

Influência dos níveis de arsénio solúvel nas atividades enzimáticas em incubações laboratoriais de solo

Influence of soluble arsenic levels on enzyme activities in soil laboratory incubations

Martins, M. Rosário¹, Piçarra, Andreia¹ Nunes, Jorge Delgado^{2*}, Alexandre, Carlos²

¹ Laboratório HERCULES & Departamento de Química, Escola de Ciência e Tecnologia, Universidade de Évora, Largo Marquês de Marialva 8, 7000-809 Évora

² Departamento de Geociências e ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Apdo. 94, 7002-554 Évora, Portugal) *jdnunesl@uevora-pt

Resumo

Os níveis de arsénio no arroz podem representar uma ameaça à saúde pública, sendo essencial desenvolver novas estratégias para reduzir a acumulação deste mineral. As enzimas do solo são importantes indicadores biológicos de fertilidade e qualidade do solo, designadamente desidrogenases, fosfatases, arilsulfatases, β -glucosidases, podendo também estar relacionadas com os níveis de assimilação do arsénio pela planta. Neste estudo procedeu-se à avaliação da atividade enzimática em ensaios laboratoriais com solo alagado contendo teores moderados de arsénio (cerca de metade do qual aplicado em todas as modalidades, excepto no controlo) com e sem adição de óxidos de ferro e/ou manganês, sintetizados e naturais, com vista a avaliar a redução dos níveis de arsénio e a correlacionar com a presença de atividade microbiana. Os resultados revelaram um aumento do teor proteico das soluções do solo aos 30 dias de incubação, sugerindo um aumento da atividade enzimática no decurso da incubação. Os valores de atividade de desidrogenases indicaram a presença de populações microbianas ativas, mas não se observaram diferenças significativas para os diferentes materiais testados. A atividade de fosfatases aumentou no início da incubação e diminuiu aos 30 dias de incubação, indicando uma correlação com os níveis de arsénio nas soluções de solo da maioria das modalidades testadas.

Palavras-chave: Arsénio, qualidade do solo, desidrogenases, fosfatases, arilsulfatases, β -glucosidases.

Abstract

Arsenic levels in rice represent a threat to public health, becoming essential the development of new strategies to reduce this mineral accumulation. Soil enzymes are important biological indicators of soil fertility and soil quality, namely dehydrogenases, phosphatases, arylsulfatases and β -glucosidases, which may also be related to the levels of arsenic assimilation by the plant. For this purpose, several laboratorial experiments with flooded soil, containing moderate levels of arsenic (with about half of it applied to all treatments, except for the control), with and without addition of iron and/or manganese oxides were performed and enzymatic activities were evaluated in order to correlate the presence of microbial activity with the reduction of arsenic levels. Results showed an increase of the protein content of the soil solutions at 30 days of incubation, suggesting an increase of enzyme activity during the time period of the incubation. The values of dehydrogenases activity indicated the presence of active microbial populations, nevertheless no significant differences were observed for the different assays. The phosphatase activity increased at the beginning of incubation, and decreased at 30 days incubation, suggesting a correlation with the arsenic levels of the soil solutions for the majority of the tested treatments.

Keywords: Arsenic, soil quality, dehydrogenases, phosphatases, arylsulfatases, β -glucosidases.

Introdução

Cerca de 50% da população mundial utiliza o arroz (*Oryza sativa*) como alimento, tendo-se verificado que esta cultura tende a acumular elevados níveis de arsénio [1].

O arsénio existe no solo em diferentes estados de oxidação, sendo as formas mais tóxicas o arsenato, As(V), predominante em ambientes aeróbios e o arsenito, As(III), predominante em ambientes anaeróbios [2]. A interconversão entre estas duas formas é interdependente de processos bióticos e abióticos, sendo fortemente influenciada pelo potencial redox, pH do meio e atividade microbiana do solo [3]. Nas plantas, o As pode ser absorvido como As(V) pelos transportadores de fosfato, e convertido na raiz da planta em As(III) por ação de arsenato-reductases [4].

O arroz possui maior capacidade para absorver o arsénio, devido às condições de anaerobiose em que é produzido, sendo essencial desenvolver estratégias e soluções tecnicamente viáveis que permitam reduzir a acumulação de arsénio neste cereal [1,4]. A contaminação por As a longo prazo afeta a qualidade do solo e a sua biomassa microbiana, principal fonte de enzimas, muitas das quais com papel relevante nos ciclos microbiológicos de transformação de substratos essenciais para as plantas [5, 6].

As desidrogenases são enzimas intracelulares indicadoras da biomassa microbiana solo. As fosfatases são enzimas extracelulares envolvidas no ciclo do fósforo, responsáveis pela hidrólise do fósforo orgânico. As arilsulfatases estão envolvidas no ciclo do enxofre e são responsáveis pela hidrólise de ésteres aromáticos em iões sulfato, absorvidos pelas plantas. As β -glucosidases são responsáveis pela hidrólise e biodegradação de β -glicosídeos presentes em tecidos vegetais [6-9].

Neste estudo, pretendeu-se avaliar a influência das enzimas indicadores da

qualidade do solo em ensaios laboratoriais mimetizadores das condições de inundação verificadas nos arrozais, de modo a correlacionar a sua atividade com os tratamentos efetuados e com os níveis de arsénio observados nos diferentes ensaios laboratoriais.

Materiais e métodos

Preparação dos ensaios laboratoriais

Neste estudo, planificaram-se ensaios laboratoriais com solo usado também em ensaios com plantas realizados em Salvaterra de Magos (COTArroz). Foram preparadas incubações fechadas de solo em solução aquosa, contendo apenas solo (C), solo adicionado com arsenito de sódio, de modo a conter 10 mg As kg^{-1} (A), solo contendo As(III) 10 mg.kg^{-1} e $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$ de ferrihidrite (AF), solo contendo 10 mg As kg^{-1} e $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$ de birnessite (AM), solo contendo As(III) 10 mg.kg^{-1} e $0,6 \text{ g.kg}^{-1}$ de ferrihidrite e $0,6 \text{ g.kg}^{-1}$ de birnessite (AFM) e solo contendo As(III) 10 mg.kg^{-1} e $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$ de nódulos de Fe e Mn recolhidos no campo (AN). As amostras foram analisadas após 4h, 7, 15 e 30 dias de incubação. Após centrifugação ($10\,000 \text{ g}$) procedeu-se à filtração do sobrenadante ($0,45 \mu\text{m}$) para obtenção das soluções de solo, que foram conservadas a -20°C até a análise.

Quantificação do teor de proteína

A determinação da concentração de proteína no solo e nas soluções de solo foi efetuada pelo método de Bradford modificado, utilizando solução de azul de Coomassie G $0,06\%$ (m/v), com quantificação do complexo formado a 690 nm [10]. As amostras foram diluídas em tampão fosfato $0,14 \text{ M}$ a pH 7,1 e incubadas num banho com agitação a 37°C durante 2 horas.

Atividade de desidrogenases

A atividade enzimática de desidrogenases no solo inicial e nas soluções do solo foi determinada utilizando como substrato o cloreto de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-

feniltetrazolio (INT) que na presença da desidrogenase sofre uma remoção do hidrogénio com formação do iodonitrotetrazólio-formação (INTF) de coloração avermelhada. As amostras foram incubadas em tampão tris-HCl 1M pH 7,4 contendo INT 0,5 % (m/v) em dimetilformamida (DMF), durante uma hora a 40°C, com agitação. O INTF formado foi quantificado a 490 nm [7].

Atividade enzimática de fosfatases

A quantificação de fosfatases foi determinada pelo método de Tabatabai & Bemner modificado. Este baseia-se na hidrólise do p-nitrofenilfosfato (p-NPP), com libertação de p-nitrofenol (p-NP). Para quantificação da atividade de fosfatases ácida e básica, prepararam-se amostras em tampão universal modificado pH 6 e 9, respetivamente, contendo p-NPP 115 mM e incubadas 1h a 37°C. O p-NP formado foi quantificado a 405 nm [11]

Atividade de arilsulfatases

A atividade enzimática de arilsulfatases foi determinada de acordo com o método descrito por Tabatabai & Bremner modificado, no qual o substrato p-nitrofenilsulfato (p-NPS) é convertido em p-nitrofenol (p-NP). As amostras foram preparadas em tampão acetato 500 mM pH 5,8 contendo p-NPS 25 mM e incubadas durante 2 horas a 22°C, com agitação. O p-NP formado foi quantificado a 405 nm [8].

Atividade de β -glucosidases

A quantificação da atividade de β -glucosidases foi efetuada pelo método proposto por Eivazi e Tabatabai (1998), modificado, no qual o p-nitrofenil- β -glucopiranosido (p-NPG) sofre hidrólise, com quantificação do p-nitrofenol (p-NP). As amostras foram incubadas em tampão universal modificado pH 6,0 contendo p-NPG 50 mM, durante 1 hora a 37°C, com agitação. O p-NP formado foi quantificado a 405 nm [12].

Resultados e discussão

No Quadro 1 apresentam-se os parâmetros bioquímicos do solo inicial. Este apresentou um pH de 6 e um teor proteico de 38 g.Kg⁻¹ de solo.

Quadro 1 – Caracterização bioquímica do solo

Atividade enzimática	($\mu\text{mol/h/g}$ solo)
Desidrogenases	$6,2 \times 10^3 \pm 0,01$
Fosfatases	$11,2 \pm 0,52$
Arilsulfatases	$1,33 \pm 0,62$
β -glucosidases	$4,90 \pm 0,61$

As desidrogenases são enzimas intracelulares que estão envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa do solo. O valor de atividade de desidrogenases observado para o solo encontra-se de acordo com valores tabelados para solos com intensa atividade microbiana [3, 6]. A atividade de fosfatases apresentou valores dentro dos valores de referência, sugerindo uma elevada biodisponibilidade do fósforo inorgânico [3, 5]. O solo apresentou baixos valores de atividade de arilsulfatases, apesar de se encontrar dentro dos valores de referência, o que poderá sugerir a presença de enxofre no solo [13]. O solo apresentou também valores de β -glucosidases dentro do intervalo de referência de atividade, o que poderá sugerir a presença de compostos com alto teor de carbono no solo [13].

Nos ensaios laboratoriais, observou-se uma tendência para um ligeiro aumento do teor proteico nas soluções de solo a partir dos 15 dias de incubação, o que poderá indicar um ligeiro aumento da concentração de enzimas extra-celulares e/ou de microrganismos ativos, em condições de redução. Os valores de atividade de desidrogenases indicaram a presença de populações microbianas ativas, não se observando diferenças entre os diferentes ensaios nem entre os diferentes tempos de incubação.

Aos 30 dias, observou-se um aumento dos valores de atividade de fosfatases nas

soluções da modalidade A comparativamente com a modalidade C. Paralelamente, observou-se também um aumento na atividade de fosfatases nas soluções resultantes das incubações de solo AF e de solo AM em relação a C, mas inferior à modalidade A. Os resultados mostraram também uma tendência para diminuição da atividade enzimática de arilsulfatases nas soluções do solo ao longo do tempo, aos 30 dias de incubação para as modalidades C e AF. Não se observaram diferenças na atividade de β -glucosidases ao longo do tempo de incubação e dos diferentes tipos de incubação.

Estudos recentes referem uma correlação entre a atividade de fosfatases e a biodisponibilidade de arsénio no solo [14]. Dado que, após 30 dias de incubação, as concentrações de As foram muito inferiores nos tratamentos com adição de materiais de Fe e Mn por comparação com a modalidade A, embora superiores ao controlo (C), a variação observada nos níveis de atividade enzimática de desidrogenases e fosfatases poderá estar correlacionada com o teor de arsénio presente nas soluções do solo dos diferentes tratamentos [15].

Agradecimentos

Este trabalho é co-financiado pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no ALENTEJO 2020 (Programa Operacional Regional do Alentejo) através do projeto "Produção de Arroz com baixo teor de arsénio" com a referência ALT20-03-0145-FEDER-000024.

Referências bibliográficas

- [1] Robberecht, H., Van-Cauwenbergh, R., Bosscher, D., Cornelis, R., Deelstra, H. 2002. Daily dietary total arsenic intake in Belgium using duplicate portion sampling and elemental content of various foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 214: 27-32.
- [2] Yu, H.Y., Wang, X., Li, F., Li, B., Liu, C., Wang, Q., Lei, J. 2017. Arsenic mobility and bioavailability in paddy soil under iron compound amendments at different growth stages of rice. *Environmental Pollution* 224: 136-147.

- [3] Doran, J.W. 2002. Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88: 119-127.
- [4] Su, Y.H., McGrath, S.P., Zhao, F.J. 2010. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil*, 328: 27-34.
- [5] Bhattacharyya, P., Tripathy, S., Kima, S.K., Kima S. 2008. Arsenic fractions and enzyme activities in arsenic-contaminated soils by groundwater irrigation in West Bengal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 149-156.
- [6] Winding, A., Hund-Rinke, K., Rutgers, M. 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 230-248.
- [7] Martins, M.R., Santos, F., Candeias, P., Cruz-Morais, J. 2010. Efeito da temperatura, pH e vestígios de Hg^{2+} e Pb^{2+} na actividade de desidrogenases e urease num solo da região de Évora. *Revista de Ciências Agrárias*, 33(1): 314-322. ISSN 0871-018X.
- [8] Shi, J., Vlamis-Gardikas, A., Åslund, F., Holmgren, A., Rosen, B. 1999. Reactivity of glutaredoxins, 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (51): 36039-36042.
- [9] Duan, G. L., Zhu, Y.G., Tong, Y.P., Cai, C., Kneer, R. 2005. Characterization of arsenate reductase in the extracts of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiology*, 138: 461-469.
- [10] Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- [11] Tibbett, M. 2002. Considerations on the use of the p-nitrophenyl phosphomonoesterase assay in the study of the phosphorus nutrition of soil borne fungi. *Microbiological Research*, 157: 221-231.
- [12] Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N. 2002. β -glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20:157-162.
- [13] Burns R. G.; Dick Richard P. 2002. Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications, CRC Press, New York, USA.
- [14] Wang, Z., Tan, X., Lu, G., Naidu R., He, W. 2018. Soil properties influence kinetics of soil acid phosphatase in response to arsenic toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 266-274.
- [15] Nunes, J.D., Alexandre, C., Abreu, M.M. 2018. Efeito de minerais de ferro e manganês no arsénio solúvel em incubações laboratoriais: resultados preliminares. *VIII Congresso Ibérico de Ciência do Solo* (Esta publicação)