são impedidos de entrar na planta, e ficam aderidos à superfície das raízes; (b) restrição, os metais ficam acumulados nas raízes, mas a translocação para a parte aérea é limitada ou nula; (c) acumulação, quando os metais se concentram nas partes das plantas (Mishra & Tripathi, 2008; Prasad, 2001).

E. crassipes acumulou maior quantidade de Fe, Mn, Ni e As em pH 2,5, quando estes elementos apresentavam maior concentração e disponibilidade para serem absorvidos pelas plantas. A solubilidade de metais normalmente tende a aumentar com a diminuição do pH, em especial para Fe e Mn (Salt et al., 1995). Cobre e zinco foram mais absorvidos em pH acima de 3,5 nas três espécies. *Pistia stratiotes* e *S. polyrrhiza* não sobreviveram em pH 2,5, porém, acumularam quantidades significativas de Fe, Mn, Ni e As na matéria morta das plantas. Para que um elemento seja removido do meio é necessário que haja absorção ou adsorção superficial - combinação de processos químicos como quelação, troca iônica e adsorção específica – que ocorre independente da atividade biológica das plantas (Breteler et al., 1981; Rai et al., 1995; Salt et al., 1995).

Entre os elementos estudados, o Fe foi acumulado em maior quantidade pelas três espécies. Resultado semelhante foi obtido por Mishra & Tripathi (2008), que observaram maior acúmulo de Fe em *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza*, quando expostas a soluções que continham concentrações crescentes de ferro. Ao quantificar os metais acumulados nas partes das plantas de *E. crassipes* e *P. stratiotes* (parte aérea e raiz), observou-se que Fe, Cu, Ni, Zn e As estavam concentrados em maior quantidade nas raízes. Possivelmente grande parte do Fe quantificado estava presente na forma de placas de ferro nas raízes e não como Fe acumulado (Rai, 2009; Hansel et al., 2001; Vesik et al., 1999). A formação de placas de ferro é uma adaptação fisiológica de plantas

aquáticas, as quais translocam oxigênio da parte aérea para as raízes através do aerênquima, e consequentemente libera oxigênio na rizosfera. Neste estado oxidativo das raízes ocorre a oxidação do ferro presente no meio aquático, formando o precipitado de (hidr)óxido de ferro na epiderme da raiz (Hansel et al., 2001; Green & Etherington, 1977). Com a formação da placa de ferro, pode-se inferir que o Cu, Ni, Zn e As aderiram à placa, uma vez que estes foram encontrados em maior quantidade nas raízes. Estudos têm confirmado que a placa de ferro é capaz de formar uma barreira que imobiliza e restringe a absorção de elementos fitotóxicos, tais como Zn, Cu, Cd, Pb, Ni e As (Taggart et al., 2009; Panich-Pat et al., 2004; Batty et al., 2000; Vesik et al., 1999; Otte et al., 1989; Taylor & Crowder, 1983).

A translocação para a parte aérea de *E. crassipes* foi mais significativa para Mn, demonstrando mobilidade, visto que esse elemento não foi contido pela placa de Fe formada nas raízes (Karanthanas & Johnson, 2003). Contudo, os elementos Cu e Fe foram os que menos se translocaram nas plantas. Dushenkov et al. (1995) afirmou que plantas aquáticas são ineficientes na translocação de metais para a parte aérea e podem apresentar riscos na recontaminação do meio, porém são altamente eficientes no processo de rizofiltração.

A absorção de metais é aumentada com a produção de tióis, fitoquelatinas, surfactantes, ou combinações de metais no meio aquático que podem exercer sinergismo ou antagonismo com a absorção. Quando os íons metálicos são absorvidos pela raiz, podem ser acumulados ou exportados para a parte aérea. O transporte para a parte aérea ocorre por meio do xilema após atravessar a estria de Caspary, que divide a endoderme da epiderme, formando uma barreira impermeabilizante. O movimento dos metais ocorre via simplasto, portanto o transporte dos íons pela endoderme é limitante para o translocação até a parte aérea. As células xilemáticas apresentam elevada capacidade de troca catiônica que retardam o movimento de cátions metálicos, e neste caso, complexos quelantes, ácidos orgânicos e fitoquelatinas facilitam essa passagem (Weis & Weis, 2004; Salt et al., 1995).

Entre os elementos estudados nesta pesquisa, o As é o único que não participa de funções metabólicas nas plantas e representa elevado risco de toxicidade mesmo em baixas concentrações (Sharma & Sohn, 2009). Porém, pode ser acumulado por espécies vegetais por ser quimicamente similar ao fósforo, e ser absorvido indevidamente (Pilon-Smits, 2005). O acúmulo de arsênio nos tecidos das três espécies apresentou forte correlação com a absorção de Fe, evidenciando sinergismo entre os dois elementos, como relatado por Rahman et al. (2008) com *Salvinia natans*. Robinson et al., (2006)

também obteve o mesmo resultado com diversas espécies de plantas aquáticas, e Rahman et al. (2007) quando avaliaram *S. polyrrhiza* submetida a concentrações de Fe e As. Essa correlação positiva pode ser resultado da incorporação do As nos óxidos de Fe presentes na superfície das raízes (Chen et al., 2005; Blute et al., 2004).

5. CONCLUSÃO

E. crassipes se mostrou mais tolerante aos efeitos da drenagem ácida de mina que as demais espécies estudadas, que foram susceptíveis aos baixos valores de pH e elevada concentração de metais. Os teores de pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* foram menos afetados que os de *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza*, no entanto as três espécies tiveram decréscimos nos valores de biomassa seca quando submetidas a baixo pH e drenagem ácida de mina.

O acúmulo de metais e arsênio, presentes nos tratamentos contendo drenagem ácida de mina – independente do pH - foi significativo nas três espécies, com maior acúmulo nas raízes de *E. crassipes* e *P. stratiotes*, o que caracteriza essas espécies como potenciais para rizofiltração de ambientes aquáticos contaminados.

Entre as três espécies estudadas, *E. crassipes* demonstrou mais capacidade de sobreviver e acumular os metais presentes nas soluções contendo drenagem ácida de mina, independente do pH.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. 1998. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22:21-26.
- BATTY, L.C.; BAKER, A.J.M.; WHEELER, B.D.; CURTIS, C.D. 2000. The effect of pH and plaque on the uptake of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. **Annals of Botany**, 86:647-653.
- BLUTE, N.K.; BRABANDER, D.J.; HEMOND, H.F.; SUTTON, S.R.; NEWVILLE, M.G.; RIVERS, M.L. 2004. Arsenic sequestration by ferric iron plaque on cattail roots. **Environmental Science & Technology**. 38:6074–6077.
- BRETELER, R.J.; TEAL, J.M.; GIBLIN, A.E.; VALIELA, I. 1981. Trace element enrichments in decomposing litter of *Spartina alterniflora*. **Aquatic Botany**, 11:111-120.
- CARDWELL, A.; HAWKER, D.; GREENWAY, M. 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. **Chemosphere**, 48:653–663.
- CHEN, Z.; ZHU, Y.G.; LIU, W.J.; MEHARG, A.A. 2005. Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. **New Phytologist**, 165:91–97.
- CLARK, R.B. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal agricultural Food Chemistry**, 23:458-460.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, 17(7):309-315.
- BRASIL. **Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005**. Resolução do CONAMA para a classificação de águas de acordo com sua composição e os teores máximos de substâncias potencialmente prejudiciais. São Paulo. Legislação: Publicado no DOU de 03 de julho de 1986, p. 5-6, 2005.
- DUSHENKOV V, KUMAR PBAN, MOTTO H, RASKIN I. 1995. Rhizofiltration—the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. **Environmental Science Technology**, 29:1239–45.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L; PERALTA-VIDEA, J.R.; ROSA, G.; PARSONS, J.G. 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, 249:1797–1810.

- GRAY, N.F. 1997. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. **Environmental Geology**, 30:62-71.
- GREEN, M.S.; ETHERINGTON, J.R. 1977. Oxidation of ferrous iron by rice (*Oryza sativa* L.) roots: a mechanism for waterlogging tolerance? **Journal of Experimental Botany**, 28 (3): 678-690
- HANSEL, C.M.; FENDORF, S.; SUTTON, S.; NEWVILLE, M. 2001. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. **Environmental Science Technology**, 35:3863-3868.
- HOU, W; CHEN, X.; SONG, G.; WANG, Q.; CHANG, C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:62-69.
- KARANTHANASIS, A.D.; JOHNSON, C.M. 2003. Metal removal potential by three aquatic plants in an acid mine drainage wetland. **Mine Water and the Environment**, 22:22-30.
- KELLER, C.; HAMMER, D. 2004. Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. **Environmental Pollution**, 131:243-254.
- KUNZE, R.; FROMMER, W.B.; FLÜGGE, U.I. 2002. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. **Metabolic Engineering**, 4:57-66
- LASAT, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, 31:109-120.
- LIU, J.; DONG, Y.; XU, H.; WANG, D.; XU, J. 2007. Accumulation of Cd, Pb and Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland. **Journal of Hazardous Materials**, 147:947-953.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; DUNHAM, S.J.; MCGRATH, S.P. 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. **Journal of Environmental Quality**, 30: 1919-1026.
- MAINE, M.; DUARTE, M.; SUNE, N. 2000. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research**, 35:2629–2634.
- MANIOS, T.; STENTIFORD, E.I.; MILLNER, P.A. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. **Ecological Engineering**, 20:65-74.
- MARSCHNER, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, London. Second ed. 889p.

- MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; FERNANDEZ CIRELLI, A. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, 57:997–1005.
- MISHRA, V.K.; TRIPATHI, B.D. 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, 99:7091–7097.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAYA, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. 2008a. Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar and anthropogenic lake affected by coal mining effluent. **Environmental Monitoring and Assessment**, 141:49–58
- MISHRA, V.K.; UPADHYAYA, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. 2008b. Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, 99:930–936.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAY, A.R.; PATHAK, V.; TRIPATHI, B.D. 2008c. Phytoremediation of mercury and arsenic from tropical opencast coalmine effluente through naturally occurring aquatic macrophytes. **Water, Air, Soil Pollution**, 192:303–314
- ODJEGBA, V.J.; FASIDI, I.O. 2004. Accumulation of trace elements by Pistia stratiotes: implications for phytoremediation. **Ecotoxicology**, 13:637–646.
- OLIVARES-RIEUMONT, S.; LIMA, L.; DE LA ROSA, D.; GRAHAM, D.W.; COLUMBIE, I.; SANTANA, J.L.; SÁNCHEZ, M.J. 2007. Water hyacinths (Eichhornia crassipes) as indicators of heavy metal impact of a large landfill on the Almendares river near Havana, Cuba. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, 79:583–587.
- OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; JORDÃO, C. P. 2001. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13(3): 329–341.
- OTTE, M.L.; ROZEMA, J.; KOSTER, L.; HAARSMA, M.S.; BROEKMAN, R.A. 1989. Iron plaque on roots of Aster tripolium L.: interaction with Zn uptake. **New Phytologist**, 111:309–317
- PANICH-PAT, T.; POKETHITIYOOK, P.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; SRINIVES, P; LANZA, G.R. 2004. Removal of lead from contaminated soils by Typha angustifolia. **Water, Air, and Soil Pollution**, 155:159–171.

- PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, 56:15–39
- PRASAD, M.N.V.; GREGER, M.; SMITH, B.N. Aquatic macrophytes. In: Prasad, M.N.V. (ed). **Metals in the environment - Analysis by biodiversity**. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001. p. 259-288.
- RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H.; UEDA, K.; MAKI, T.; OKUMURA, C.; RAHMAN, M.M. 2007. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.): a good option for phytoremediation. **Chemosphere**, 69:493-499.
- RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H.; UEDA, K.; MAKI, T.; RAHMAN, M.M. 2008. Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. **Journal of Hazardous Materials**, 160:356–361
- RAI, P.K. 2009. Heavy metals in water, sediments and wetland plants in an aquatic ecosystem of tropical industrial region, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, 158:433-457.
- RAI, U.N.; SINHA, S.; TRIPATHI, R.D.; CHANDRA, P. 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. **Ecological Engineering**, 5:5-12.
- ROBINSON, B.; DUWIG, C.; BOLAN, N.; KANNATHASAN, M.; SARAVANAN, A. 2003. Uptake of arsenic by New Zealand watercress (*Lepidium sativum*). **Science of the Total Environment**, 301:67–73.
- SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.B.A.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, I.; RASKIN, I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, 13:468-474.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:643-68
- SHARMA, S.S.; GAUR, J.P. 1995. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. **Ecological Engineering**, 4:37-43.
- SHARMA, V.K.; SOHN, M. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environment International**, 35:743-759.
- SHEORAN, A.S.; SHEORAN, V. 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainagem in wetlands: a critical review. **Minerals Engineering**, 19:105-116.
- SOLTAN, M.E.; RASHED, M.N. 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. **Advances in Environmental Research**, 7:321-334.

- TAGGART, M.A.; MATEO, R.; CHARNOCK, J.M.; BAHRAMI, F.; GREEN, A.J.; MEHARG, A.A. 2009. Arsenic rich iron plaque on macrophyte roots – an ecotoxicological risk? **Environmental Pollution**, 157:946-954.
- TAYLOR, G.J.; CROWDER, A.A. 1983. Uptake and accumulation of copper, nickel and iron by *Typha latifolia* L. grown in solution culture. **Canadian Journal of Botany**, 61:1825–1830
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.
- VESK, P.A.; NOCKOLDS, C.E.; ALLAWAY, W.G. 1999. Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. **Plant, Cell and Environment**, 22:149-158.
- WEIS, J.S.; WEIS, P. 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. **Environment International**, 30:685-700
- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, 144:307-313.
- ZARANYIKA, M.F.; NDAPWADZA, T. 1995. Uptake of Ni, Zn, Fe, Co, Cr, Pb, Cu and Cd by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Mukuvisi and Manyame Rivers, Zimbabwe. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, 30, 157-169.
- ZHANG, W.; CAI, Y.; TU, G.; MA, L.Q. 2002. Arsenic speciation and distribution in a arsenic hyperaccumulating plant. **The Science of the Total Environment**, 300:167-177.
- ZOCHE, J.J.; FREITAS, M.; QUADROS, K.E. 2010. Concentração de Zn e Mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). **Revista Árvore**, 34(1):177-188.

CAPÍTULO II

Efeito de drenagem ácida de mina sobre o acúmulo e nas características morfo-anatômicas de *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza*.

Efeito de drenagem ácida de mina sobre o acúmulo e nas características morfo-anatômicas de *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza*.

RESUMO

Ecossistemas aquáticos são receptores de efluentes altamente contaminantes, que podem levar à acidificação e ao aumento na concentração de metais. Apesar da natureza multifator da drenagem ácida de mina (DAM), seu impacto no ecossistema aquático pode ser minimizado pela capacidade tamponante do corpo receptor. *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza* apresentam plasticidade em termos de adaptação a diversos ambientes. Desta maneira, este trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade de *E. crassipes* e *S. polyrrhiza* em acumular metais presentes na DAM e avaliar os efeitos tóxicos sobre o crescimento e características morfo-anatômicas. Indivíduos das duas espécies foram submetidos, durante 12 dias, a soluções contendo diluições de DAM em água (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). *Eichhornia crassipes* e *S. polyrrhiza* tiveram seu desenvolvimento comprometido com o aumento da porcentagem de DAM nas soluções, com reduções de 30% e 46% na biomassa seca, respectivamente. O teor de pigmentos fotossintéticos em *S. polyrrhiza* apresentou reduções a partir de 25% de DAM na solução, enquanto que *E. crassipes* não apresentou efeitos nesta variável. As duas espécies acumularam os metais avaliados (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As). *Eichhornia crassipes* acumulou Cu, Fe, Mn e As proporcionalmente à porcentagem de DAM na solução. *Spirodela polyrrhiza* teve variações no acúmulo dos metais devido à morte de indivíduos após a exposição à DAM. *Eichhornia crassipes* translocou a maior parte de Mn, Ni e Zn absorvidos, enquanto que os demais metais, Cu, Fe e As, foram acumulados nas raízes. Os efeitos morfo-anatômicos em *S. polyrrhiza* incluem a necrose nas folhas e danos na epiderme da raiz, contudo sem efeitos nas células do parênquima e do cilindro vascular; em *E. crassipes* houve o aumento das lacunas do aerênquima e no número de idioblastos contendo compostos fenólicos nas folhas e nas raízes, no entanto neste último ocorreu o aumento no comprimento das lacunas do aerênquima e diminuição na região medular. Entre as espécies estudadas, apenas *E. crassipes* foi capaz de sobreviver em soluções contendo DAM sem apresentar danos severos em sua morfologia, porém, teve desenvolvimento inibido com o aumento da porcentagem de DAM. Sugere-se que *E. crassipes* pode ser utilizada como planta rizofiltradora em ecossistemas aquáticos receptores de DAM.

Palavras-chave: rizofiltração, metais, diluição, morfo-anatomia, *Eichhornia crassipes*, *Spirodela polyrrhiza*.

Acid mine drainage effects on anatomical characteristics of *Eichhornia crassipes* and *Spirodela polyrrhiza*.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are final receiver of effluents with high amounts of contaminants, which may lead to acidification and increase of toxic elements concentration. Despite the multifactor nature of acid mine drainage (ADM), its impact in aquatic environment can be diminished by receptor's buffering effect, further the AMD origin and volume that can be altered through production control and dilution. *Eichhornia crassipes* and *Spirodela polyrrhiza* shows plasticity on adapting in many aquatic environments, and possibly survive and develop in acid solutions with different metal concentration. In this way, the work objective was to evaluate *E. crassipes* and *S. polyrrhiza* capacity to accumulate metals present in AMD solutions, and its effect over growth characteristics and anatomical features. Therefore, both species were exposed, throughout twelve days, to solutions with AMD dilution in water (0%, 25%, 50%, 75% and 100%). *E. crassipes* e *S. polyrrhiza* had their growth affected with AMD percentage increase in solutions, and consequently more acid pH, with 30% and 46% reductions on dry weight biomass, respectively. Photosynthetic pigments content, in *S. polyrrhiza*, decreased when exposed to solution with AMD 25%, while *E. crassipes* did not showed harmful effects over this variable. Both species accumulated the studied elements (Cu, Fe, Mn, Ni and Zn); *E. crassipes* accumulated Cu, Fe, Mn and As proportionally to AMD percentage in solution; *S. polyrrhiza* had metal accumulation variations due to some specimen death when exposed to AMD. *E. crassipes* translocated to aerial part most of Mn, Ni and Zn absorbed, while Cu, Fe and As were located in roots. Among AMD effects over *S. polyrrhiza* anatomy are foliar necrosis and root epidermis injure, without harm on cortex and vascular cylinder; when *E. crassipes* was exposed to AMD aerenchyma size and the amount of phenolic compounds idioblast increased in leaves, and in roots the aerenchyma size also increased but the pith reduced. Among the two species, *E. crassipes* showed capacity to survive in AMD solutions without harmful effects on its morphology, but growth was inhibited through AMD percentage augmentation in water. In this way, *E. crassipes* may be used in rhizofiltration technique in aquatic systems contaminated with AMD.

Keywords: rhizofiltration, metals, dilution, morpho-anatomy, *Eichhornia crassipes*, *Spirodela polyrrhiza*.

1. INTRODUÇÃO

O efeito da drenagem ácida de mina (DAM) sobre a qualidade das águas superficiais e lençóis freáticos tem sido um grave problema em vários países. A DAM é o resultado da oxidação e hidrólise de minerais sulfetados na presença de água e oxigênio, com produção de ácido sulfúrico e liberação de diversos metais pesados e poluentes. O lixiviado apresenta baixo pH, com elevadas concentrações de ferro e sulfato, e outras variedades de metais que dependem da composição do minério (Valente & Gomes, 2009; Gray, 1998; Mello & Abrahão, 1998).

Ecossistemas aquáticos são os receptores finais de efluentes altamente contaminantes (Dhote & Dixit, 2009), que podem levar à acidificação, salinização, aumento da concentração de vários elementos considerados tóxicos e também a intensificação de processos de sedimentação no meio (Kanoun-Boulé et al., 2009; Gray, 1998). O impacto da DAM em sistemas aquáticos é considerado complexo devido à natureza multifator do impacto gerado (Gray, 1997), entre esses fatores, a carga de metais descarregada no meio aquático é o de maior relevância, com efeitos sobre as características físico-químicas da água e a biota (Sheoran & Sheoran, 2006; Mishra et al., 2008a).

Apesar da natureza multifator da drenagem ácida, o impacto do lixiviado pode ser amenizado pela capacidade tamponante do corpo receptor. Corpos d'água com baixa capacidade tamponante são mais afetados do que aqueles que apresentam maior dureza, no qual o principal impacto poderá ser a sedimentação (Gray 1997).

Plantas aquáticas vêm sendo utilizadas para auxiliar na recuperação de meios contaminados devido à sua intensa capacidade de absorção e rápido crescimento (Miretzky et al., 2004), com consequente melhora da qualidade da água e diminuição dos danos causados ao ambiente aquático (Rai et al., 1995), dentre estas a *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza*, as quais apresentam rápido crescimento e são acumuladoras de diversos elementos (Miretzky et al., 2004; Hasan et al., 2007; Mishra & Tripathi, 2008), no entanto, quando expostas a meios com concentrações elevadas de alguns elementos, podem surgir efeitos negativos sobre o seu crescimento e metabolismo, além de modificações morfo-anatômicas (Mahmood et al., 2005; Souza et al., 2009).

Estas espécies apresentam plasticidade na adaptação a diversos ambientes (Dhote & Dixit, 2009; Malik, 2007; Miretzky et al., 2004), e possivelmente sobrevivem e se desenvolvem em soluções com elevada acidez e variada concentração de metais.

Desta maneira, essa pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza* de acumular metais presentes na drenagem ácida de mina, e avaliar os efeitos tóxicos da drenagem com base em parâmetros de crescimento e anatômicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram selecionadas as espécies *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza*, submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 1, em condições de casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (DBV/UFV).

Tabela 1 – Tratamentos aplicados em *Eichhornia crassipes* e *Spirodela polyrrhiza* após diluições na drenagem ácida de mina (DAM) - % v/v – e os respectivos valores de pH e concentrações dos metais no início do período experimental.

Tratamento	pH	Concentração (mg L ⁻¹)					
		Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As ²
0% DAM + 100% água ¹	5,3 ± 0,4	0,024	0,720	0,096	0,003	0,025	-
25% DAM + 75% água	4,2 ± 0,2	0,110	2,713	2,162	0,115	0,917	-
50% DAM + 50% água	3,4 ± 0,2	0,188	4,081	3,906	0,217	1,699	-
75% DAM + 25% água	3,2 ± 0,2	0,271	6,317	5,934	0,333	2,568	-
100% DAM + 0% água	3,2 ± 0,3	0,350	7,681	7,598	0,431	3,348	-

¹Todos os tratamentos continham solução nutritiva de Clark (1975) a ¼ da força iônica; ² concentração de As abaixo dos limites de detecção.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com três repetições. Dois indivíduos de *E. crassipes* foram dispostos em cada vaso com capacidade para 10 L, e 3 g de *S. polyrrhiza* em vasos de 0,5 L, revestidos com sacos plásticos resistentes para evitar contaminação do recipiente.

Após 12 dias foram coletados discos de 0,59 cm² das folhas que se desenvolveram durante o experimento, para determinação de clorofila total e carotenóides conforme protocolo descrito por Wellburn (1994), utilizando-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator.

Para o estudo das alterações morfo-anatômicas de *E. crassipes*, foram coletadas amostras de folhas que se expandiram no decorrer do experimento, e de raízes que se

desenvolveram após a exposição das plantas às soluções de tratamento. Para *S. polyrrhiza*, coletou-se plantas do tratamento controle e plantas com injúrias expostas aos tratamentos.

As amostras foram lavadas em água corrente, fixadas em FAA₅₀, por 48 horas, e mantidas em etanol 70% até o momento da preparação de lâminas histológicas, de acordo com as técnicas de microscopia descritas por Johansen (1940).

O restante do material vegetal foi lavado durante um minuto, em água desionizada e separado em partes (raiz, pecíolo e folha, para *E. crassipes*). Os materiais foram colocados em sacos de papel devidamente identificados, e postos para secar em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C, até atingir massa constante. Em seguida, o material vegetal foi finamente triturado em moinho Willey. Frações do material foram adicionadas a frascos contendo 10 mL de solução ácida nitro:perclórica (3:1) e mantidos em pré-digestão à temperatura ambiente por período de 24 h (Tedesco et al., 1995). Posteriormente a essa fase, os frascos foram colocados em chapa aquecedora, com temperatura gradualmente elevada a 180 °C, permanecendo nesta temperatura até completa digestão da matéria orgânica.

O As acumulado em *E. crassipes* foi quantificado utilizando-se metodologia mais apurada, devido à presença do metalóide em concentrações muito baixas nas soluções. Desta forma, para a análise de arsênio (As) acumulado em *E. crassipes*, 1 g de amostra de cada parte da planta foi adicionada em tubos de TFM Teflon, juntamente com 10 mL de HNO₃ e 3 mL de HCl concentrados, sendo em seguida submetidas à irradiação de micro-ondas. O programa utilizado foi de 10 minutos para atingir 180 °C a 800W de potência, e 5 minutos de digestão com temperatura e pressão constantes. Após o resfriamento a temperatura ambiente, em capela, 5 mL das amostras foram transferidas para frascos de vidro em placa aquecedora e adicionados 2 mL de H₂SO₄ para evaporação de HNO₃ a 200 °C.

Após o resfriamento as amostras foram filtradas e diluídas até atingir o volume de 25 mL com água desionizada. Os extratos vegetais e as amostras de água finais foram analisados para seis metais (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As) utilizando-se de espectrometria de emissão atômica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP-OES (MODELO-3300 DV, Perkin Elmer Optima, EUA), no Laboratório de Espectrometria Atômica, do Departamento de Solos (DPS/UFV).

Por meio da quantidade de metais acumulados na parte aérea e na raiz de *E. crassipes*, foi calculado o Fator de Translocação dos metais, de acordo com Mishra et al., (2008b), empregando a seguinte equação:

$$\text{Fator de Translocação} = \frac{\text{Concentração do elemento na parte aérea}}{\text{Concentração do elemento na raiz}}$$

A análise do tecido epidérmico foi possível empregando-se a técnica de diafanização. Amostras das folhas fixadas em FAA₅₀ foram submetidas a solução de hidróxido de sódio a 10% por 2 horas, lavadas em água e, posteriormente, colocadas em hipoclorito de sódio (20%) até o clareamento (Johansen, 1940). O material foi corado com Safrablau. As lâminas semi-permanentes foram montadas em gelatina glicerinada e analisadas.

Para a confecção das lâminas histológicas, os fragmentos de folhas e raízes das plantas cultivadas nos tratamentos 0% e 100% DAM, foram incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments), e realizados cortes transversais em micrótomo rotativo (RM 2155 – Leica), com espessura de 0,5 µm. Posteriormente, foram corados em azul de Toluidina e Lugol (O'Brien & McCully, 1981) e montadas em Permount®. As imagens anatômicas das lâminas foram capturadas utilizando-se microscópio óptico (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, e câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.), no Laboratório de Anatomia Vegetal, DBV/UFV.

Após a captura das imagens, realizou-se a análise micromorfométrica para caracterização das possíveis alterações na estrutura dos órgãos vegetativos selecionados resultantes da exposição à DAM. Para a obtenção das medidas lineares e contagem dos estômatos foram utilizados os programas Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows (Media Cybernetics), e AnatiQuanti 2.0, aplicados no laboratório de Anatomia Vegetal, DBV/UFV.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi aplicada a análise de regressão para descrever a resposta da biomassa seca às diluições em drenagem ácida para as duas espécies, assim como para o acúmulo de metais.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de biomassa seca

O desenvolvimento de *E. crassipes* e *S. polyrrhiza* foi comprometido pelo aumento da porcentagem de DAM no meio aquoso (Figura 1). A redução na biomassa seca total de *E. crassipes* e *S. polyrrhiza* foi de 30% e 46%, respectivamente, após doze dias de exposição às soluções. Os efeitos observados no crescimento das espécies podem estar associados ao aumento da acidez nas soluções e à concentração dos metais quantificados. A redução na biomassa seca de *S. polyrrhiza* ocorreu em função da intensa necrose identificada nas folhas dos indivíduos expostos a DAM, demonstrando sensibilidade da espécie quando exposta a ambientes com pH ácido ou à maior disponibilidade de metais nas soluções. Ao dividir a biomassa seca total de *E. crassipes* em partes (folha, pecíolo e raiz) observou-se que a redução mais significativa de biomassa ocorreu nas raízes (30%), quando se avaliou os efeitos entre os tratamentos 0% e 100% de DAM (Figura 1).

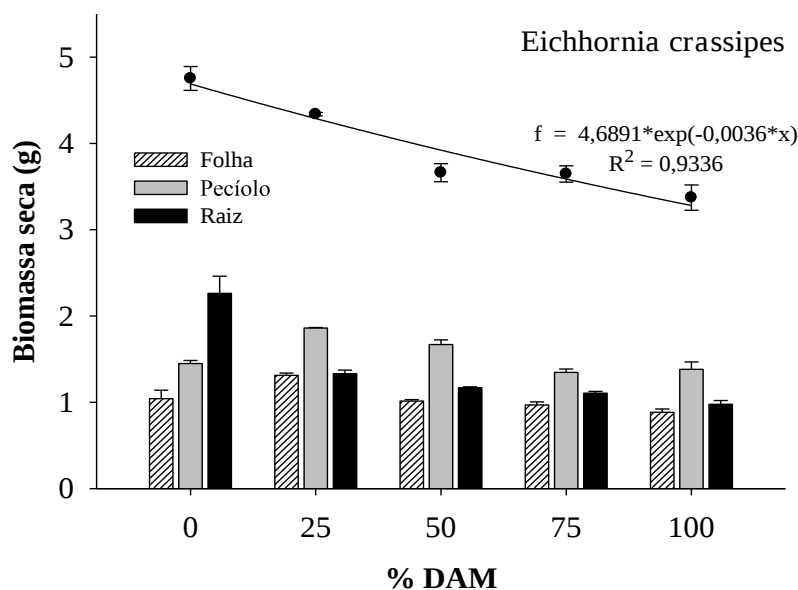


Figura 1 – Resposta ao cultivo em diferentes diluições de drenagem ácida de mina (DAM) na biomassa seca de *Eichhornia crassipes*.

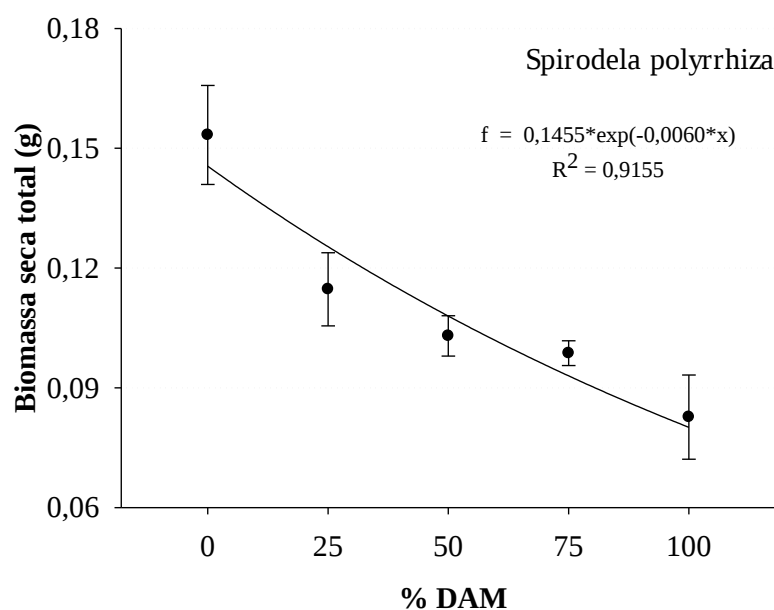


Figura 2 – Resposta ao cultivo em diferentes diluições de drenagem ácida de mina (DAM) na biomassa seca de *Spirodela polyrrhiza*.

3.2. Teor de pigmentos fotossintéticos

O efeito deletério da exposição das macrófitas à DAM foi observado apenas em *S. polyrrhiza*. Houve redução no conteúdo de clorofila total e carotenóides. O efeito da DAM sobre estas variáveis, e para esta espécie, foi significativo a partir da concentração de 25% de DAM adicionado à água, com surgimento de necroses nas folhas dos indivíduos com consequente diminuição da área foliar fotossinteticamente ativa. Para *E. crassipes*, apesar da diminuição no peso seco das folhas, não houve diferenças nos teores de clorofila total e carotenóides entre os indivíduos expostos à DAM e aquelas plantas que se desenvolveram em água.

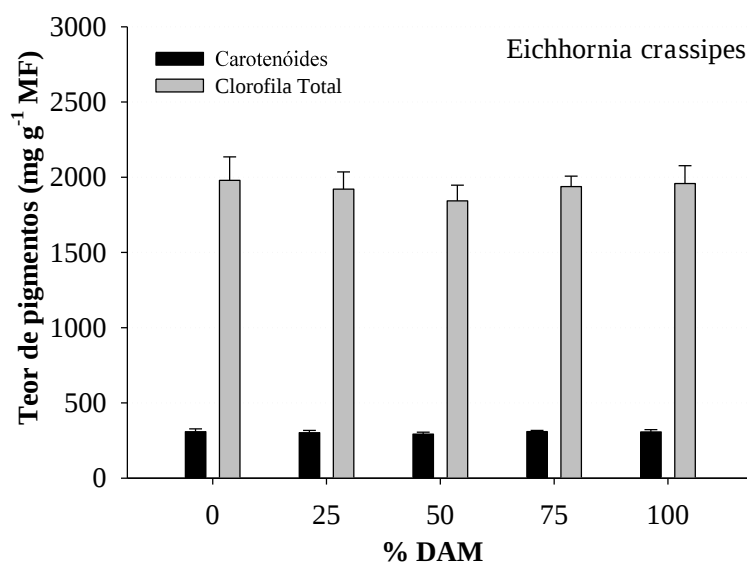


Figura 3 – Efeito de diluições de drenagem ácida de mina sobre os teores de carotenóides e clorofila total de *Eichhornia crassipes*.

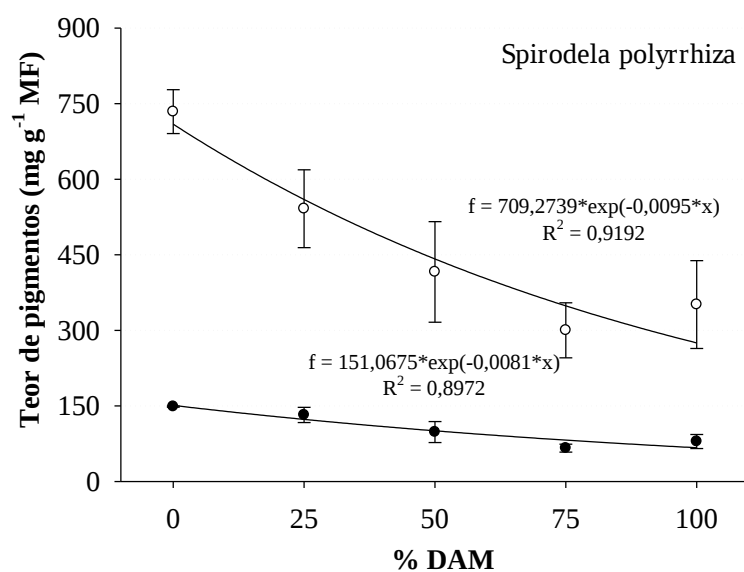


Figura 4 – Efeito de diluições de drenagem ácida de mina sobre os teores de carotenóides e clorofila total de *Spirodela polyrrhiza*.

3.3. Nutrientes

3.3.1. *Eichhornia crassipes*

Nas plantas de *E. crassipes* o acúmulo de cobre (Cu) foi proporcional à concentração da solução (Figura 5). Nos meios contendo drenagem ácida observou-se que o acúmulo foi maior nas raízes, enquanto que no tratamento controle (0% de DAM), o Cu acumulado na raiz foi menor que o da parte aérea (folha e pecíolo).

O cálculo do Fator de translocação (FT) demonstra que valor > 1 significa que houve translocação para a parte aérea, enquanto que valor < 1 , expressa o acúmulo de metais na raiz. Em *E. crassipes* houve translocação de Cu para a parte aérea no tratamento controle, enquanto que nos demais tratamentos o valor diminuiu com o aumento da concentração de DAM, consequentemente com o aumento da concentração nas raízes (Tabela 2 e Figura 5).

O acúmulo de ferro (Fe) em todos os tratamentos foi mais intenso nas raízes de *E. crassipes* do que na parte aérea, com maior concentração nas raízes das plantas submetidas às diluições de DAM (Figura 5), principalmente para as concentrações 75 e 100%. O Fe acumulado na parte aérea foi semelhante para as plantas de todos os tratamentos, isto evidencia que a translocação para a parte aérea é limitada, independente da concentração de Fe no meio (Tabela 2).

Entre os metais estudados em *E. crassipes*, o manganês (Mn) foi translocado em maior quantidade para a parte aérea, mantendo níveis semelhantes nas raízes em todos os tratamentos (Figura 5 e Tabela 2). Apesar das concentrações crescentes de Mn nas soluções, notou-se que não houve aumento no acúmulo de Mn quando da maior concentração desse metal.

A concentração de níquel (Ni) nas soluções foi proporcional à diluição da drenagem ácida. O acúmulo de Ni em *E. crassipes*, apesar de maior nas plantas expostas aos tratamentos contendo drenagem ácida, não apresentou diferenças entre as diluições (Figura 5), mesmo as concentrações iniciais serem menores conforme às diluições. Este elemento foi translocado para a parte aérea de *E. crassipes*, sendo os maiores acúmulos encontrados no pecíolo (Tabela 2). Apesar do movimento de Ni para a parte aérea, este metal foi distribuído em todas as partes de *E. crassipes* em quantidades semelhantes.

As plantas de *E. crassipes* absorveram mais Zn nos tratamentos contendo DAM (Figura 5), com translocação para a parte aérea em todos os tratamentos (Tabela 2). Em

O arsênio (As), considerado o elemento mais tóxico, foi absorvido em maior quantidade nos tratamentos 75 e 100% de DAM por *E. crassipes* (Figuras 5). A

translocação desse elemento para a parte aérea foi reduzida, e o acúmulo se manteve nas raízes (Tabela 2), entretanto, o acúmulo na parte aérea se manteve igual em todos os tratamentos. O acúmulo de As nas raízes foi crescente, e acompanhou a concentração de As nas soluções.

Tabela 2 – Razão entre o acúmulo de metais na parte aérea e na raiz da planta (Fator de Translocação) em *Eichhornia crassipes*.

%	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As
0	1,56	1,03	8,74	13,24	1,78	0,00
25	0,78	0,53	5,11	1,85	0,91	0,45
50	0,45	0,68	6,84	1,84	1,26	0,54
75	0,35	0,52	7,99	1,88	1,12	0,30
100	0,25	0,56	11,71	1,23	1,11	0,33

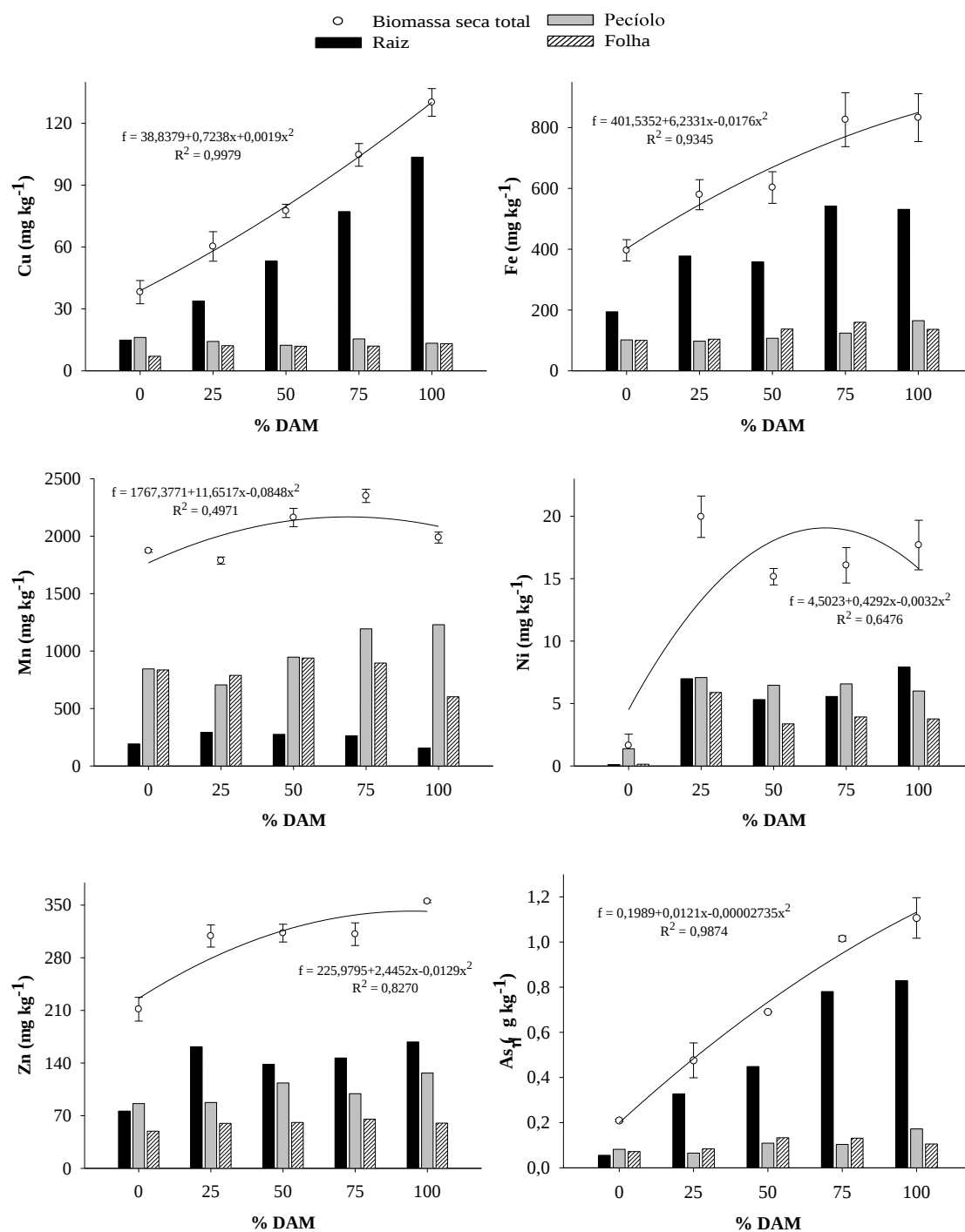


Figura 5 – Acúmulo de Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As nas partes aéreas, raízes e em valores totais de *Eichhornia crassipes*.

3.3.2. *Spirodela polyrrhiza*

Nas plantas de *S. polyrrhiza* o acúmulo de cobre (Cu) foi proporcional à concentração da solução (Figura 6).

Para *S. polyrrhiza* o acúmulo de Fe foi maior nas plantas submetidas à concentração 25% de DAM, com diminuição na absorção a partir desta concentração (Figura 6), possivelmente em razão do desenvolvimento de necroses nas folhas e morte de indivíduos.

O acúmulo de manganês em *S. polyrrhiza* foi maior no tratamento com 25% de drenagem ácida, com diminuição na absorção a partir de 75% de DAM na solução (Figura 6).

Maiores valores de acúmulo de Ni foram encontrados nas plantas cultivadas nas soluções contendo 25, 50 e 75% de DAM, com redução no acúmulo em 100%. Enquanto que o acúmulo de Zn foi intensificado nas soluções de 25% de DAM, com redução no acúmulo de Zn a partir dos 50% de DAM (Figura 6).

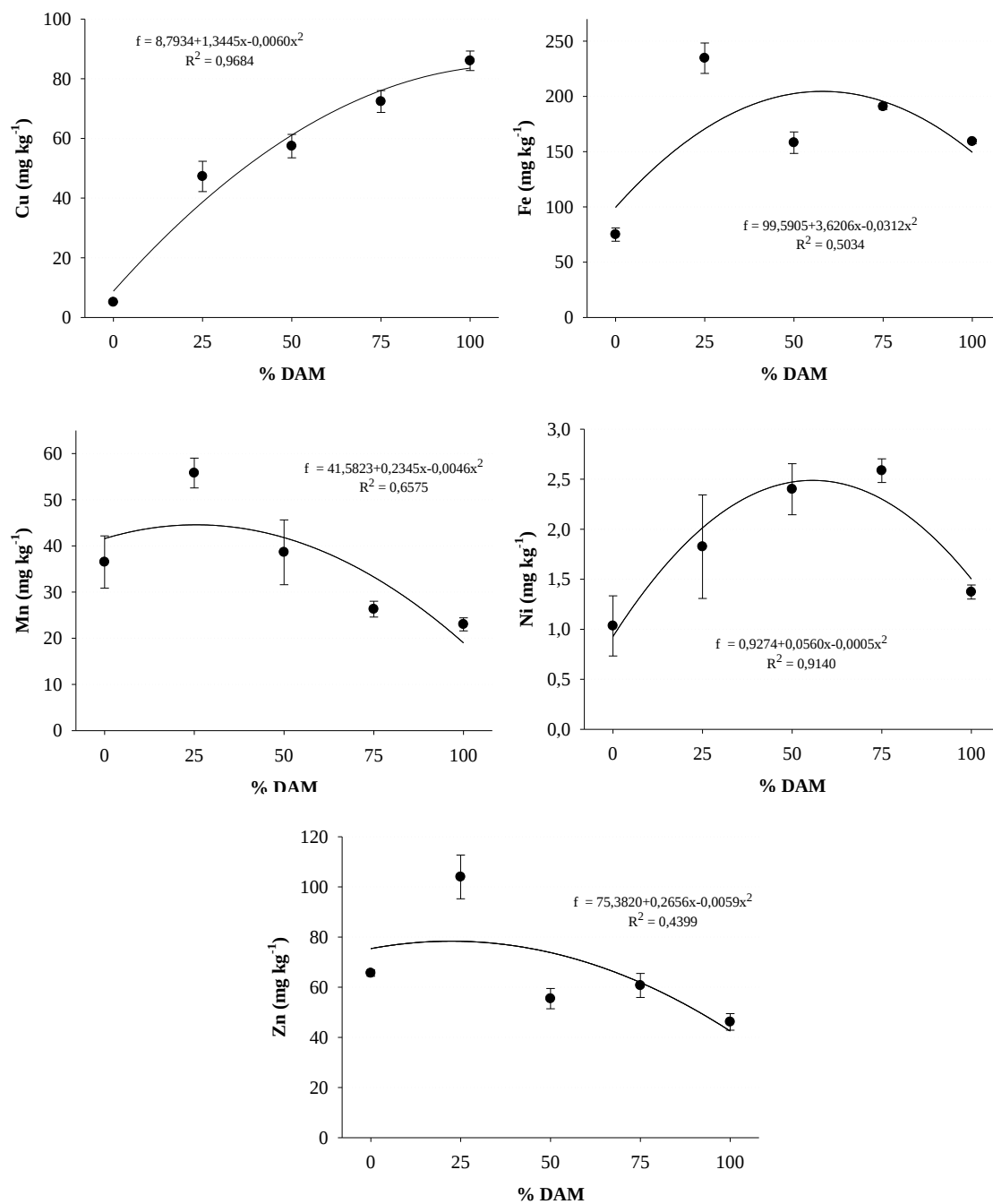


Figura 6 – Acúmulo de Cu, Fe, Mn, Ni e Zn na biomassa seca de *Spirodela polyrrhiza*.

3.4. Alterações morfo-anatômicas

3.4.1. *Eichhornia crassipes*

As folhas de *E. crassipes* que emergiram durante o período experimental não apresentaram alterações morfológicas visíveis (Figuras 7A e B).

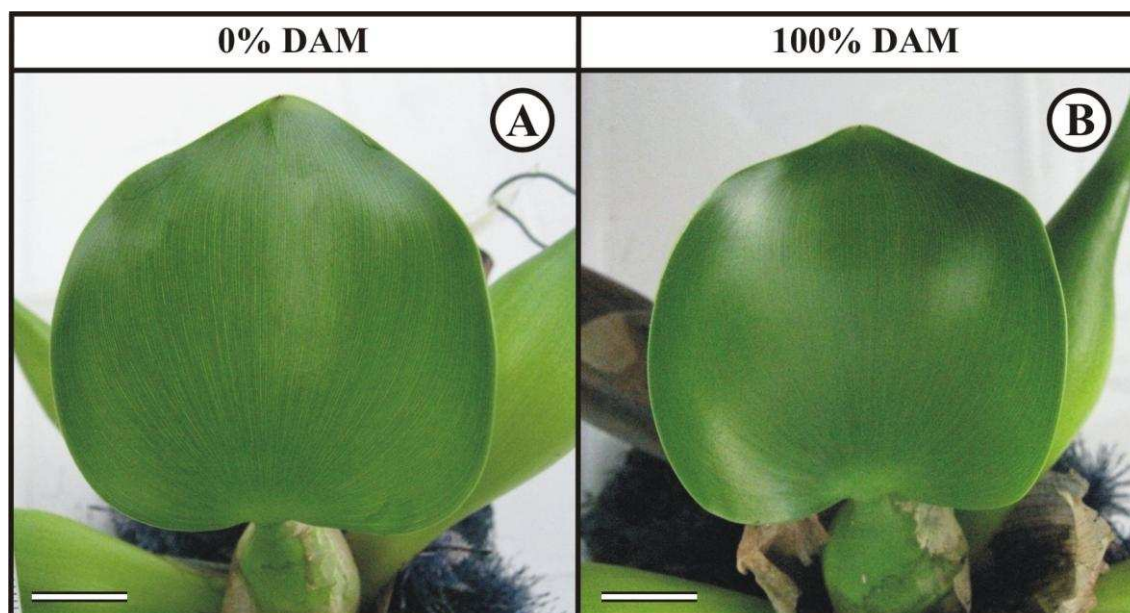


Figura 7 – Aspecto geral das folhas de *Eichhornia crassipes* (A e B) após exposição à água e à drenagem ácida de mina (DAM). Barra = 1 cm.

A partir da diafanização das folhas de *E. crassipes* do tratamento 100% DAM, foi observada a ausência de tricomas nas epidermes. Foi identificada a presença de estômatos do tipo paracítico nas faces adaxial e abaxial da folha, sendo, portanto, a mesma classificada como anfiestomática para os tratamentos 0% e 100% DAM (Figura 8A e B). A exposição à DAM não afetou o número de estômatos presentes nas epidermes (Tabela 3).

O limbo foliar de *E. crassipes* é constituído por epiderme uniestratificada presente nas faces adaxial e abaxial com ocorrência de estômatos. O mesofilo é isobilateral, com parênquima paliçádico em ambas as faces, sendo constituído por 2-3 camadas de células na face adaxial, e apenas uma camada na face abaxial. O parênquima lacunoso é constituído por lacunas do aerênquima que se concentram na região mediana da folha. Os feixes vasculares podem apresentar dois tamanhos: os pequenos estão presentes nos dois lados do mesofilo, podendo alcançar a epiderme, enquanto os feixes vasculares maiores estão presentes na região mediana do mesofilo. Outra característica dos feixes vasculares é sua ocorrência com orientação normal e

inversa, sendo colaterais, com o xilema voltado para a face adaxial e o floema para a face abaxial. Os feixes vasculares são circundados por bainha (endoderme) constituída por células parenquimáticas. As folhas não apresentam tecido esclerenquimático (Figuras 8C e D). As medições dos tecidos da folha de *E. crassipes* limbo foliar estão apresentados na Tabela 3.

Entre os tecidos mensurados na folha, a área das lacunas do aerênquima e o número de idioblastos contendo compostos fenólicos apresentaram diferenças entre as plantas controle e as submetidas à DAM (Tabela 3).

As raízes apresentam epiderme com uma camada compacta de células, seguida pela hipoderme. Logo abaixo da hipoderme situa-se o córtex, o qual é dividido em três partes. Na primeira parte, após a hipoderme, ocorrem 3 camadas de células parenquimáticas que formam a primeira região. Ao redor do estelo está outra região com células parenquimáticas que constituem 4-5 camadas, porém as células são bem arredondadas e dispostas em colunas radiais com espaços intercelulares. Entre essas duas regiões está o tecido lacunoso, composto por placas radiais constituído por finas paredes celulares, e entre as placas ocorrem espaços com ar de formato longo e estreito (aerênquima). A endoderme e o periciclo estão localizados ao redor do estelo, que é definido como poliarco, com cerca de sete vasos de xilema, alternando com o floema, e ao meio localiza-se a medula composta de células parenquimáticas (Figuras 8E e F).

As alterações mais significativas foram encontradas nas raízes onde foram observadas aumento do comprimento das lacunas do aerênquimas das plantas expostas à DAM, além da diminuição da região medular (Tabela 3).

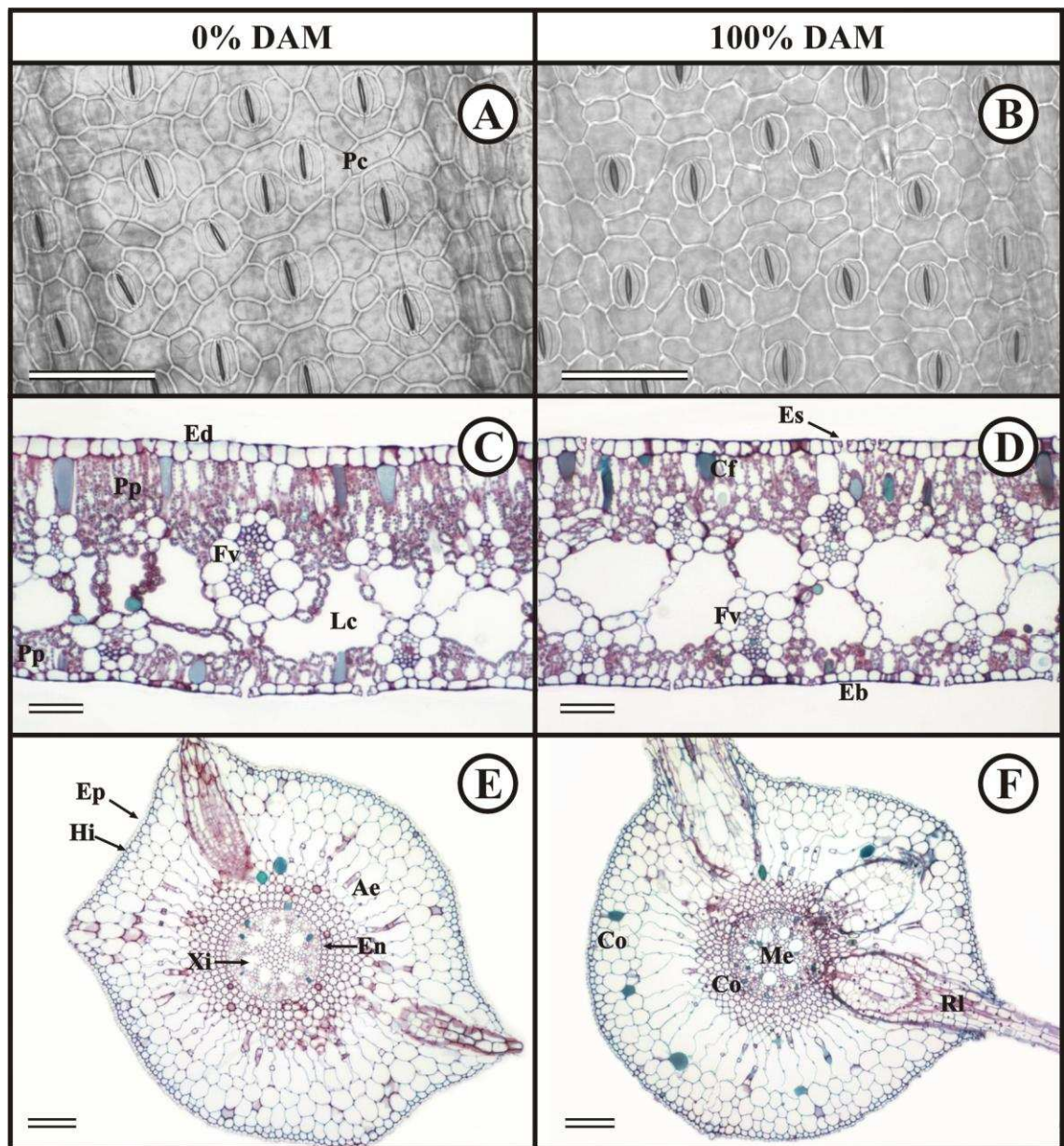


Figura 8 - Caracterização morfo-anatômica de *Eichhornia crassipes* após exposição à água e à drenagem ácida de mina (DAM). A, B – Vista frontal da folha diafanizada com estômatos do tipo paracítico (Pc) na face adaxial. C e D – Cortes transversais da folha. Vista geral do limbo foliar evidenciando lacunas (Lc) do aerênquima, feixe vascular com orientação normal e inversa (Fv), parênquima paliçádico (Pp), Idioblasto contendo compostos fenólicos (Cf), epiderme adaxial (Ed), abaxial (Eb) e estômatos (Es). E e F – Corte transversal da raiz com desenvolvimento de raiz lateral (Rl), epiderme (Ep), hipoderme (Hi), córtex externo e interno (Co), aerênquima (Ae), endoderme (En), xilema (Xi) e medula (Me). Barra = A, B, E e F (10 μ m); C e D (20 μ m).

Tabela 3 – Caracteres morfo-anatômicos de *Eichhornia crassipes* obtidos por meio de estudos micromorfométricos.

Tipo de Célula			%				
			0	25	50	75	100
FOLHA							
Estômatos	Ad	nº	38 a*	35 a	39 a	41 a	38 a
	Ab		49 a	38 a	47 a	46 a	44 a
Limbo			31,2 a	32,6 a	33,0 a	32,8 a	33,9 a
Epiderme	Ad	(µm)	3,2 a	3,6 a	3,8 a	3,4 a	3,6 a
	Ab		2,1 a	2,2 a	2,3 a	2,2 a	2,1 a
Parênquima	Ad		10,1 a	11,5 a	10,7 a	11,3 a	10,5 a
Paliçádico	Ab		4,8 a	5,1 a	6,0 a	5,0 a	4,7 a
Feixe vascular			1241,9 a	1287,3 a	1406,9 a	1550,1 a	1583,7 a
Aerênquima		(µm²)	998,4 c	1126,3 c	1142,6 c	1458,8 b	1758,4 a
Idioblasto		nº	6,0 b	8,0 ab	8,3 ab	9,0 ab	12,5 a
RAIZ							
Área		(µm²)	4591,3 a	4118,4 a	4408,8 a	4857,1 a	5167,0 a
Diâmetro			458,7 a	451,8 a	440,7 a	469,8 a	451,6 a
Epiderme			0,79 a	0,96 a	0,71 a	0,69 a	0,82 a
Córtex		(µm)	24,9 a	25,4 a	25,1 a	26,1 a	27,6 a
Aerênquima			10,5 b	11,7 ab	13,2 ab	13,7 ab	15,4 a
Xilema			2,8 a	2,8 a	2,6 a	3,3 a	3,2 a

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey (5%). ** Ad: adaxial; Ab: abaxial

3.4.2. *Spirodela polyrrhiza*

As plantas de *S. polyrrhiza* expostas a DAM apresentaram necroses em suas folhas após 12 dias de exposição (Figuras 9A e B).

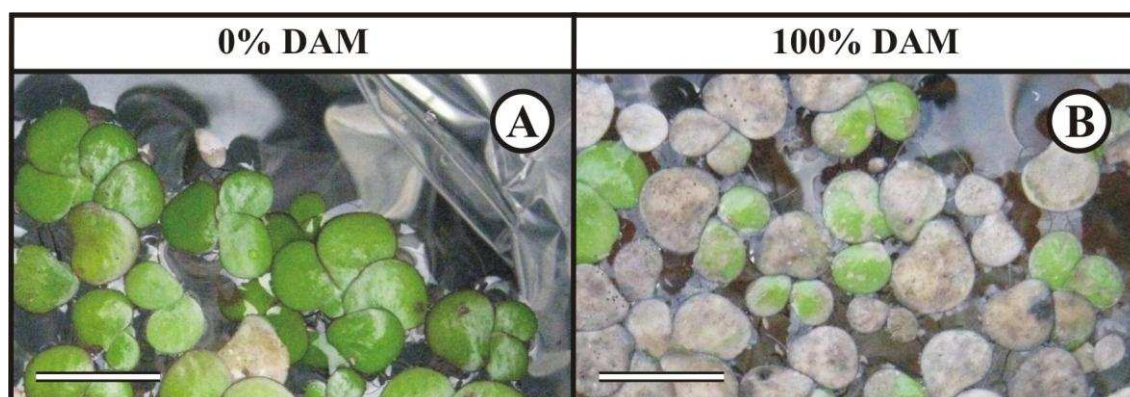


Figura 9 – Aspecto geral das folhas de *Spirodela polyrrhiza* (A e B) após exposição à água e à drenagem ácida de mina (DAM). Barra = 1 cm.

A folha de *S. polyrrhiza* é caracterizada como sendo epiestomática, apresentando estômatos apenas na face adaxial, e estes são classificados como actinocíticos. Após 12 dias de exposição à drenagem ácida, houve perda de tecido epidérmico em ambas as faces (Figuras 10A e B).

O corte transversal da folha de *S. polyrrhiza* apresenta uma camada de cutícula sobre a epiderme uniestratificada constituída de células de formato irregular, seguida pelo parênquima clorofiliano. Na região mediana estão presentes lacunas proeminentes de aerênquima, que permitem a flutuação dos indivíduos, e estão dispostas por toda a extensão da folha de maneira heterogênea. Cristais de oxalato de cálcio, como drusas, estão presentes nas regiões do aerênquima e do parênquima clorofiliano. Os tecidos vasculares são reduzidos, porém, no centro da folha está presente o feixe vascular principal, enquanto que no mesofilo ocorrem pequenos feixes em série. Ao comparar a folha exposta à água com aquela exposta à DAM, foi notável o efeito deletério encontrado nos tecidos e identificado pela presença de necroses (Figuras 10C e D).

As raízes de *S. polyrrhiza* são esparsas e simples, com uma camada de células epidérmicas seguida de uma região de células parenquimáticas. Ocorrem faixas estreitas paralelas ao eixo da raiz, que formam lacunas, caracterizadas como córtex. Ao centro, circundado por células parenquimáticas, está o cilindro vascular, semelhante ao feixe vascular da folha (Figura 10E). As plantas de *S. polyrrhiza* expostas à drenagem ácida

de mina apresentaram danos na epiderme da raiz, porém sem efeitos nas células do córtex e do cilindro vascular (Figura 10F).

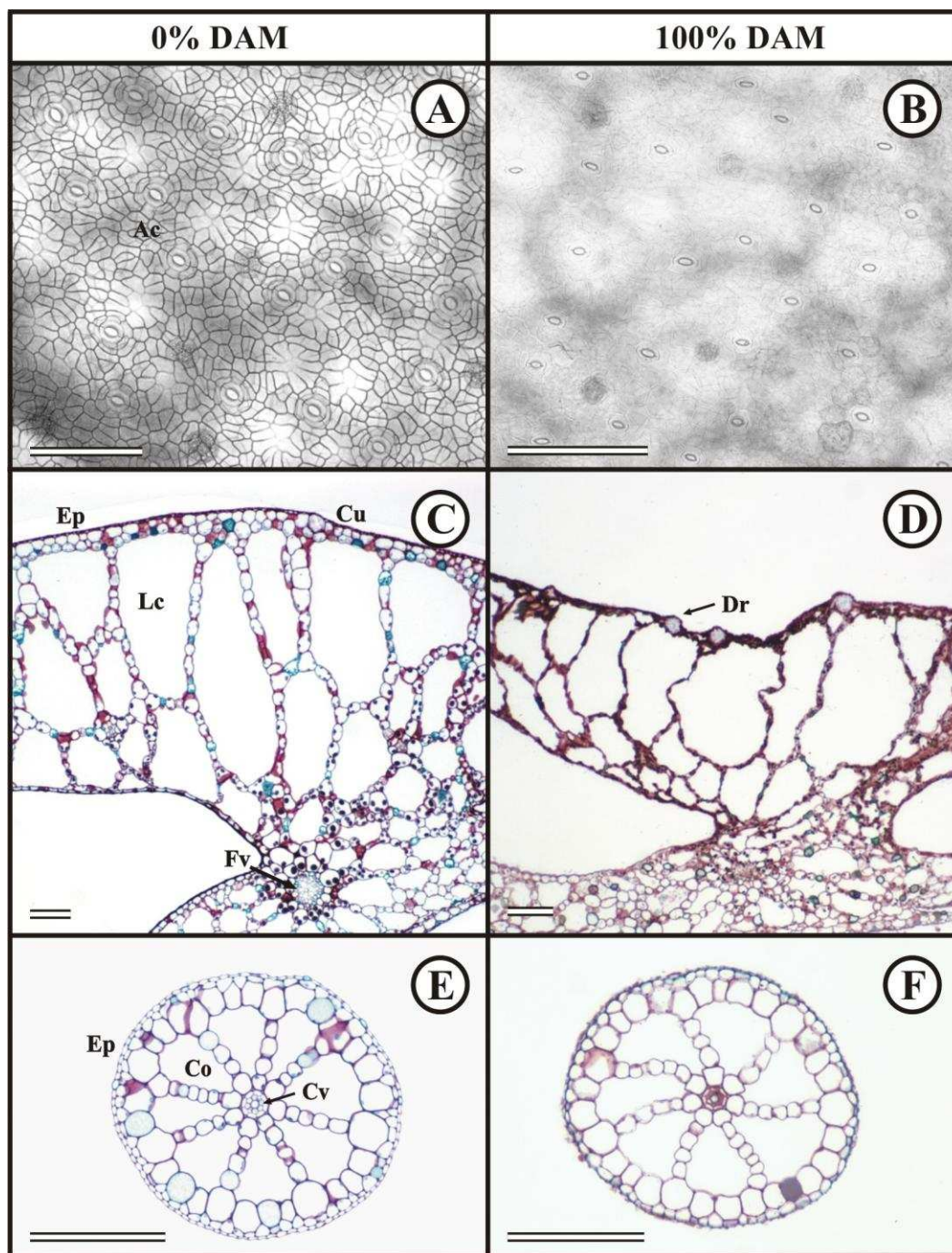


Figura 10 – Caracterização morfo-anatômica de *Spirodela polyrrhiza* após exposição à água e à drenagem ácida de mina (DAM). A, B – Vista frontal da folha diafanizada com estômatos do tipo actinocítico (Ac). C e D – Cortes transversais da folha. Vista geral do mesofilo evidenciando lacunas (Lc) do aerênquima, feixe vascular (Fv), epiderme (Ep), cutícula (Cu) e a presença de drusas (Dr). E e F – Corte transversal da raiz com epiderme (Ep), córtex com lacunas (Co) e cilindro vascular (Cv). Barra = A, B, E e F (10µm); C e D (20 µm).

4. DISCUSSÃO

A espécie mais sensível às soluções contendo as diluições de drenagem ácida de mina foi *S. polyrrhiza*. A susceptibilidade dessa espécie ao pH ácido do meio, e à maior disponibilidade de elementos tóxicos, levou ao desenvolvimento de necroses, que surgiram da borda para o centro da folha. Este resultado foi semelhante ao obtido no experimento do Capítulo 1 com *S. polyrrhiza* e *P. stratiotes*, no qual, além do efeito da acidez, houve efeito da elevada concentração de metais no meio de cultivo.

Nesse experimento, a concentração dos metais dissolvidos no meio não foi limitante na sobrevivência de *S. polyrrhiza*. Alguns autores relataram que plantas dessa espécie apresentaram capacidade de acumular metais como Cu, Fe, Zn, Cd, Mn, Pb, As e Cr, sem que os mesmos causassem danos severos à morfologia e às suas principais funções metabólicas (Kanoun-Boulé et al., 2009; Mishra et al., 2008a; Mishra & Tripathi, 2008; Rahman et al., 2007; Rai et al., 1995).

A ação negativa da acidez e dos metais sobre as folhas de *S. polyrrhiza* possivelmente inibiu o crescimento e a produção de biomassa, como resultado da evolução de tecidos necróticos seguido de morte da planta. Desta maneira, a sensibilidade apresentada por *S. polyrrhiza* foi contrária ao comportamento de *E. crassipes*, que mostrou ser resistente à acidez e às concentrações dos metais no meio, sem danos aparentes às folhas, pecíolos e raízes. Porém, mesmo sem lesões externas houve redução na biomassa seca da planta, principalmente das raízes, ao comparar as plantas submetidas à drenagem ácida com aquelas expostas à água 100%. É possível que a composição do meio tenha influenciado a inibição do crescimento das plantas, e não a destruição/perda de biomassa, pois nos vasos não foram encontradas raízes que se desprenderam, mas folhas senescentes, em todos os tratamentos. Hasan et al. (2007) relataram que a biomassa de *E. crassipes*, quando exposta a doses crescentes de Cd e Zn, foi reduzida. Nas doses baixas (1,0 – 2,0 mg L⁻¹ de Cd, e 2,0 – 4,0 de Zn) o crescimento das plantas estagnou, enquanto que em doses mais altas o crescimento de *E. crassipes* foi inibido.

Com a evolução de necroses nas folhas de *S. polyrrhiza*, a produção de pigmentos fotossintéticos foi afetada, enquanto que para *E. crassipes* não foi observado efeito deletério sobre essa variável, o que demonstra a tolerância dessa espécie aos metais e à acidez do meio. Pesquisas têm relatado a diminuição na produção de pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* quando as plantas são expostas a diversos metais (Paiva et al., 2009; Mishra et al., 2008b; Hu et al., 2007; Maine et al., 2006),

porém, em determinadas situações as concentrações de alguns metais não apresentam riscos à produção de clorofila total e carotenóides nos vegetais (Hu et al., 2007).

Quanto maior a concentração de Cu e Fe na solução, maior o acúmulo em *E. crassipes*. A quantidade desses metais translocados para a parte aérea foi limitada, apesar da elevada concentração nas raízes. Este resultado foi semelhante aos obtidos por Olivares-Reumont et al. (2007), quando os autores avaliaram o acúmulo de metais em *E. crassipes* crescendo em pontos diversos de um rio receptor de efluente contaminado. Aparentemente esta espécie limitou a mobilidade de metais a serem translocados para a parte aérea, sendo esse um mecanismo de defesa da planta (Deng et al., 2004).

Estudos mostraram que a acumulação de diversos metais por plantas aquáticas tem ocorrido, em sua maior parte, nas raízes, e pouco tem sido observado acumulado na parte vegetativa e reprodutiva das plantas (Mishra & Tripathi, 2008; Hasan et al., 2007; Zaranyika et al., 1994). As plantas adquirem metais essenciais como os micronutrientes, mas regulam suas concentrações para evitar a intoxicação com a utilização de diversos transportadores de metais que realizam o influxo (difusão de solutos do apoplasto para o citoplasma) e efluxo (exclusão de metais presentes no citoplasma para o apoplasto ou solução externa) (Hall & Williams, 2003; Williams et al., 2000; Marschner, 1995).

Apesar do Cu e do Fe serem micronutrientes essenciais para o metabolismo das plantas, em elevadas concentrações podem levar à degradação dos pigmentos fotossintéticos e induzir ao estresse oxidativo nos cloroplastos (Xing et al., 2009; Li & Xiong, 2004; Prasad et al., 2001). A concentração máxima de Cu na solução empregada foi de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ e *E. crassipes* acumulou até 130 mg kg^{-1} em sua biomassa seca total. Plantas de *E. crassipes* submetidas a soluções com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu não apresentaram alterações severas no seu metabolismo, enquanto que acima de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram observadas mudanças drásticas na fisiologia da planta (Hu et al., 2007). A concentração de Fe na solução (até $7,6 \text{ mg L}^{-1}$ em 100% DAM) não foi suficiente para desencadear efeitos tóxicos severos em *E. crassipes*. Resultados semelhantes foram obtidos por Mishra & Tripathi (2008) e Mishra et al. (2008b), nas concentrações de Fe de até 5 mg L^{-1} .

Em *S. polyrrhiza*, concentrações a partir de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram suficientes para estimular o aparecimento de danos nas folhas e a abscisão das raízes, enquanto que para o Fe, a concentração considerada tóxica foi a partir de 10 mg L^{-1} (Xing et al., 2009). Portanto, é possível que as concentrações de Fe das soluções contendo DAM tenham sido tóxicas para as plantas de *S. polyrrhiza* – além da acidez do meio (pH) –, uma vez

que a partir de 25% DAM a concentração de Fe era de 2,7 mg L⁻¹ a 7,6 mg L⁻¹ em 100% DAM.

O As, único elemento estudado não essencial ao metabolismo das plantas, foi acumulado em quantidades baixas (até 1,1 µg kg⁻¹) nos órgãos de *E. crassipes*. Esta concentração não foi suficiente para causar danos ao teor de clorofila total dessa espécie, nem à produção de biomassa seca. Em trabalho com Hg e As, *E. crassipes* apresentou redução no teor de clorofila total quando exposta a água de efluente contendo 0,5 mg L⁻¹ de As (Mishra et al., 2008c). Soluções com concentrações de 0,15 mg L⁻¹ de As não afetaram o crescimento de *E. crassipes* e *Lemna minor*, que acumularam 1,8 e 2,5 mg kg⁻¹ de As, respectivamente (Alvarado et al., 2008).

Entre os elementos estudados que foram translocados para a parte aérea de *E. crassipes*, Mn se destacou, seguido pelo Ni e Zn. A concentração de Mn na solução foi semelhante à do Fe, porém a absorção e translocação desses dois metais foram distintas. O manganês foi o elemento acumulado em maior quantidade nos órgãos de *E. crassipes*, além da maior translocação para a parte aérea, em relação aos demais metais presentes nas soluções. Outros estudos com *E. crassipes* exposta a soluções com concentrações de diversos metais, mostraram que o Mn foi mais absorvido que os demais metais (Agunbiabe et al., 2009; Soltan & Rashed, 2003). A grande mobilidade de Mn para a parte aérea de plantas aquáticas também foi demonstrada por Karanthanasis & Johnson (2003), que relataram que a alta mobilidade de Mn, combinada com a capacidade de plantas aquáticas em acumular Mn, sugere um mecanismo de sorção como o caminho dominante para a absorção que poderia designar e selecionar essas espécies como indicadoras de contaminação por Mn. Chaney et al. (1997) mostraram que algumas plantas aquáticas transportam e distribuem elevadas concentrações de Mn por toda a planta, ao invés de acumular nas raízes, como é o caso do Fe. A formação de placas de Mn nas raízes pode ocorrer quando as plantas são expostas a altas concentrações, no entanto, nessa pesquisa, aparentemente essa formação foi inibida pela baixa concentração nas soluções e pelas condições de baixo pH.

Para *S. polyrrhiza*, o acúmulo de Mn foi maior nas porcentagens abaixo de DAM 50%, pois, quando as plantas foram expostas aos tratamentos acima de DAM 75%, foram severamente danificadas, e por isso o acúmulo foi menor. Em trabalho, conduzido com *S. polyrrhiza* e manganês, foi relatado que essa espécie tem capacidade para acumular quantidades substanciais de Mn (Sinha et al., 1994), porém, na concentração de 0,4 mM de Mn, as plantas, apesar de acumularem Mn, apresentaram

sintomas de fitotoxicidade como clorose e redução na produção de clorofilas e carotenóides (Lizieri dos Santos, 2009).

O níquel, assim como Mn, foi translocado para a parte aérea de *E. crassipes* e foi acumulado por plantas de *S. polyrrhiza* em maiores quantidades nos tratamentos 25%, 50% e 75% DAM. Ao observar a quantidade de níquel acumulada nas três partes de *E. crassipes* (folha, pecíolo e raiz), é possível notar que o acúmulo foi similar entre as partes da planta, o que é confirmado por Zaranyika et al. (1994).

O acúmulo de zinco foi distribuído por toda a planta de *E. crassipes*, com valores de até 355 mg kg⁻¹ na biomassa seca total, sendo a maior concentração de Zn na solução com 100% DAM, de 3,35 mg L⁻¹. Outros trabalhos com Zn e *E. crassipes* apresentaram resultados semelhantes de acúmulo (Hasan et al., 2007; Mishra & Tripathi, 2008). Ao observar a concentração de Zn em *E. crassipes* (folha, pecíolo e raiz), verificaram que não houve diferenças entre os tratamentos, ou seja, independentemente do aumento da concentração de zinco no meio aquoso, a absorção se manteve equivalente em todos os tratamentos, exceto DAM 0%, onde a concentração de Zn era consideravelmente menor.

A toxicidade de um meio dependerá da concentração dos metais presentes e das suas características físico-químicas. A exposição de plantas a esse meio poderá provocar mudanças estruturais e ultra-estruturas em nível celular, de tecidos ou de órgãos. As injúrias não visíveis ocorrem como respostas as alterações bioquímicas e fisiológicas, apresentando perda da produtividade na ausência de sintomas visíveis (Kozłowski, 1980). Sob condições críticas, as injúrias passam a ser visíveis, manifestando-se na forma de clorose, necrose, abscisão foliar entre outros sintomas (Barceló & Poschenrieder, 1999). Mudanças no tamanho ou na morfologia celular das plantas são efeitos comuns da toxidez de metais pesados, porém podem variar dependendo da espécie da planta, da concentração e do tipo do metal presente no meio (Barceló & Poschenrieder, 1999).

No presente estudo foram observadas alterações morfo-anatômicas nas folhas e raízes de *E. crassipes* e *S. polyrrhiza* cultivadas em soluções contendo DAM, como o aumento da área nas lacunas do aerênquima. O aerênquima de *E. crassipes* é do tipo radial expansígeno, no qual ocorre a expansão dos espaços intercelulares em lacunas a partir de divisões e aumento das células, sem que haja separação celular nem colapso seguido de morte da celular (Seago et al., 2005). A presença de metais, como Fe, Cu, Zn e Cd, no meio de cultivo pode desencadear o estresse na planta, e consequentemente estimular a produção de etileno com possível aumento do aerênquima (Shiono et al.,

2008; Maksymiec, 2007; Chen & Kao, 1995). Várias publicações exibem diferentes espécies de plantas aquáticas que também apresentaram aumento no aerênquima após exposição a Mn e Cd (Lizieri dos Santos, 2009; Souza et al., 2009).

O aumento no número de idioblastos contendo compostos fenólicos, em plantas de *E. crassipes* submetidas à drenagem ácida de mina, ocorreu em resposta a concentração dos metais na solução. Rice-Evans & Miller (1996) afirmaram que os polifenóis, especialmente da classe dos taninos, tem a capacidade de quelar metais como o Fe. A interação entre fenóis e metais envolve quelação e atividade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio. Em trabalho com *Nymphaea* sp., foi observada correlação positiva entre a concentração de polifenóis e a absorção de Cr e Cd (Lavid et al., 2001). Neumann et al. (1995) reportaram que *Armenia maritima* ssp. *halleri* acumulou Cu nos vacúolos de células taníferas (idioblastos) através da quelação com compostos fenólicos. Davis et al. (2001) consideraram que os elevados valores de compostos fenólicos em folhas de *Psychotria douarrei* são em função da quelação ou detoxificação de Ni. Com base nesses relatos, considera-se que a produção de compostos fenólicos parece estar envolvida na proteção ou tolerância de plantas contra o estresse oxidativo.

5. CONCLUSÃO

Entre as espécies estudadas, apenas *E. crassipes* apresentou capacidade de sobreviver em soluções contendo DAM apesar dos danos na morfologia e anatomia das plantas, além da inibição de seu crescimento com o aumento da concentração de DAM.

E. crassipes acumulou quantidades representativas de metais presentes nas soluções, e translocou Mn, Ni e Zn efetivamente para a parte aérea, enquanto os demais metais permaneceram acumulados em maior quantidade nas raízes.

S. polyrrhiza se mostrou mais sensível às soluções contendo DAM devido à acidez do meio e os metais presentes na solução. Desta maneira, *S. polyrrhiza* não se enquadra nas características desejáveis para sua aplicação em tecnologias de remoção de metais em ecossistemas aquáticos impactados, enquanto que *E. crassipes* pode ser utilizada para rizofiltração, principalmente quando cultivada em soluções com baixas concentrações de metais, um dos requisitos exigidos pela tecnologia da fitorremediação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNBIADE, F.O.; OLU-OWOLABI, B.I.; ADEBOWALE, K.O. 2009. Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. **Bioresource Technology**, 100:4521-4526.
- ALVARADO, S.; GUÉDEZ, M.; LUÉ-MERÚ, M.P.; NELSON, G.; ALVARO, A.; JESÚS, A.C.; GYULA, Z. 2008. **Bioresource Technology**, 99:8436-8440.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M.N.V.; HAGEMEYER, J. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer, 1999. p.183-206.
- CHANEY, R.L.; MALIK, M.; LI, Y.M.; BROWN, S.L.; BREWER, E.P.; ANGLE, J.S.; BAKERS, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. **Current Opinion in Biotechnology**, 8:279-284.
- CHEN, L.S.; KAO, C.H. 1995. Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. **Plant Science**, 104:135-138.
- CLARK, R.B. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal agricultural Food Chemistry**, 23:458-460.
- DAVIS, M.A.; PRITCHARD, S.G.; BOYD, R.S.; PRIOR, S.A. 2001. Developmental and induced responses of nickel-based and organic defences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria douarrei*. **New Phytologist**, 150:49-58.
- DENG, H.; YE, Z.H.; WONG, M.H. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in china. **Environmental pollution**, 132:29-40.
- DHOTE, S; DIXIT, S. 2009. Water quality improvement through macrophytes – a review. **Environ Monit Assess**, 152:149-153.
- GRAY, N.F. 1997. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. **Environmental Geology** 30:62-71.
- GRAY, N.F. 1998. Acid mine drainage composition and the implications for its impact on lotic systems. **Water Research**, 32(7):2122-34.
- HALL, J., WILLIAMS, L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**. 54:2601-2613.
- HASAN, S.H.; TALAT, M.; RAI, S. 2007. Sorption of cadmium and zinc from aqueous solutions by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Bioresource Technology**, 98:918-28.

- HU, C.; ZHANG, L.; HAMILTON, D.; ZHOU, W.; YANG, T.; ZHU, D. 2007. Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* (Mart.). **Hydrobiologia**, 579:211-218.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw Hill, New York, 523pp.
- KANOUN-BOULÉ, M.; VICENTE, J.A.F.; NABAIS, C.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. 2009. Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. **Aquatic Toxicology**, 91:1-9.
- KARANTHANASIS, A.D.; JOHNSON, C.M. 2003. Metal removal potential by three aquatic plants in an acid mine drainage wetland. **Mine Water and the Environment**, 22:22-30.
- KOZLOWSKI, T.T. 1980. Impacts of air pollution on forest ecosystems. **Bioscience**, 30:210-221.
- LAVID, N.; SCHWARTZ, A.; YARDEN, O.; TEL-OR, E. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Hymphaeaceae*). **Planta**, 212:323-331.
- LI, T., XIONG, Z.T. 2004. A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm) to heavy metals. **Environmental Toxicology**, 19:95-102.
- LIZIERI DOS SANTOS, C. 2009. **Acúmulo e toxidez de manganês em macrófitas aquáticas flutuantes livres**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MAHMOOD, Q.; ZHENG, P.; SIDDIQI, M.R.; ISLAM, E.; AZIM, M.R.; HAYAT, Y. 2005. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. **Journal of Zhejiang University Science**, 6B(10):991-998.
- MAINE, M.A.; SUÑE, N.; HADAD, H.; SÁNCHEZ, G.; BONETTO, C. 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry. **Ecological Engineering**, 26:341-347.
- MAKSYMIEC, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. **Acta Physiol Plant**, 29:177-187.
- MALIK, A. 2007. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. **Environmental International**, 33:122-138.
- MARSCHNER, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, London. Second ed. 889p.

- MELLO, J.W.V. & ABRAHÃO, W.A.P. Geoquímica da drenagem ácida. In: DIAS, L.E. & MELLO, J.W.V., eds. **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1998. p.45-57.
- MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; FERNANDEZ CIRELLI, A. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, 57:997–1005.
- MISHRA, V.K.; TRIPATHI, B.D. 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, 99:7091–7097.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAYA, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. 2008a. Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar and anthropogenic lake affected by coal mining effluent. **Environmental Monitoring and Assessment**, 141:49-58
- MISHRA, V.K.; UPADHYAYA, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. 2008b. Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes. **Bioresource Technol.** 99:930–936.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAY, A.R.; PATHAK, V.; TRIPATHI, B.D. 2008c. Phytoremediation of mercury and arsenic from tropical opencast coalmine effluents through naturally occurring aquatic macrophytes. **Water, Air, Soil Pollution**, 192:303-314.
- NEUMANN, D.; ZUR NIEDEN, U.; LICHTENBERGER, O.; LEOPOLD, I. 1995. How does *Armeria maritime* tolerate high heavy metal concentrations? **Journal of Plant Physiology**, 146:704-717.
- O'BRIEN, P.P.; McCULLY, M.E. 1981. **The study of plants structure principles and select methods**. Thermacarphi Pty. Ltda, Melbourne-Australia, 45p.
- OLIVARES-RIEUMONT, S.; LIMA, L.; DE LA ROSA, D.; GRAHAM, D.W.; COLUMBIE, I.; SANTANA, J.L.; SÁNCHEZ, M.J. 2007. Water hyacinths (*Eichhornia crassipes*) as indicators of heavy metal impact of a large landfill on the Almendares river near Havana, Cuba. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, 79:583-587.
- PAIVA, L.B.; OLIVEIRA, J.G.; AZEVEDO, R.A.; RIBEIRO, D.R.; SILVA, M.G.; VITÓRIA, A.P. 2009. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr^{3+} and Cr^{6+} . **Environmental and Experimental Botany**, 65:403-409.

- PRASAD, M. N. V.; MALEC, P.; WALOSZEK, A.; BOJKO, M.; STRZALKA, K. 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. **Plant Science**, 161:881–889.
- RAHMAN, M.A.; HASEGAWA, H.; UEDA, K.; MAKI, T.; OKUMURA, C.; RAHMAN, M.M. 2008. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.): a good option for phytoremediation. **Chemosphere**, 69:493-499.
- RAI, U.N.; SINHA, S.; TRIPATHI, R.D.; CHANDRA, P. 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. **Ecological Engineering**, 5:5-12.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochemical Society Transactions**, 24:790-795.
- SEAGO, J.L.; MARSH, L.C.; STEVENS, K.J.; SOUKUP, A.; VOTRUBOVÁ, O.; ENSTONE, D.E. 2005. A Re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. **Annals of Botany**, 96:565-579.
- SINHA, S.; RAI, U.N.; CHANDRA, P. 1994. Accumulation and toxicity of iron manganese in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. **Environmental Contamination and Toxicology**, 53:610-617.
- SHEORAN, A.S.; SHEORAN, V. 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainagem in wetlands: a critical review. **Minerals Engineering** 19:105-116.
- SHIONO, K.; TAKAHASHI, H.; COLMER, T.D.; NAKAZONO, M. 2008. Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. **Plant Science**, 175:52-58.
- SOLTAN, M.E.; RASHED, M.N. 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. **Advances in Environmental Research**, 7:321-334.
- SOUZA, V.L.; SILVA, D.C.; SANTANA, K.B.; MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.F.; MANGABEIRA, P.A.O.; ROCHA, E.R. 2009. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, 23(2):343-354.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.
- VALENTE, T.M.; GOMES, C.L. 2009. Occurrence, properties and pollution potential of environmental minerals in acid mine drainage. **Science of the Total Environment**, 407:1135-52.

- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology** 144:307-313.
- WILLIAMS, L.E.; PITTMAN, J.K.; HALL, J.L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1465:104-126.
- XING, W.; HUANG, W.; LIU, G. 2009. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. **Environmental Toxicology**, 25(2):103-112.
- ZARANYIKA, M.F.; MUTOKO, F.; MURAHWA, H. 1994. Uptake of Zn, Co, Fe and Cr by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Lake Chivero, Zimbabwe. **The Science of the Total Environment**, 153:117-121.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa evidenciou os efeitos de soluções contendo drenagem ácida de mina (DAM) sobre o desenvolvimento das macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Spirodela polyrrhiza*, além do acúmulo de metais como o Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e As, que se encontravam, naturalmente, nas soluções.

A drenagem ácida de mina quando em pH 2,5 disponibilizou maior quantidade de metais para que fossem absorvidos pelas plantas, no entanto, a acidez do meio inibiu o desenvolvimento das macrófitas estudadas, levando-as a sintomas de toxidez e morte. Com o aumento do pH para 4,5 ocorreu precipitação de alguns metais presentes na solução, com consequente diminuição da concentração dos elementos, porém, permitiu a sobrevivência das plantas e a absorção de quantidades expressivas de metais.

Diferentemente do aumento do pH com a utilização de substâncias químicas, a diluição é uma maneira de reduzir os efeitos da drenagem ácida sobre a biota, o que não impede o desequilíbrio no ecossistema. Os efluentes contendo drenagem ácida de mina que atingem os corpos d'água são diluídos, mas a alteração do pH vai depender da capacidade tamponante do receptor. A redução na concentração de metais e o aumento no pH permitem a utilização de espécies vegetais para remoção dos contaminantes, além de favorecer a reestruturação do ecossistema.

Dentre as espécies estudadas, *E. crassipes* foi a mais tolerante às soluções contendo drenagem ácida de mina, seguida por *S. polyrrhiza*, e *P. stratiotes*. No entanto, *E. crassipes* e *P. stratiotes* se destacaram por apresentar sistema radicular bem desenvolvido, e permitir o acúmulo substancial de metais nas suas raízes, favorecendo o processo de rizofiltração.

A técnica da rizofiltração, como parte da tecnologia de fitorremediação, apresenta melhores resultados quando aplicada em ambientes aquáticos com baixa concentração de contaminantes, uma vez que as plantas aquáticas têm limite de acúmulo de contaminantes, e sendo flutuantes livres – caso das espécies estudadas – sugere-se que essas sejam periodicamente removidas do ambiente de cultivo para que o processo de purificação seja contínuo.

Estudos adicionais sobre a utilização de macrófitas aquáticas devem ser realizados para que a técnica da fitorremediação seja aprimorada e se torne eficiente na remoção de contaminantes, com a finalidade de reabilitação e proteção de corpos d'água receptores de efluentes.