

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
METAIS PESADOS EM ÁREAS DE BENEFICIAMENTO
DE MINÉRIO DE OURO**

**Cácio Luiz Boechat
(Tese)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
METAIS PESADOS EM ÁREAS DE BENEFICIAMENTO
DE MINÉRIO DE OURO**

CÁCIO LUIZ BOECHAT
Agrônomo (UNIVALE)
Especialista em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas (UFLA)
Mestre em Ciências Agrárias (UFRB)

Tese apresentada como
um dos requisitos para obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Fevereiro de 2014

CATALOGAÇÃO PÁGINA

CÁCIO LUIZ BOECHAT
Agrônomo (UNIVALE)

TESE

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do Grau de
DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
por

ALBERTO V. INDA JUNIOR
Presidente da Comissão Avaliadora
Departamento de Solos/UFRGS

ALBERTO V. INDA JUNIOR
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo

PEDRO ALBERTO SELBACH
Departamento de Solos/UFRGS

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
Departamento de Solos/UFRGS

ROBSON ANDREAZZA
Centro de Engenharias/UFPel

A **Deus** pelo dom da vida, pelas bênçãos e todas as obras de Suas mãos. Ao meu avô e avó, grandes amigos e exemplos. Ensinaram-me a reconhecer o valor de pequenas coisas como amar o meu próximo.

Joel B. Coelho (in memoriam) e

Leontina Coelho Boechat (in memoriam)...

OFEREÇO.

“Antes, como ministros de Deus, tornando-nos recomendáveis em tudo; na muita paciência, nas aflições, nas necessidades, nas angústias, Como contristados, mas sempre alegres; como pobres, mas enriquecendo a muitos; como nada tendo, e possuindo tudo”

2 Coríntios 6:4,10

Aos meus exemplos, apoiadores, amados e inesquecíveis pais,

José Luiz Boechat e Rita de Cácia Boechat.

Aos meus amigos, companheiros e amados irmãos

Sávio Luiz Boechat e Yuri Luiz Boechat.

Ao meu alicerce, presente de Deus e amada

*esposa **Lorena P. Oliveira Boechat.***

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Ele toda honra, toda glória e todo reconhecimento pelo amor e força ministrados em minha vida, por ter me resgatado e sustentado até aqui.

A UFRGS que me concedeu esta oportunidade.

Ao PPGCS por propiciar a realização do Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, pela orientação, oportunidade e ensinamentos no decorrer do meu doutorado.

Ao Prof. Enilson Saccol de Sá, pelas sugestões, atenção e amizade no dia-a-dia.

Ao Prof. Clésio Gianello, pela ajuda e disponibilidade nas análises laboratoriais.

Aos Professores do PPGCS pelo apoio, ensinamentos e amizade criada e desenvolvida dia-a-dia nos corredores e laboratórios da Universidade.

Aos amigos de laboratório pelo auxílio, companheirismo, amizade e, é claro, boas risadas.

Aos funcionários do laboratório de Análises de solos, pela prontidão, risadas, amizade e serviços prestados.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Jader e Paulo, pelo apoio, paciência, companheirismo e prontidão.

Aos irmãos em Cristo por sempre estarem presentes e solidários na minha caminhada secular e espiritual e, principalmente, pelas orações.

Aos meus amados e queridos pais “adotivos” Sr. Edir e Dna. Leontina pelo apoio, atenção, amor e carinhos dispensados durante este tempo no RS.

Aos proprietários das áreas estudadas Sr. Hugo e esposa pela acolhida, confiança e amizade.

Aos velhos e aos novos amigos, que nas risadas e brincadeiras afora, compartilharam com um pouco da minha e eu das suas vidas e histórias.

E a todos que, de alguma forma, tiveram contribuição na realização deste trabalho.

... que Deus através do nome do nosso Senhor Jesus Cristo lhes recompensem um dia pelas suas ações! ... meus sinceros agradecimentos!

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS EM ÁREAS DE BENEFICIAMENTO DE MINÉRIO DE OURO¹

Autor: Cácio Luiz Boechat

Orientador: Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

RESUMO

O uso de plantas e microrganismos para remediar solos contaminados por metais pesados é uma alternativa aos métodos convencionais desde que o potencial destes organismos seja avaliado. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo identificar plantas capazes de acumular metais, isolar e identificar microrganismos resistentes e biorremovedores de chumbo, avaliar a fitoextração da mucuna-anã associada à bioaumentação por bactérias e os riscos da fitoacumulação de metais em plantas medicinais cultivadas em solos contaminados. Amostras de solo (rizosférico e não rizosférico) e de plantas espontâneas foram coletadas de áreas de mineração contaminadas por metais a mais de 40 anos. Experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da UFRGS, com o objetivo de isolar, identificar e caracterizar a produção de promotores de crescimento vegetal de bactérias resistentes ao Pb, avaliar a bioaumentação bacteriana da mucuna-anã cultivada em solos contaminados e a fitoacumulação de metais pesados em plantas medicinais. Nenhuma planta espontânea foi identificada como hiperacumuladora de metais, porém podem ser usadas nas etapas de recuperação de áreas contaminadas. Foram isoladas 25 bactérias resistentes a Pb. Três isolados bacterianos resistentes a Pb produziram ácido indol-3-acético e sideróforos, contudo não foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio. A temperatura de incubação, o pH inicial e a concentração inicial de Pb afetam o crescimento bacteriano e a biorremoção. A mucuna-anã foi capaz de acumular na fitomassa da parte aérea e raízes elevadas quantidades de Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Pb, Cr, Ba e As sendo considerada uma hiperacumuladora de Cu e Zn. Os teores de Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Cr, Pb, As e Ba encontrados na fitomassa da parte aérea e raiz das espécies medicinais foram muito acima das estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde.

¹ Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (105p.) Fevereiro, 2014. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq.

BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOIL BY HEAVY METALS IN A GOLD MINNING PLANT²

Author: Cácio Luiz Boechat

Adviser: Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

ABSTRACT

The use of plants and microorganisms to remediate soils contaminated by heavy metals is an alternative to conventional methods since the potential of these organisms could be properly evaluated. This study aimed to identify plants capable of accumulating metals, isolate and identify microorganisms capable to resist and remove lead and also produces plant growth promoters, evaluate the phytoextraction of bioaugmented *Mucuna deeringiana* and the potential risks about the use of medicinal plants for heavy metal accumulation. Soil samples (rhizospheric and non-rhizospheric) and spontaneous plants were collected from mining areas contaminated by metals for over 40 years. Experiments were conducted at the laboratory and at the greenhouse with contaminated soil. The greenhouse experiments evaluated the effect of bacterial bioaugmentation in the growth of *Mucuna deeringiana* and the phyto-accumulation of metals in medicinal plants. No spontaneous plant was identified as hyperaccumulator of metals, but can be used during the recovering process of contaminated areas. Three Pb-resistant bacterial isolates were related to produce indole-3- acetic acid and siderophores, but were not able to solubilize calcium phosphate. The incubation temperature, the initial pH and the initial concentration of Pb affect bacterial growth and Pb bioremoval. The *Mucuna deeringiana* was able to accumulate in the biomass of shoots and roots high amounts of Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Pb, Cr, and Ba being considered a Cu and Zn hyperaccumulator. The contents of Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Cr, Pb, As and Ba found in the biomass of the aerial part and roots of medicinal species were above recommended by the World Health Organization.

² PhD Thesis in Soil Science. Graduate Program in Soil Science. Faculty of Agronomy. Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (105p.) February, 2014. Work performed with financial support from CNPq.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico da contaminação das áreas.....	3
2.2 Metais pesados no solo.....	4
2.3 Biorremediação de metais pesados	8
2.4 Fitorremediação de metais no solo.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Bioprospecção de plantas e de microrganismos resistentes a metais pesados	16
3.1.1 Descrição das áreas utilizadas.....	16
3.1.2 Identificação de plantas espontâneas acumuladoras de metais pesados	17
3.1.3 Isolamento e caracterização de microrganismos	19
3.1.3.1 Identificação dos isolados bacterianos.....	20
3.1.3.2 Determinação da biorremoção de chumbo por rizobactérias.....	22
3.2 Fatores ambientais no crescimento e na biorremoção de Pb^{+2} por isolados resistentes.....	22
3.2.1 Efeito da temperatura.....	22
3.2.2 Efeito do pH inicial.....	23
3.2.3 Efeito da concentração inicial de Pb^{+2}	23
3.3 Promotores de crescimento em isolados resistentes ao Pb^{+2} ...	24
3.3.1 Solubilização de fosfato de cálcio ($CaHPO_4$)	24
3.3.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	24
3.3.3 Produção de sideróforos	25
3.3.4 Imobilização de metais pesados em solos	25
3.4 Fitoextração de metais pesados por <i>Mucuna deeringiana</i>	26
3.5 Determinação do acúmulo de metais pesados em plantas medicinais.....	28
3.6 Eficiência fitoextratora	30
3.7 Análises de dados	31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Bioprospecção de plantas e de microrganismos resistentes a metais pesados	32
4.1.1 Atributos químicos do solo e identificação de plantas espontâneas acumuladoras de metais pesados	32
4.1.2 Concentrações de Cu, Zn, Cd, Ni, As, Pb e Ba na parte aérea e raiz	34
4.1.3 Fatores de bioconcentração (FBC) e translocação (FT).....	37
4.1.4 Isolamento e caracterização de microrganismos rizosféricos resistentes ao chumbo	39
4.2 Fatores ambientais no crescimento e na biorremediação de Pb ²⁺ por isolados resistentes.....	42
4.2.1 Efeito da temperatura.....	42
4.2.2 Efeito do pH inicial.....	46
4.2.3 Efeito da concentração inicial de Pb ²⁺	48
4.3 Promotores de crescimento em isolados resistentes ao Pb ²⁺	52
4.3 Fitoextração de metais pesados por <i>Mucuna deeringiana</i> associada a bioaugmentação por rizobactérias resistentes a chumbo.....	54
4.3.1 Produção de fitomassa.....	54
4.3.2 Teores de macronutrientes na fitomassa	55
4.3.3 Teores de micronutrientes na fitomassa.....	58
4.3.4 Metais pesados na fitomassa.....	61
4.3.5 Fitoextração de metais pesados por <i>Mucuna deeringiana</i> ..	65
4.4 Acumulação de metais pesados nas espécies medicinais <i>Cynara scolymus</i> , <i>Ocimum basilicum</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	68
4.4.1 Produção de fitomassa.....	68
4.4.2 Teores de macronutrientes na fitomassa	70
4.4.3 Teores de micronutrientes na fitomassa.....	73
4.4.4 Teores de metais pesados na fitomassa.....	77
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. RESUMO BIOGRÁFICO	104

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Íons de metais pesados, principais fontes poluidoras e características toxicológicas causadas pela exposição.	6
Tabela 2. Formas em que os metais pesados podem ser encontrados nos solos.....	7
Tabela 3. Atributos químicos de amostras de um Neossolo oriundas de área de beneficiamento de minério de ouro contaminadas por metais pesados.	26
Tabela 4. Atributos químicos e físicos das amostras de solo oriundas de área de beneficiamento de minério de ouro contaminadas por metais pesados.	29
Tabela 5. Atributos químicos de amostras de solo oriundas da Área 1 contaminada por metais pesados em Lavras do Sul, Rio Grande do Sul.....	32
Tabela 6. Concentrações de elementos (mg kg^{-1} , peso seco) em amostras de solo rizosférico e plantas espontâneas coletadas em área contaminada por metais pesados no entorno do município de Lavras do Sul, Rio Grande do Sul.	34
Tabela 7. Fatores de translocação (FT) e de bioconcentração (FBC) de metais pesados em plantas coletadas em área contaminada por metais pesados.	38
Tabela 8. Identificação dos isolados obtidos na rizosfera de espécies vegetais coletadas em Neossolo Litólico contaminado por metais pesados baseado no sequenciamento do rRNA da região 16S.	39
Tabela 9. Crescimento e biorremocção por isolados bacterianos em meio líquido contendo elevada concentração de chumbo (Pb^{+2}).	41
Tabela 10. Caracterização dos isolados bacterianos resistentes a chumbo quanto ao teste de gram, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e de sideróforos. .	53

Tabela 11.	Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e relação NN/MSN de plantas de mucuna-anã, após crescimento em diferentes solos contaminados com metais pesados e inoculação com bactérias resistentes a metais.	54
Tabela 12.	Macronutrientes da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).	56
Tabela 13.	Micronutrientes da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).	59
Tabela 14.	Metais pesados da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).	62
Tabela 15.	Fator de translocação (FT) de micronutrientes e metais pesados de plantas de mucuna-anã inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados após crescimento em solos contaminados.	65
Tabela 16.	Fator de bioconcentração (FBC) de micronutrientes e metais pesados de plantas de mucuna-anã inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados após crescimento em solos contaminados.	66
Tabela 17.	Massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais, após crescimento em diferentes solos contaminados com metais pesados....	68
Tabela 18.	Macronutrientes na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).	71
Tabela 19.	Micronutrientes na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).	75
Tabela 20.	Metais pesados na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).	78

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Esquema de uma célula bacteriana Gram-negativa e as diversas famílias de proteínas envolvidas no transporte de metais pesados. Influxo: MIT - sistema de transporte de metal, ATPase e ABC - transportadores dependentes de ATP, PIT - transporte de fosfato inorgânico, HoxN - transporte específico de Ni^{+2} e Co^{+2} e MerT/MerP - transporte específico de Hg^{+2} . Efluxo: RND - resistência, nodulação e divisão celular, ATPase e ABC - transportadores dependentes de ATP, CDF - facilitador de difusão de cátion, MFS - superfamília de facilitadores de difusão de cátion, CHR - sistema de efluxo de cromato e ArsB - sistema de efluxo de arsenito. 11
- Figura 2.** Esquema de distribuição dos pontos amostrados em área contaminada por metais pesados oriundos do beneficiamento de minério para extração de ouro.. 18
- Figura 3.** Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes temperaturas em meio líquido contendo 300 mg L^{-1} de chumbo, quantificadas pelo crescimento celular (DO_{600}). *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada temperatura e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre temperaturas dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média..... 43
- Figura 4.** Caracterização quanto à biorremediação de chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes temperaturas

em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo, quantificadas pelo chumbo remanescente em meio líquido (mg L⁻¹). *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada temperatura e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre temperaturas dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.
45

Figura 5. Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes pH em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo, quantificadas pelo crescimento celular (DO₆₀₀); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada pH e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre pH dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.
47

Figura 6. Caracterização da capacidade de alteração do pH do meio dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Bactéria inconclusiva (SL1) e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes pHs iniciais em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo; *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada pH inicial e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre pH inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.....
48

Figura 7. Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes concentrações de chumbo em meio líquido, quantificadas pelo crescimento celular (DO₆₀₀); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro da concentração e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre concentração inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.....
49

Figura 8. Caracterização quanto à biorremoxão de chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Bactéria inconclusiva (SL1) e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes concentrações de chumbo, quantificadas pelo percentual de chumbo remanescente em meio líquido (mg L⁻¹); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro da concentração e mesma

letra maiúscula não diferem entre si entre concentração inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média. 51

1. INTRODUÇÃO

Com o início da revolução industrial no Reino Unido, foi estabelecido um novo modelo de desenvolvimento econômico e tecnológico baseado no uso intensivo da matéria prima, energia e de recursos naturais para atender uma população que crescia em taxa exponencial e sustentar o surgimento de um sistema capitalista moderno. Sabe-se hoje que a capacidade dos ecossistemas e das reservas naturais se recuperarem é menor do que a velocidade da exploração antrópica exercida nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Cerca de três séculos após o início da revolução industrial e dois séculos após a expansão pelo mundo a sociedade moderna tenta achar respostas para alguns legados negativos deixados por aquele modelo de desenvolvimento.

A exploração de minerais metálicos seguiu os passos da revolução industrial que dependia diretamente desses recursos, que em parte, eram a matéria-prima básica para os processos de metalurgia e indispensáveis para a manutenção do nível de vida e avanços das sociedades modernas. Contudo, os processos de mineração ao longo da história apresentavam baixo nível tecnológico e nenhuma preocupação quanto aos danos ambientais advindos da atividade. Portanto, impactaram diversas áreas ao redor do globo e como “herança”, deixaram passivos ambientais decorrentes da contaminação química, a partir da liberação de metais pesados potencialmente tóxicos no ambiente, além da degradação física das áreas exploradas.

No Estado do Rio Grande do Sul existem relatos da contaminação de solos, água e ar resultante de atividades mineradoras em diversas regiões. A região do Escudo Sul-rio-grandense, localizado na região Sudeste do Estado, é conhecida pela riqueza e diversidade mineral. A exploração de ouro na região

foi intensa no século XVIII, porém ao final da década de 80, a exploração aurífera entrou em decadência, deixando um passivo ambiental de alto risco, devido a presença de elevadas concentrações de metais pesados, desconhecida pela população local. O acúmulo desses elementos nas áreas onde se beneficiavam o minério pode não apenas causar uma redução na capacidade produtiva das áreas, devido à fitotoxicidade dos metais, mas também causar danos à saúde humana e animal.

A decisão de remediar áreas contaminadas por metais pesados, passa pela análise inicial de risco à população e pela capacidade do solo em responder aos processos empregados. A biorremediação torna-se uma alternativa promissora nas áreas contaminadas, pois é considerada uma tecnologia de baixo custo, associada ao uso de plantas e/ou microrganismos, presentes nas áreas a serem remediadas, sendo, portanto, adaptados aos fatores edafoclimáticos da região a qual está inserida.

Com base nessas considerações, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de: a) Identificar espécies vegetais nativas espontâneas capazes de acumular metais pesados; b) Isolar e identificar microrganismos resistentes ao chumbo e capazes de biorremovê-lo em meio líquido; c) Avaliar o potencial fitoextrator de espécie leguminosa associada a bioaugmentação por bactérias resistentes a chumbo e; d) Avaliar os riscos da fitoacumulação de metais pesados em plantas medicinais e comestíveis cultivadas em solo contaminado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da contaminação das áreas

Em 1796, ocorreu a primeira descoberta de ouro em Lavras do Sul – RS, dando origem ao início da colonização do município e a exploração da mineração aurífera na região. Existem registros de que o ouro do território onde hoje se localiza o município foi explorado por europeus e canadenses. Embora, o povoamento tenha se estabelecido em 1825, belgas, espanhóis, portugueses, índios e bandeirantes paulistas, também já estavam na região, atraídos pela quantidade de ouro existente, sendo estes os principais colonizadores da cidade (Calógeras, 1938).

O município de Lavras do Sul originou-se de um acampamento mineiro instalado às margens do Rio Camaquã para exploração das pepitas de ouro depositadas no leito do rio. O território do município pertenceu inicialmente aos municípios de Rio Grande e de Rio Pardo, quando a província de São Pedro possuía apenas quatro municípios (Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande, Rio Pardo e Porto Alegre), depois fez parte do território de Nossa Senhora da Conceição da Cachoeira, com o passar do tempo passou a pertencer ao território de Caçapava do Sul e finalmente em 9 de maio de 1882 passou a categoria de Vila, com o nome de Santo Antônio das Lavras, formada por territórios dos municípios de Caçapava do Sul e Bagé. Em 1938 passa à categoria de cidade com o nome de Lavras do Sul (CLS, 1982).

Os teores de ouro das minerações eram baixos, em média 5 g t^{-1} (Calógeras, 1938). A maioria do minério, extraído das diversas minas da região era transportado para um dos três moinhos de beneficiamento, conhecidos por Chiapetta, Paredão e Cerro Rico, que funcionaram em períodos distintos até a primeira metade do século XX (Grazia & Pestana, 2006).

A amalgamação por mercúrio (Hg) foi realizada na região, por esses moinhos e, no final da década de 1980, pela Companhia Rio Grandense de Mineração (CRM). Resultando na contaminação residual por Hg e outros metais no entorno de algumas destas unidades de beneficiamento. A contaminação foi comprovada em amostras de solos coletadas na área da CRM e do Moinho Chiapetta e em uma amostra de sedimento, coletada na lagoa de tratamento do moinho Cerro Rico (Pestana & Formoso, 2003).

2.2 Metais pesados no solo

Uma grande variedade de produtos químicos, por exemplo, metais pesados, pesticidas, solventes clorados, dentre outros, têm sido detectados em diferentes recursos naturais tais como solo, água e ar (Mansour & Gade, 2010). Entre os poluentes, os metais pesados são motivo de preocupação para a saúde humana devido à sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (Lim & Schoenung, 2010).

O termo “metais pesados” é de definição ambígua, contudo é utilizado, principalmente na literatura científica, como referência a um grupo de elementos amplamente associados à poluição, contaminação e toxicidade (Amaral Sobrinho, 1993). Conceitualmente, metais pesados são definidos como elementos que possuem densidade superior a 6 g cm^{-3} , ou ainda, aceito por alguns autores 5 g cm^{-3} ou que possuem número atômico maior que 20. Essa definição é abrangente a qualquer elemento tóxico às plantas e animais e inclui, inclusive, alguns metalóides ou semi-metais, como o arsênio (As) e o selênio (Se) (Alloway, 1990; Alloway, 1995; Meurer, 2004).

Os metais pesados são altamente reativos do ponto de vista químico, o que explica a dificuldade de encontrá-los em estado puro na natureza. Normalmente, apresentam-se em concentrações baixas em condições naturais, associados com outros elementos químicos, formando minerais em rochas (Alloway, 1995). A concentração total inicial dos metais pesados no solo depende, entre outros fatores, do material de origem e do processo de formação do mesmo (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Esses elementos químicos podem estar em praticamente todos os compartimentos ambientais e possuem um importante papel biológico. Na nutrição de plantas são essenciais e por serem absorvidos em pequenas

quantidades são chamados de micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Zn), outros são benéficos aos vegetais (Mo e possivelmente o Ni), aos microrganismos (Co e Mo - Bactéria *Rhizobium*) e aos animais (As, Co, Cr, Mo, Cu, Se, Zn) (King, 1996; Bruins et al., 2000; Alloway & Ayers, 1996). Contudo, mesmo aqueles considerados essenciais podem se tornar tóxicos para as plantas e/ou animais quando presentes em elevadas concentrações, ocorrendo o mesmo com os não essenciais, como o cádmio, chumbo e mercúrio (Bruins et al., 2000).

A toxicologia é a ciência que tenta identificar qualitativamente todos os perigos, isto é, a toxicidade nos órgãos, associados a uma substância, bem como determinar quantitativamente as condições de exposição em que esses perigos/toxicidades são induzidos (James et al., 2000). A toxicologia está baseada em três elementos. O primeiro, o agente químico, capaz de produzir um efeito; o segundo, o sistema biológico, com o qual o agente químico irá interagir para produzir o efeito; e o terceiro, o efeito resultante que deverá ser adverso (ou tóxico) para o sistema biológico (Ariens et al., 1978; Larini, 1997).

Todos os metais pesados e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade de causar efeito tóxico para o sistema biológico (Tabela 1). O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo e a exposição, está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição (Goyer, 1996).

Tabela 1. Íons de metais pesados, principais fontes poluidoras e características toxicológicas causadas pela exposição.

Íon	Principais fontes poluidoras	Características toxicológicas
Arsênio (As)	Herbicidas, inseticidas, fungicidas, mineração, indústria de vidros, tintas e corantes.	O grau de toxicidade depende basicamente da forma do composto (se inorgânico ou orgânico) e do estado de oxidação do elemento. Geralmente, os compostos inorgânicos são considerados mais tóxicos do que os orgânicos. As formas trivalentes (As^{3+}) são mais tóxicas do que as formas pentavalentes (As^{5+}), pelo menos em doses muito elevadas. Diversos órgãos de diferentes sistemas são afetados pelo arsênio, incluindo a pele e os sistemas respiratório, cardiovascular, imunológico, reprodutivo, gastrointestinal e nervoso (IPCS, 2001).
Cádmio (Cd)	Efluentes industriais, galvanoplastia, produção de pigmentos, equipamentos eletrônicos, lubrificantes, acessórios fotográficos, inseticidas e combustíveis fósseis.	Os efeitos tóxicos em animais experimentais são influenciados por fatores genéticos, nutritivos e por interações com outros metais (com zinco em particular). Um estudo recente, com duração de 18 meses, expôs ratos continuamente, pela via inalatória, a um aerossol com baixa concentração de cloreto de cádmio. Observou-se incidência elevada de câncer de pulmão e evidenciou-se a relação entre dose e resposta. A inalação do Cd em níveis elevados causa edema pulmonar letal (IPCS, 1992).
Cromo (Cr)	Efluentes industriais, produção de alumínio e aço, tintas, pigmentos, explosivos, papel e fotografia.	Os efeitos tóxicos do Cr^{3+} ocorrem somente pela administração parenteral. Seres humanos e animais quando expostos ao Cr, desenvolvem câncer (IPCS, 1988; USEPA, 1978). O Cr^{6+} na dieta afeta o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico e causa vários danos genéticos, incluindo danos no DNA, e incorporação dos nucleotídeos na transcrição do DNA. Em alguns estudos, o $CrCl_3$ foi encontrado acumulado no núcleo da célula (até 20% do índice celular de cromo) (IPCS, 1988; USEPA, 1978).
Cobre (Cu)	Corrosão de tubulações, esgotos domésticos, algicidas, fungicidas, pesticidas, mineração, fundição e refinamento de metais.	Existem poucos casos reportados sobre efeitos agudos do cobre. Entre eles destacam-se: queimação gástrica, náuseas, vômitos, diarreias, lesões no trato gastrointestinal e anemia hemolítica. Efeito crônico é raramente reportado, exceto o Mal de Wilson, responsável pelo acúmulo de cobre no fígado, cérebro e rim (Quinágua, 2001).
Zinco (Zn)	Galvanoplastias, mineração, combustão de madeira, incineração de resíduos, esgotos domésticos e produção de ferro e aço.	O acúmulo do Zn não provoca deficiências profundas. Por este motivo é considerado como de baixa toxicidade. A ingestão excessiva do zinco pode provocar distúrbios gastrointestinais e diarreia (Eleutério, 1997; Petroni, 1999).
Chumbo (Pb)	Efluentes industriais, tabaco, tintas, tubulações, metalurgia e indústria de eletrodeposição.	A maior parte do Pb entra no organismo humano pelas vias respiratória e gastrointestinal. Após absorção, o Pb pode ser encontrado no sangue, tecidos moles e mineralizados (ATSDR, 1999). Segundo ATSDR (1992), por razões neurológicas, metabólicas e comportamentais as crianças são mais vulneráveis aos efeitos do Pb que os adultos. Dentre seus efeitos, destacam-se: decréscimo do quociente de Inteligência, efeitos no sistema nervoso com déficit nas funções cognitivas, diminuição das sensoriais, nervosas involuntárias e renais e a ocorrência de partos prematuros (IPCS, 1995; Vega-Dienstmaier et al., 2006; Bellinger et al., 2005).

É conhecido que o grau de mobilidade dos metais pesados é determinado pelas características do solo como: pH, temperatura, potencial redox, CTC, competição com outros metais, ligação com ânions e composição, além da força iônica da solução do solo (Oliveira & Costa, 2004; Camargo, et al., 2001) e pelos teores de matéria orgânica e inorgânica que influenciarão as reações de precipitação, dissolução, adsorção, dessorção, complexação e oxirredução (Oliveira & Mattiazzo, 2001). Estas reações estão diretamente relacionadas às formas em que os metais pesados podem estar presentes no solo (Tabela 2). Dentre as variáveis químicas, físicas e mineralógicas de 12 classes de solos do Brasil, as que mais contribuirão na magnitude de adsorção dos metais pesados nos solos foram carbono orgânico, capacidade de troca de cátions efetiva, pH e argila (Araújo et al., 2002).

Tabela 2. Formas em que os metais pesados podem ser encontrados nos solos.

Forma	Descrição
Solúvel	Os íons livres formam complexos solúveis com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos (biomoléculas e ácidos fúlvicos). Os metais pesados são absorvidos pelas plantas, microrganismos e/ou lixiviados no solo quando estão presentes nesta forma (Alloway, 1995; Camargo et al., 2001).
Trocável	Os íons metálicos estão adsorvidos por forças eletrostáticas em sítios carregados negativamente presentes na matéria orgânica ou em minerais. Geralmente a energia de ligação envolvida é baixa, possibilitando uma troca rápida com a fração presente na solução do solo. A capacidade de troca de cátions (CTC) é um indicativo do potencial do solo em apresentar metais pesados na forma trocável, entretanto, devem ser considerados fatores como seletividade do metal, pH, atividade iônica da solução e concentração de outros cátions (Alloway, 1995; Meurer et al., 2000; Ji & Li, 1997).
Adsorção específica	Os íons se encontram adsorvidos covalentemente (complexos de esfera-interna) a sítios específicos de filossilicatos, óxidos e matéria orgânica. A reação envolve alta energia de ligação, sendo que os metais são liberados de forma muito mais lenta do que na trocável (Alloway, 1995).
Ligados a materiais orgânicos insolúveis	Os metais pesados são complexados por materiais orgânicos resistentes à degradação microbiana ou presentes em células recentemente mortas (Alloway, 1995)
Precipitados	Encontram-se na forma de carbonatos, sulfatos, fosfatos, hidróxidos, entre outros. Os metais podem formar os precipitados diretamente com os ânions, ou ainda podem ser co-precipitados junto a componentes pouco solúveis de Ca, Mg, Fe e Al conforme estes vão sendo formados. As reações de precipitação são previstas pela constante do produto de solubilidade (Alloway, 1995).

2.3 Biorremediação de metais pesados

O termo biorremediação ou remediação biológica inclui a fitorremediação, biorremediação e a combinação entre eles. Os metais pesados não podem ser degradados química ou biologicamente, portanto persistem no solo. A remediação busca alterar a especiação para formas não tóxicas, ou ainda, a remoção do metal ou metalóide do solo ou outros ambientes. (Camargo et al., 2007; Ma et al., 2011; Rajkumar et al., 2012).

A biorremediação com microrganismos baseia-se na utilização de microrganismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes (Moreira & Siqueira, 2006). Esses microrganismos podem ser de ocorrência natural nas áreas contaminadas ou organismos geneticamente modificados para a restauração da área e proteção do meio ambiente. Contudo, o sucesso da técnica de remediação depende de microrganismos resistentes e tolerantes, capazes de manter suas funções metabólicas, mesmo após a captação de metais. A interação entre microrganismos e metais pesados vem ocorrendo desde o início da vida no planeta, a aproximadamente 4 bilhões de anos, o que permitiu a evolução de sistemas biológicos de resistência permitindo a sobrevivência em ambientes contendo elevadas concentrações de metais (Silver & Phung, 2005; Valls & Lorenzo, 2002).

A seleção e a identificação de bactérias resistentes e capazes de biorremover metais pesados em amostras ambientais, é importante, pois possibilita utilizar as características intrínsecas a estas, em conjunto com a técnica de fitorremediação, por exemplo, promovendo o crescimento das plantas e solubilização dos metais pesados, além disso, incrementa a remoção dos metais, através de diferentes mecanismos nas diferentes etapas do processo de remediação (Germaine et al., 2013).

Hutchinson & Symington (1997) relataram que a exposição prolongada aos metais impõe uma pressão de seleção que favorece a proliferação de microrganismos que toleram metais. Portanto, se faz necessário o isolamento destes microrganismos em áreas conhecidamente contaminadas, devido a pressão que o meio exerce nas comunidades microbianas, promovendo uma espécie de seleção natural. De acordo com Lima & Silva et al. (2012), pode presumir-se que a pressão seletiva exercida por metais pesados, também

contribuiu para a co-seleção indireta da resistência aos antibióticos, especialmente em ambientes contaminados com estes elementos.

Os contaminantes são transformados por organismos vivos, através de reações que ocorrem naturalmente como parte de seus processos metabólicos (Vidali, 2001). De acordo com Bruschi & Goulhen (2007), os processos de biorremediação utilizando-se microrganismos, podem ser divididos em dois grupos principais: um grupo explora as atividades enzimáticas metal-redutase das bactérias (redução direta) e o segundo grupo envolve a utilização de sulfeto de hidrogênio, produzido biologicamente para reduzir ou precipitar metais (redução indireta).

Muitos são os mecanismos envolvidos na resistência e tolerância de metais pesados desenvolvidos por microrganismos. Dentre eles, destacam-se a biossorção, precipitação, biomineralização, produção de sideróforos, biossurfactantes e proteínas ligantes, que podem sobrepor-se na aquisição de metais pesados presentes no meio (Camargo et al., 2007).

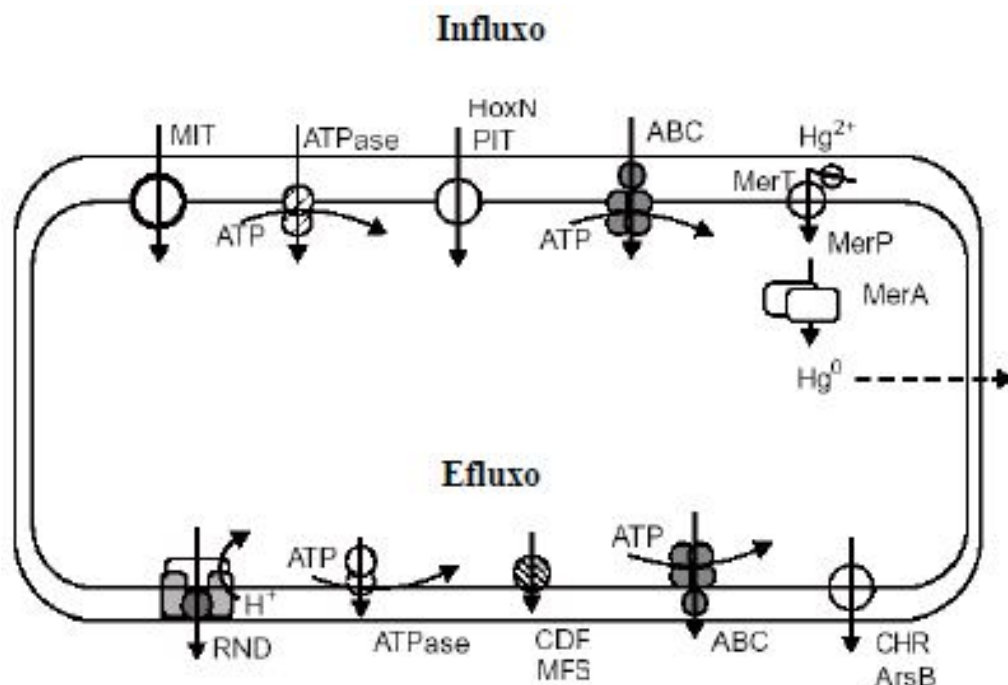
Diversos estudos têm demonstrado a influência de fatores ambientais na resistência e remoção de metais por isolados bacterianos resistentes (Silva et al., 2009; Andrezza et al., 2010; Sanuth et al., 2010; Giongo et al., 2010; Chatterjee et al., 2012; Turgay et al., 2012.; Zhang et al., 2012; Andrezza et al., 2013). A diversidade procariota ideal, não é restrita apenas às relações entre oxigênio molecular ou a sua capacidade para captar a radiação, mas também depende do pH do solo, da temperatura (frio, ambiente, quente), sais inorgânicos, etc. (Herman et al., 1993; Hurst, 2002). Além disso, fatores como o pH, temperatura e concentração de poluente afeta a eliminação biológica de substâncias poluentes. Esses fatores afetam o metabolismo microbiano em geral, e especificamente promovem ou inibem a atividade enzimática (Whiteley & Lee, 2006; Rodriguez-Montelongo et al., 2006).

Após a entrada na célula microbiana os metais pesados apresentam toxicidade. Entretanto, a entrada do metal pesado na célula ocorre de duas formas ou por duas vias, sendo uma inespecífica e outra de grande especificidade (Biondo, 2008). A primeira ocorre através de um gradiente quimiosmótico da membrana citoplasmática (transporte passivo), e a segunda envolve hidrólise de ATP (transporte ativo) (Nies & Silver, 1995). De maneira geral, as proteínas envolvidas no transporte passivo de íons são expressas

constitutivamente pelas células, enquanto a expressão das proteínas de transporte ativo é regulada (Biondo, 2008).

Em bactérias Gram negativas, por exemplo, a entrada de cátions metálicos divalentes (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} e Zn^{+2}) ocorre passivamente pelo sistema de incorporação de Mg^{+2} (MIT), devido a similaridade estutural. Ocorrendo o mesmo com ânions de cromato (CrO_4^{-2}) e arsenito (AsO_4^{-3}), entrando na célula pela via de assimilação passiva de sulfato (SO_4^{-2}) e pelo sistema de transporte de fosfato inorgânico (PIT), respectivamente (Nies, 1999).

De acordo com Nies (1999), a fim de manter a homeostase do metal pesado, o nível intracelular de íons metálicos tóxicos tem de ser bem controlado (Figura 1). A captação de íons pela célula microbiana através do transporte ativo é realizada principalmente por ATPases, que são grupos de proteínas envolvidas no transporte de metais pesados para o lado de fora da membrana celular bacteriana e com função de governar a resistência aos metais pesados (Nies & Silver, 1995; Rensing et al., 1999). Essas proteínas transportadoras impedem o excesso e acumulação de íons metálicos tóxicos e altamente reativos, como o Pb^{+2} , Cu^{+} , Ag^{+} , Zn^{+2} e Cd^{+2} . O transporte ativo via ATPases, pode ser dividido em dois sub-grupos: a) ATPases de translocação de Cu^{+}/Ag^{+} codificadas pelo gene *copA* em *Enterococcus hirae*, *Helicobacter pylori*, e *Escherichia coli* e a translocação de $Zn^{+2}/Cd^{+2}/Pb^{+2}$ por ATPases codificadas pelo gene *zntA* em *E. coli*, e no plasmídeo de *Staphylococcus aureus* pelo gene *cad A*, (Nies & Silver, 1995; Rensing et al., 1999; Naik & Dubey, 2013). No entanto, sistemas de transporte específicos como HoxN, para Ni^{+2} e Co^{+2} , e MerT - MerP, do operon de resistência a mercúrio, também são utilizados pela célula (Nies, 1999).



Fonte: Bionde (2008) baseado em Nies (1999) e Silver & Phung (2005)

Figura 1. Esquema de uma célula bacteriana Gram-negativa e as diversas famílias de proteínas envolvidas no transporte de metais pesados. Influxo: MIT - sistema de transporte de metal, ATPase e ABC - transportadores dependentes de ATP, PIT - transporte de fosfato inorgânico, HoxN - transporte específico de Ni²⁺ e Co²⁺ e MerT/MerP - transporte específico de Hg²⁺. Efluxo: RND - resistência, nodulação e divisão celular, ATPase e ABC - transportadores dependentes de ATP, CDF - facilitador de difusão de cátion, MFS - superfamília de facilitadores de difusão de cátion, CHR - sistema de efluxo de cromato e ArsB - sistema de efluxo de arsenito.

2.4 Fitorremediação de metais no solo

A biorremediação baseada no uso de espécies vegetais e suas interrelações com microrganismos para o tratamento *in situ*, de solo e água contaminados, têm sido, em geral, chamada de fitorremediação. Esta tecnologia pode fornecer uma solução economicamente viável para a recuperação de sítios contaminados por metais pesados (Sriprang & Murooka, 2007).

Com o objetivo de limpar o solo e as águas subterrâneas de substâncias tóxicas foi formulado pela Environmental Protection Agency (EPA), em 1986, a primeira sequência de procedimentos de correção para uma área contaminada. Essas ações corretivas foram desenvolvidas em cinco fases, sendo a inicial uma vistoria e avaliação preliminar do sítio, passando pela proposição de técnicas de remediação até a implementação das medidas corretivas e estabilizadoras (Bartenfelder, 1992).

As aplicações práticas da fitorremediação podem ser classificadas de acordo com o destino dos contaminantes, por exemplo, degradação, contenção, extração e uma combinação dessas. Além disso, podem ser classificadas de acordo com os mecanismos envolvidos no processo, tais como: extração do contaminante do solo e das águas subterrâneas; concentração de contaminantes no tecido vegetal; degradação do contaminante por processos abióticos e bióticos; volatilização ou transpiração de contaminantes voláteis das plantas para o ar; imobilização de contaminantes na zona radicular; controle hidráulico de águas subterrâneas contaminadas; e controle do escoamento superficial, erosão e infiltração por tipos de coberturas vegetais (USEPA, 2000).

As concentrações de metais pesados no ambiente aumentam a cada ano (Govindasamy et al., 2011). O que têm gerado uma pressão no sentido da necessidade de recuperação dos solos contaminados por metais pesados, devido ao impacto desses sobre os ecossistemas terrestres e aquáticos. Contudo, segundo Barceló & Poschenrieder (2003) esta tarefa é extremamente árdua em relação ao custo e a complexidade técnica. Diversos métodos, com diferentes abordagens, físicos, químicos e biológicos foram criados para tais fins, porém os métodos físicos e químicos sofrem de limitações como alto custo, mão de obra intensiva, as mudanças irreversíveis em propriedades do solo e perturbação da microbiota nativa do solo (Ali et al., 2013).

Segundo Ali et al. (2013) uma solução alternativa para o problema da poluição por metal pesado e dos elevados custos e dispendioso trabalho das técnicas convencionais é a fitorremediação. Ainda de acordo com os autores, a fitorremediação pode apresentar um reduzido custo efetivo e ser um método de remediação eficiente e favorável ao meio ambiente na descontaminação de solos contaminados com metais pesados.

As técnicas de fitorremediação incluem fitoextração (ou fitoacumulação), fitofiltração, fitoestabilização, fitovolatilização e fitodegradação (Ma et al., 2011). Contudo, segundo Cherian & Oliveira (2005); Sun et al. (2011); Milic et al. (2012) a fitoextração é a principal técnica de fitorremediação, sendo a mais utilizada e comercialmente promissora para a remoção de metais pesados e metalóides de solos contaminados, sedimentos ou água. Contudo, a eficiência da fitoextração depende de muitos fatores como a biodisponibilidade dos metais

pesados no solo, as propriedades do solo, a especiação dos metais pesados e das espécies de plantas envolvidas (Ali et al., 2013).

Algumas características vegetais são adequadas na fitoextração, como elevada taxa de crescimento, alta produção de biomassa na parte aérea, sistema radicular bem distribuído e ramificado, elevada acumulação do metal alvo, elevada capacidade de translocação do metal das raízes para a parte aérea, tolerância aos efeitos negativos do metal, adaptada as condições ambientais, resistente a patógenos e pragas, de fácil cultivo e colheita e repudiada por herbívoros evitando que o metal entre na cadeia alimentar (Mejárez & Bülow, 2001; Adesodun et al., 2010; Ma et al., 2011; Sakakibara et al., 2011; Bech et al., 2012; Shabani & Sayadi, 2012).

Li et al. (2010) afirmam que o potencial fitoextrator de uma espécie vegetal é determinado por dois fatores chave; a concentração do metal alvo na parte aérea e a produção de fitomassa. Entretanto, duas vertentes têm sido testadas na fitoextração de metais pesados. A primeira utiliza plantas hiperacumuladoras de metais, que geralmente, produzem pouca fitomassa na parte aérea, mas acumulam elevados teores de metal pesado. As espécies hiperacumuladoras são plantas capazes de acumular mais de 100 mg kg^{-1} de Cd em peso seco, ou mais que 1.000 mg kg^{-1} em peso seco de Ni, Cu ou Pb, ou ainda, mais de $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ em peso seco de Zn e Mn em sua parte aérea quando cultivada em solos ricos em metais (Baker & Brooks, 1989), ou de acordo com Van der Ent et al. (2013), os valores de concentração para diferentes metais na fitomassa seca das folhas de plantas, que crescem em seus habitats naturais, de 100 mg kg^{-1} para Cd, Se e Ti; 300 mg kg^{-1} de Co, Cu e Cr; 1.000 mg kg^{-1} para o Ni, Pb e As, 3.000 mg kg^{-1} de Zn; $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn. A segunda utiliza outras espécies vegetais, que acumulam metais pesados em menor quantidade, porém produzem grandes quantidades de fitomassa na parte aérea, o que iguala na soma global de metal extraído (Ali et al., 2013).

No processo de fitorremediação e aplicação da técnica de fitoextração de metais pesados, outro fator que deve ser considerado, devido à sua importância para aplicações práticas, são as associações entre plantas e microrganismos do solo tolerantes aos metais. Esta linha de pesquisa tem sido objeto de atenção especial devido ao potencial remediador dos microrganismos em ambientes poluídos ou dos seus efeitos sobre a mobilização/imobilização de

metais e conseqüente, aumento da absorção de metais e crescimento das plantas (Sriprang & Murooka, 2007; Braud et al., 2009; Dimkpa et al., 2008 e 2009a,b; Ma et al., 2011).

É sabido que o crescimento das plantas é afetado por microrganismos de várias maneiras. Alguns microrganismos causam doenças e inibem o crescimento das plantas, outros podem ativar ou promover o crescimento através de uma variedade de mecanismos (fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de fitohormônios) (Zhuang et al., 2007; Ma et al., 2011), e há um grande número de microrganismos do solo que parecem não afetar diretamente o crescimento vegetal de uma forma ou de outra, embora esta observação possa variar como resultado de uma gama de diferentes condições do solo rizosférico, incluindo teor de matéria orgânica, pH, temperatura, nutrientes e nível de poluentes (Bais et al., 2006).

As bactérias associadas às plantas podem melhorar a fitoextração, alterando a solubilidade, disponibilidade e transporte de metais pesados e nutrientes, reduzindo o pH do solo, a liberação de agentes quelantes, a solubilização de fosfato, ou alterações redox, além da produção de enzimas, ácidos orgânicos ou biosurfactantes (Zhuang et al., 2007).

Entre os vários metabólitos produzidos por bactérias promotoras de crescimento, os sideróforos desempenham um papel significativo na mobilização e acumulação de metais (Dimkpa, et al., 2009b; Rajkumar et al., 2010), esses compostos solubilizam formas indisponíveis de metais ligadas ao ferro, além de formar complexos com íons bivalentes de metais que podem ser assimilados por processos mediados pela raiz (Braud et al., 2009). Diversos autores observaram que a utilização sinérgica de plantas e microrganismos tem sido lucrativa para a limpeza de solos contaminados (Jing et al., 2007; Glick, 2010).

Diversos são os fatores envolvidos na fitorremediação dos solos contaminados por metais pesados e as diretrizes para o sucesso da aplicação da técnica. Muitos trabalhos têm demonstrado o potencial de algumas espécies para a fitorremediação de metais pesados e metalóides (Andreazza et al., 2013; Lima et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Gomes et al., 2013). Entretanto, o acúmulo de metais pesados em plantas comestíveis e medicinais necessita de investigações minuciosas para se evitar que concentrações elevadas de metais pesados cheguem ao consumidor (Sharma et al., 2009; Street, 2012). Portanto,

as respostas das plantas comestíveis e/ou medicinais aos metais pesados devem ser investigadas em especial no ambiente solo-planta (Kabata-Pendias, 2001).

Na literatura, existem diversos relatos de plantas medicinais com capacidade para acumular metais pesados quando cultivadas em ambientes naturais (Bhattacharjee et al., 2004; Kelly et al., 2002; Annan et al., 2010). Portanto, para a investigação da fitoextração de metais pesados por plantas medicinais é necessário o conhecimento da contaminação do solo, da diversidade e da forma em que os metais pesados se encontram, das espécies utilizadas, do manejo aplicado ao solo e as plantas, além das características da espécie vegetal e a afinidade com os íons metálicos, translocação e acumulação.

Outra questão importante é: qual será o destino das plantas depois de terem sido usadas propositalmente ou não, na fitoextração ou acumulação de metais pesados? Tais plantas após a queima podem ser eliminadas como resíduos perigosos de forma segura em lixões especializados ou se economicamente viável, serem submetidas a processos para biorecuperação de metais preciosos e metais semi-preciosos (uma prática conhecida como fitomineração) (Jadia & Fulekar, 2008; Jadia & Fulekar, 2009; Sheoran et al., 2011; Ali et., 2013).

O uso de plantas para remediar solos contaminados por metais pesados tem sido visto como uma grande oportunidade, em comparação aos métodos convencionais da engenharia civil (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Entretanto, o potencial papel dos microrganismos nesta abordagem, ainda é, por muitas vezes, subestimado (Nwaichi & Onyeike, 2010; Nesler & Furini, 2012), sendo necessários estudos minuciosos para compreender e conhecer todos os mecanismos envolvidos na interação planta-solo-microrganismo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioprospecção de plantas e de microrganismos resistentes a metais pesados

3.1.1 Descrição das áreas utilizadas

Foram identificadas três áreas contaminadas próximas a cidade de Lavras do Sul na região Sudeste do estado do Rio Grande do Sul. As áreas estão localizadas nas coordenadas geográficas, 30° 81' 58" S, 53° 92' 05" O (Área de estudo 1 e campo natural) e 30° 81' 12" S, 53° 82' 07" O (Área de estudo 2). As áreas 1 e 2 apresentam elevadas concentrações de Zn, Cu, Mn, Cd, Ni, Cr, Pb, Ba e As, entretanto as concentrações no campo natural foram consideradas os teores naturais desses elementos, por não haver intervenção antrópica na área. Todas as áreas de estudo são de cerca de 10 hectares (ha) e são cobertas por vegetação típica de savana com pequenos arbustos lenhosos e com predominância de gramíneas rasteiras.

As elevadas concentrações de metais pesados no horizonte superficial (0-20 cm) nos solos das áreas 1 e 2 são historicamente resultantes de intenso processamento de minério de ouro entre as décadas de 60, 70 e 80. Uma das hipóteses estabelecidas para a contaminação é que os minérios processados nos moinhos apresentavam elevados teores de metais pesados (ex: Galena, PbS), o que resultou na contaminação no entorno dos moinhos.

Os solos das áreas estudadas foram classificados como Neossolo Litólico (Embrapa, 2013). Todas as amostras de solo foram secas ao ar à temperatura ambiente, em seguida, tamisadas em malha de 2 mm e caracterizados química e fisicamente conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995) e os teores de metais pesados determinados pelo método EPA 3050b (USEPA, 1998).

As concentrações de metais solúveis em água foram determinadas de acordo com a metodologia descrita em Yoon et al. (2006) com adaptações. Um volume de 25 mL de água deionizada foi misturado a 2 g de solo e agitada durante 12 horas. A mistura foi então centrifugada durante 15 minutos a 3.500 rpm e o sobrenadante filtrado em papel filtro quantitativo.

As concentrações de metais biodisponíveis foram determinadas após adição de 30 mL de uma solução de CaCl_2 10 mM L^{-1} a amostras de solo em tubos de centrífuga de acordo com a metodologia descrita em Nascimento (2006), em seguida foram agitadas em mesa horizontal a 200 rotações por minuto (rpm), por 24 horas a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). Após a agitação os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi rapidamente filtrado (papel filtro qualitativo), para evitar a reabsorção do metal.

Os extratos obtidos foram analisados quanto a concentração dos elementos Cu, Zn, Cd, Cr, Ni, Pb, As e Ba por espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT).

3.1.2 Identificação de plantas espontâneas acumuladoras de metais pesados

Em outubro de 2012, nove amostras simples de solo foram coletadas em cada ponto pré-determinado para formar uma amostra composta no horizonte superficial (0-20 cm). Os pontos de coleta foram distribuídos em “malha quadrática”, totalizando 12 pontos (Figura 2).

Amostras de plantas foram coletadas em pontos identificados com maiores concentrações de metais e se basearam no número de plantas da mesma espécie e na ausência de sintomas de toxicidade das mesmas. Foram coletadas e identificadas três plantas de sete espécies vegetais em cada ponto, totalizando 36 amostras.

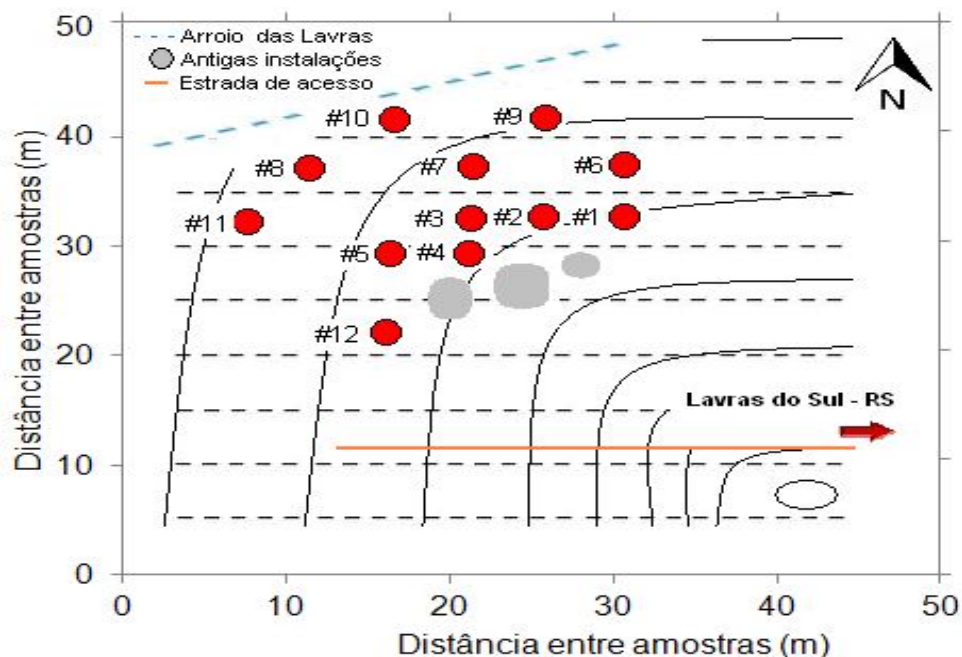


Figura 2. Esquema de distribuição dos pontos amostrados em área de beneficiamento de minério de ouro contaminada por metais pesados.

As espécies vegetais coletadas foram identificadas como: Samambaia (*Dicranopteris nervosa* (Kaulf.)); Gravatá (*Eryngium horridum* Malme); Maria-mole (*Senecio brasiliensis* Spreng. Less.); Catião (*Senecio leptolobus* DC.); Tiriricão (*Cyperus eragrostis* Lam.); Carqueja (*Baccharis trimera*) e Alfazema-brava (*Hyptis brevipes* Poit.).

As plantas foram separadas em fitomassa da parte aérea e fitomassa radicular. A parte aérea foi então lavada em água corrente e água destilada para remoção de partículas aderidas ao tecido, a fim de evitar possíveis contaminações e as raízes imersas em solução de HCl 0,1 M L⁻¹ para remoção dos íons metálicos aderidos à superfície, em seguida, foram lavadas com água destilada. As amostras da fitomassa foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 65 ± 3 °C, onde permaneceram durante 72 horas até apresentarem peso constante e então se efetuou a trituração das amostras em moinho tipo Wiley.

As concentrações de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Ni) e dos metais pesados (Cd, Cr, Pb, As e BA) foram determinadas após a digestão da fitomassa seca da parte aérea e radicular com solução ácida nitro-perclórica conforme metodologia descrita por

Tedesco et al. (1995). Os extratos foram analisados em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) de acordo com Sikora et al. (2005).

As amostras de solo rizosférico foram coletadas após leve agitação das raízes de cada espécie vegetal para a remoção do solo aderido. Foi também coletada uma amostra controle fora da zona radicular das plantas. As amostras foram imediatamente armazenadas em caixas de isopor refrigeradas com gelo.

3.1.3 Isolamento e caracterização de microrganismos

Utilizou-se a técnica de enriquecimento para o isolamento das bactérias resistentes ao chumbo utilizando-se meio de cultura Lúria-Bertani (LB) contendo triptona bacteriológica (10 g L^{-1}), extrato de levedura (5 g L^{-1}), NaCl (10 g L^{-1}) ao qual foi acrescentado 300 mg L^{-1} de chumbo, utilizando-se uma solução estoque preparada com cloreto de chumbo (PbCl_2) para uma concentração final de 1000 mg L^{-1} . Ambas as soluções foram autoclavadas separadamente a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ numa pressão de 1 atm por 20 minutos. O pH do meio nutriente contendo chumbo (LB-Pb²⁺) foi ajustado a 6,5 utilizando-se NaOH 1 N ou HCl 0,1 N estéreis.

As amostras de solo foram coletadas na rizosfera de plantas espontâneas que cresciam em área contaminada por metais pesados e amostras fora da zona radicular das plantas, pois segundo Berendsen et al. (2012), em geral, a diversidade microbiana é maior no solo rizosférico, sendo a rizosfera um dos ambientes mais complexos, com milhares de interações.

As amostras de solo não rizosférico e rizosférico foram utilizadas de forma independente para inocular (1%, m/v) o meio LB-Pb²⁺ estéril e incubados por 24 horas sob agitação orbital a 140 rotações por minuto (rpm) e temperatura controlada de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, 1 mL de cada cultura de enriquecimento foi transferido para 19 mL de meio LB-Pb²⁺ estéril e incubados por 24 horas, nas mesmas condições anteriores. O procedimento foi repetido para enriquecimento de uma terceira rodada.

As bactérias resistentes ao Pb²⁺ foram capazes de crescer em meio contaminado e posteriormente purificadas por estriamento em placas com meio nutriente LB-Pb²⁺ com ágar 1,5%. As placas foram incubadas em estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas até o aparecimento das colônias. As colônias foram caracterizadas

utilizando-se critérios morfológicos e armazenadas em glicerol (25%) a -5 °C. Foram caracterizados 25 isolados bacterianos relacionados a amostras de solo rizosférico de sete espécies vegetais e um solo não rizosférico de uma área contaminada por metais pesados, sendo o principal contaminante, o chumbo (Pb²⁺).

Os isolados foram identificados de acordo com a origem do solo, sendo SNR – solo não rizosférico; DN – solo da rizosfera de *Dicranopteris nervosa* (Samambaia); EH - solo da rizosfera de *Eryngium horridum* (Gravatá); SB – solo da rizosfera de *Senecio brasiliensis* (Maria-mole); SL - solo da rizosfera de *Senecio leptolobus* (Catião); CE - solo da rizosfera de *Cyperus eragrostis* (Tiriricão); BT - solo da rizosfera de *Baccharis trimera* (Carqueja) e HB – solo da rizosfera de *Hyptis brevipes* (Alfazema-brava).

Os inóculos com as bactérias resistentes foram preparados transferindo-se três alçadas de cultura de cada isolado para meio líquido em tubos de polietileno e incubados a 30 ± 2 °C por 24 horas em incubadora com agitação orbital a 140 rpm. A densidade óptica (DO₆₀₀) do inóculo de cada isolado foi medida utilizando-se espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC) a 600 nm. Posteriormente, tubos de polietileno (50 ml) com meio LB-Pb²⁺ foram inoculados com 100 µL de cada isolado resistente ao chumbo. A tolerância ao chumbo foi monitorada pela medição do crescimento celular microbiana através da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) do meio após a incubação em incubadora orbital a 140 rpm e temperatura de 30 ± 2 °C por 24 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 6 minutos à temperatura de 4 °C. Após a centrifugação dos tubos o sobrenadante das culturas foi diluído cinco vezes e então analisada a concentração de metais pesados em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT).

Laminas de todos os isolados bacterianos foram submetidas à técnica de coloração de Gram e observadas com microscópio em aumento de 400 e 1.000 vezes.

3.1.3.1 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram incubados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) por 24 horas em incubadora com rotação orbital a 140 rpm e

temperatura de 30 °C, para posterior extração do DNA cromossomal. O DNA foi extraído utilizando-se o Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), de acordo com o protocolo a seguir. A quantidade de cultura bacteriana utilizada foi 500 µL que passou por um processo de centrifugação por 2 minutos e o sobrenadante foi então descartado. As células foram ressuspendidas com 500 µL de solução de lise/RNase e incubadas por 10 minutos em banho-maria a 80 °C. Após, as células lisadas foram transferidas para mini-colunas, centrifugadas por 3 minutos e o conteúdo do tubo coletor descartado. Posteriormente, 650 µL da solução de lavagem foram adicionados à mini-coluna e centrifugados por 1 minuto, sendo repetido este procedimento por três vezes. Em seguida, 200 µL da solução reidratante de DNA foram adicionados à mini-coluna e incubados por 2 minutos a temperatura ambiente, e então centrifugados por 1 minuto. O DNA extraído foi retirado do tubo coletor e armazenado em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL a -5 °C.

Utilizou-se 20 µL do DNA extraído para verificar se a extração de DNA foi eficiente. A reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com Blue green loading dye, segundo as especificações do fabricante. A observação foi realizada sob luz ultravioleta em transluminador horizontal.

Os isolados foram identificados com base no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados para bactérias foram o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR. A mistura de reação de PCR consistiu em 12,5 µL de PCR Master mix (Promega, Madison, WI), 0,5 µL da amostra de DNA genômico, 2,5 µL (12,5 pmol) de oligonucleotídeo iniciador 27F, 2,5 µL (12,5 pmol) de oligonucleotídeo iniciador 1492R e completado ao volume final de 25 µL com água livre de nucleases.

A amplificação foi realizada em termociclador (TECHNE TC – 512) e o programa básico constou de 35 ciclos (desnaturação inicial 95 °C por 5 minutos; desnaturação subsequente, 95 °C por 30 segundos; anelamento, 50 °C por 1 minuto; extensão, 72 °C por um minuto e extensão final por 5 minutos). Unidades de filtros Millipore Montage PCR (Millipore, Billerica, MA) foram

utilizados para a remoção de oligonucleotídeos iniciadores, sais, e dNTPs incorporados de acordo com as instruções do fabricante.

Para o ciclo de seqüenciamento de DNA foi utilizado o BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) com os oligonucleotídeos 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). As reações foram lidas em sequenciador ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas as seqüências geradas foram analisadas com o uso do banco de dados Genbank do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI, USA).

3.1.3.2 Determinação da biorremoção de chumbo por rizobactérias

Os inóculos bacterianos foram preparados transferindo-se três alçadas da cultura de cada isolado para tubos de polietileno com meio LB-Pb²⁺ e incubados a 30 ± 2 °C por 24 horas. A densidade óptica (DO₆₀₀) do inóculo, diluído 10 vezes, para cada isolado, foi medida utilizando-se espectrofotômetro. Posteriormente, o meio LB-Pb²⁺ foi inoculado com 100 µL de cada isolado resistente ao chumbo. O crescimento bacteriano foi monitorado através da medição da densidade óptica (DO₆₀₀) do meio após a incubação sob temperatura de 30 ± 2 °C por 24 horas em agitador orbital a 140 rpm. Os meios contendo os inóculos foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 6 minutos sob temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante das culturas foi diluído cinco vezes e efetuada a leitura direta em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) e a determinação do crescimento microbiano pela DO₆₀₀. A biorremoção de chumbo foi calculada como a diferença entre o chumbo total adicionado ao meio e o chumbo restante no meio após incubação dos isolados (Pb Biorremoção = PbTotal adicionado - PbTotal após crescimento).

3.2 Fatores ambientais no crescimento e na biorremoção de Pb²⁺ por isolados resistentes

3.2.1 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre o crescimento e biorremoção de Pb²⁺ das bactérias resistentes *Kluyvera intermédia* (isolado SB4), Isolado SL1 e

Klebsiella oxytoca (isolado BT3) foi analisado em meio LB-Pb²⁺ inoculado com 100 µL de cada isolado resistente ao chumbo (diluído 10x) e, incubados a 20; 25; 30; 35 e 40 °C sob agitação orbital a 140 rpm por 24 horas. Os meios contendo os inóculos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 6 minutos sob temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante das culturas foi diluído cinco vezes e efetuada a leitura direta em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) e a determinação do crescimento microbiano pela DO₆₀₀. A biorremocção de chumbo foi calculada como a diferença entre o chumbo total adicionado ao meio e o chumbo restante no meio após incubação dos isolados (Pb Biorremocção = PbTotal adicionado - PbTotal após crescimento).

3.2.2 Efeito do pH inicial

O efeito do pH inicial sobre o crescimento e alteração do pH do meio foi examinado usando-se meio de cultura LB-Pb²⁺. Para visualizar o efeito do pH, o meio LB-Pb²⁺ esterilizado foi ajustado para pH 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5 e 7,0 com quantidades pré-determinadas de NaOH 1N ou HCl 0,1N esterilizadas. Os meios foram inoculados com 100 µL de cada isolado com diluição do inóculo de 10x (Isolado SB4 - *Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*) e incubados sob agitação orbital a 140 rpm por 24 horas. Os meios contendo os inóculos foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 6 minutos sob temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante das culturas foi diluído cinco vezes e efetuada a leitura direta em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) e a determinação do crescimento microbiano pela DO₆₀₀ e a leitura do pH final em pHmetro de bancada (Digimed – DM22).

3.2.3 Efeito da concentração inicial de Pb²⁺

O efeito das concentrações iniciais de Pb²⁺ foi determinado usando o meio LB-Pb²⁺ nas seguintes concentrações iniciais: 0; 200; 400; 600 e 900 mg L⁻¹. O meio LB-Pb²⁺ foi inoculado com 100 µL de cada isolado resistentes ao chumbo, *Kluyvera intermédia* (isolado SB4), Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (isolado BT3) (inóculo diluído 10x) e incubado a 30 ± 2 °C por 24 horas em agitador orbital a 140 rpm. Os meios contendo os inóculos foram centrifugadas

a 10.000 rpm durante 6 minutos sob temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante das culturas foi diluído cinco vezes e efetuada a leitura direta em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) e a determinação do crescimento celular microbiano pela DO_{600} . A biorremoção de chumbo foi calculada como a diferença entre o chumbo total adicionado ao meio e o chumbo restante no meio após incubação dos isolados ($Pb \text{ Biorremoção} = Pb_{\text{Total}} \text{ adicionado} - Pb_{\text{Total}} \text{ após crescimento}$).

3.3 Promotores de crescimento em isolados resistentes ao Pb^{+2}

3.3.1 Solubilização de fosfato de cálcio ($CaHPO_4$)

Os isolados SB4 (*Kluyvera intermédia*), SL1 (Inconclusivo) e BT3 (*Klebsiella oxytoca*) foram testados quanto à solubilização de fosfato de acordo com o método adaptado de Katznelson & Bose (1959). Utilizou-se o meio 1/10 trypticase soy agar (TSA) acrescido de $CaHPO_4$. O precipitado fino de $CaHPO_4$ resulta da reação de 50 mL da solução de K_2HPO_4 $0,57 \text{ M L}^{-1}$ e de 100 mL da solução de $CaCl_2$ $0,90 \text{ M L}^{-1}$ adicionados a 850 mL de 1/10 TSA. As soluções e o meio foram autoclavados separadamente. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 N, estéril. Foram transferidos quatro isolados por placa, com três repetições e incubados a 30 °C, por sete dias. As colônias que formaram halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfato.

3.3.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Os compostos indólicos (auxinas e ácido indol-3-acético) foram mensurados pelo método colorimétrico proposto por Gordon & Weber (1951). Para a quantificação dos compostos indólicos, as culturas bacterianas (Isolado SB4 - *Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 - Inconclusivo e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*) foram centrifugadas a 10.000 rpm por 6 minutos sob temperatura de 4 °C.

O método consistiu da mistura de 1 mL do sobrenadante, com 2 mL do reagente Fe-HClO₄ (1 ml $0,5 \text{ M L}^{-1}$ $FeCl_3$ em 50 ml HClO₄ 35%), e a presença do composto indólico foi indicada pela produção de coloração rosa. A intensidade de produção de compostos indólicos foi medida por colorimetria, após 25 minutos

de incubação em ambiente escuro, utilizando-se o espectrofotômetro Spectrumlab 22PC com o filtro de 530 nm.

3.3.3 Produção de sideróforos

As bactérias (Isolado SB4 - *Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*) foram caracterizadas quanto a produção de sideróforos com o método adaptado de Schwyn & Neilands (1987) utilizando-se um complexo corante-ferro altamente colorido, como descrito a seguir: 60,5 mg L⁻¹ de Cromo Azurol S (CAS); 72,9 mg L⁻¹ de Brometo de hexadeciltrimetil amônio (HDTMA); 30,24 g L⁻¹ de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES) e 1 mM de FeCl₃.6H₂O diluído em 10 mL de HCl 10 mM. Quando um ligante forte sequestra e complexa o ferro, o corante é liberado, causando mudança de cor.

As bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio Standard Sucinat Medium (SSM) a pH 7,0, cultivadas na ausência de ferro (Fe) e mantidas sob agitação a 140 rpm, 30 °C por 48 horas. Para a detecção da produção de sideróforos, 1.500 µL da cultura de bactérias foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida retirou-se 1.000 µL do sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionou-se 1.000 µL da solução de cromo azurol S (CAS). Os microrganismos que converteram a coloração azul para amarelo dentro de 15 minutos foram considerados produtores de sideróforos.

3.3.4 Imobilização de metais pesados em solos

O estudo foi conduzido em tubos de centrífuga de 50 ml contendo 10 g de duas amostras de solo contaminado, com três repetições. Os tubos contendo o solo foram autoclavados a 121 °C e aproximadamente 1 atm durante 45 minutos para eliminar o efeito dos microrganismos nativos na imobilização dos metais pelos isolados bacterianos. Os isolados (Isolado SB4 - *Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*) foram inoculados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) e incubados com agitação orbital a 140 rpm a 30 °C por 16 horas. As células em fase exponencial de crescimento foram coletadas através da centrifugação do meio a 10.000 rpm durante 6 minutos sob temperatura de 4 °C e resuspendidas duas vezes com solução salina (0,8%) autoclavada e recentrifugadas novamente. O inóculo bacteriano foi preparado após a ressuspensão do pellet de células em solução salina (0,8%), deionizada

e autoclavada, até atingir uma densidade de inóculo de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) g^{-1} de solo.

Os solos foram inoculados com 1 ml da suspensão bacteriana, sendo os tubos não inoculados considerados testemunhas. O solo foi umedecido a 80% da capacidade de campo e os tubos incubados a 30 ± 2 °C por 15 dias. A água perdida pela evaporação durante a incubação foi repostada com água deionizada autoclavada, após a pesagem dos tubos.

Após o período de incubação adicionou-se 30 mL de uma solução de $CaCl_2$ 10 mM L^{-1} aos tubos de centrífuga de acordo com metodologia descrita em Nascimento (2006). As amostras foram então agitadas em mesa horizontal a 200 rotações por minuto (rpm), por 24 horas a temperatura ambiente (25 ± 3 °C), em seguida, os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi rapidamente filtrado (papel filtro qualitativo), para evitar a reabsorção do metal e os extratos analisados quanto a concentração dos elementos Cu, Zn, Cd, Cr, Ni, Pb, As e Ba em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT).

3.4 Fitoextração de metais pesados por *Mucuna deeringiana*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em um delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial 2 x 4, sendo duas amostras de solo contaminado por metais pesados (S1 e S2), três isolados bacterianos (I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 – Isolado BT3 e I3 - *Klebsiella oxytoca*), e um tratamento controle (meio NA autoclavado sem inóculo).

As amostras de solo utilizadas foram coletadas na camada superficial (0-20 cm) de um Neossolo Litólico (Embrapa, 2013). Os resultados das análises químicas das amostras de solo se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Atributos químicos de amostras de um Neossolo oriundas de área de beneficiamento de minério de ouro contaminadas por metais pesados.

Amostra	pH ^a	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	SB ^b	CTC ^c	MOS ^d
	(1:2,5)	mg dm ⁻³	—————			cmol _c dm ⁻³	—————		%
S1	5,1	3,4	0,22	3,6	0,7	0,5	90,3	10,7	2,3
S2	5,3	7	0,14	8,3	1	0,2	62,3	12,9	3,4

Amostra	Zn	Cu	Mn	Cd	Ni	Cr	Pb	Ba	As
	mg kg ⁻¹								
S1	9,4	0,8	37	< 0,2	3	5	72	149	< 2
S2	170	9,5	30	2	9	15	227	164	7

^apH em água; ^bSB - soma de bases; ^cCTC - capacidade de troca de cátions a pH 7,0; ^dMOS - matéria orgânica do solo.

Com base nas recomendações para adubação e calagem do Rio Grande do Sul, foram aplicados fósforo e potássio nas amostras de solo, a fim de alcançar em ambos os solos teores próximos de 200 kg P₂O₅ ha⁻¹ (aplicado na forma de Super Fosfato Triplo), 150 kg K₂O ha⁻¹ (aplicado na forma de KCl) e corrigir o pH a 6,5 utilizando-se CaCO₃ e MgCO₃ (proporção 3:1). Não foi aplicado nitrogênio objetivando observar a nodulação nas raízes das plantas sob o efeito da contaminação por metais pesados. Os demais elementos foram considerados adequados para a cultura implantada e por isso não foram corrigidos.

Foram utilizados vasos plásticos com volume de 6,0 litros que foram preenchidos com 4,0 kg de solo. A umidade foi mantida próxima a 80% da capacidade de campo, através de pesagens periódicas e reposição com água destilada. Antes do plantio, os solos foram umedecidos durante 15 dias para restabelecimento da população microbiana nativa. Em seguida, foram semeadas cinco sementes de Mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) em cada vaso. Aos 10 dias após completa germinação, as plântulas foram desbastadas deixando-se duas plantas por vaso.

Foram utilizados três isolados bacterianos (*Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*) obtidos da rizosfera de plantas espontâneas que crescem em área contaminada por metais. As bactérias foram testadas quanto a resistência ao chumbo em meio de cultura (10 g L⁻¹ Triptona, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ NaCl e 300 mg L⁻¹ de chumbo utilizando PbCl₂). Os inóculos foram preparados transferindo-se três alçadas de cada bactéria para meio líquido Lúria-Bertani (LB) e incubados a 30 ± 2 °C por 24 horas em agitador orbital a 140 rpm.

O meio LB líquido com os inóculos crescidos foi centrifugado a 10.000 rpm, sob temperatura de 6 °C por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelet resuspendido com solução salina (0,8% de NaCl). Este procedimento foi repetido mais duas vezes. O pelet então foi resuspendido e ajustado para a

concentração de 10^8 UFC g^{-1} de solo com base na densidade óptica (DO; $\lambda 600$) em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC).

Os inóculos com as bactérias selecionadas foram homogeneizados e aplicados individualmente em cada solo. Os isolados bacterianos foram aplicados duas vezes, próximo ao caule da planta na projeção da parte aérea. A primeira aplicação foi aos 30 dias após o desbaste (volume de 50 ml de cada inóculo) e a segunda aplicação (volume de 50 ml de cada inóculo) aos 45 dias após o desbaste, em seguida os solos foram irrigados com água deionizada, objetivando facilitar a descida das células no perfil do solo até atingirem a zona radicular das plantas.

Aos 70 dias após a germinação das sementes, as plantas foram removidas do solo e separadas em fitomassa da parte aérea e fitomassa da raiz. A parte aérea foi então lavada em água corrente e água destilada para remoção de partículas aderidas ao tecido, a fim de evitar possíveis contaminações e as raízes imersas em solução de HCl $0,1 \text{ M L}^{-1}$ para remoção dos íons metálicos aderidos à superfície, em seguida, foram lavadas com água destilada. As amostras de fitomassa foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar a $65 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, onde permaneceram durante 72 horas até apresentarem peso constante e então se efetuou a trituração das amostras em moinho tipo Wiley.

As concentrações de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Ni) e dos metais pesados (Cd, Cr, Pb, As e BA) foram determinadas após a digestão da fitomassa seca da parte aérea e da raiz com solução ácida nitro-perclórica conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os extratos foram analisados em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) de acordo com Sikora et al. (2005).

3.5 Determinação do acúmulo de metais pesados em plantas medicinais

As amostras de solo utilizadas foram coletadas na camada superficial (0-20 cm), secas ao ar, tamisadas em malha de 4,0 mm e posteriormente caracterizadas química e fisicamente (Tedesco et al., 1995; USEPA, 1998). Os resultados da caracterização físico-química das amostras de solo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Atributos químicos e físicos das amostras de solo oriundas de área de beneficiamento de minério de ouro contaminadas por metais pesados.

Amostra	pH ^a	P	K ⁺	Ca+Mg	H+Al	SB ^b	CTC ^c	V ^d	MOS ^e	Argila
	água	mg dm ⁻³	————	cmol _c dm ⁻³	————	————	————	————	%	————
S3	6,0	30,0	0,2	7,7	2,8	7,9	10,7	74	2,7	14
S4	6,0	7,9	0,3	5,0	2,2	5,3	7,5	71	1,4	12
S5	5,8	16,0	1,0	18,8	4,4	19,8	24,2	82	5,8	24
Natural	5,2	8,2	1,2	10,6	5,5	11,8	17,3	68	4,4	27

Amostra	Zn	Cu	Mn	Cd	Ni	Cr	Pb	Ba	As
	mg kg ⁻¹								
S3	167	61	13	2	8	12	599	109	45
S4	42	4,7	4	0,4	5	9	46	84	< 2
S5	3,2	12	16	0,5	16	28	75	500	22
Natural	46	13	562	<0,2	56	142	6	98	<2

^apH solo: solução (1:2,5); ^bSB – soma de bases; ^cCTC a pH 7,0; ^dV - Saturação por bases; e ^eMOS – matéria orgânica do solo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS. Foi utilizado um esquema fatorial 4 x 3, consistindo de três amostras de solo contaminado (Neossolo litólico) mais uma amostra de solo de um Campo Natural sem intervenção antrópica (controle) e 3 espécies vegetais medicinais: Alcachofra (*Cynara scolymus*), Manjerição (*Ocimum basilicum*) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O experimento foi instalado em um delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições.

Os vasos com volume de 3,5 litros foram preenchidos com 3 kg de cada solo e a umidade mantida próxima a 70% da capacidade de campo, através de pesagens periódicas e reposição com água destilada. O plantio foi feito com mudas vigorosas, homogêneas e previamente cultivadas em areia lavada, com aproximadamente 15 dias.

Aos 35 dias após o transplante das mudas, as plantas foram colhidas e separadas a fitomassa da parte aérea e a fitomassa das raízes. As amostras da fitomassa da parte aérea foram lavadas com água corrente de torneira e logo após com água destilada para remoção de partículas aderidas ao tecido, a fim de evitar possíveis contaminações. As raízes foram mergulhadas em solução de HCl 0,1 M L⁻¹ para retirada de possíveis íons metálicos aderidos a superfície e lavadas com água destilada. As amostras de fitomassa foram colocadas em

estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, onde permaneceram por 72 horas, até atingirem peso constante e, em seguida, trituradas em moinho tipo Wiley.

As concentrações de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Ni) e dos metais pesados (Cd, Cr, Pb, As e BA) foram determinadas após a digestão da fitomassa seca da parte aérea e da raiz com solução ácida nitro-perclórica conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os extratos foram analisados em espectrômetro de emissão óptica por plasma induzido (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Perkin - Elmer Corporation, Norwalk, CT) de acordo com Sikora et al. (2005).

3.6 Eficiência fitoextratora

O fator de bioconcentração indica a eficiência da biota em acumular os metais presentes no meio (meio aquoso) nos tecidos (Mackay, 1982; Nowell et al., 1999), contudo, muitos autores (Yoon et al., 2006; Ladislas et al., 2012; Ali et al., 2013; Testiati et al., 2013) calcularam o fator de bioconcentração (FBC) através da relação entre a concentração de um determinado metal na raiz e a concentração do mesmo no solo em contato com as raízes.

A eficiência da fitoextração das espécies vegetais foi quantificada calculando-se o fator de bioconcentração (FBC) e o fator de translocação (FT), como descrito a seguir:

$$\text{Fator de bioconcentração (FBC)} = [\text{metal}]_{\text{raiz}} / [\text{metal}]_{\text{solo}}$$

onde $[\text{metal}]_{\text{raiz}}$ é a concentração do metal alvo no tecido da raiz da planta coletada e $[\text{metal}]_{\text{solo}}$ é a concentração do mesmo metal no solo.

$$\text{Fator de translocação (FT)} = [\text{metal}]_{\text{parte aérea}} / [\text{metal}]_{\text{raiz}}$$

onde $[\text{metal}]_{\text{parte aérea}}$ é a concentração do metal na parte aérea da planta e $[\text{metal}]_{\text{raiz}}$ é a concentração do metal nas raízes da planta (Yoon et al., 2006; Ali et al., 2013).

3.7 Análises de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, ao teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$; $p < 0,05$), utilizando-se o programa SISVAR na análise dos dados (Ferreira, 2011). Os coeficientes de correlação (r) foram utilizados para expressar as associações de variáveis quantitativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioprospecção de plantas e de microrganismos resistentes a metais pesados

4.1.1 Atributos químicos do solo e identificação de plantas espontâneas acumuladoras de metais pesados

O pH do solo (razão solo:água de 1:2,5) nas amostras coletadas na Área 1 descritas na Figura 2, variou entre 5,7 e 6,4 (Tabela 5).

Tabela 5. Atributos químicos de amostras de solo oriundas da Área 1 contaminada por metais pesados em Lavras do Sul, Rio Grande do Sul.

Ponto	pH	mg kg ⁻¹							
		Zn	Zn solúvel em água	Cd	Cd solúvel em água	Pb	Pb solúvel em água	As	As solúvel em água
1	6,0	<u>499</u>	8,6	2,0	0,05	<u>631</u>	6,2	<u>48</u>	1,0
2	5,8	342	4,2	2,0	0,08	<u>549</u>	6,1	<u>47</u>	1,0
3	6,1	<u>553</u>	8,0	2,0	0,04	<u>898</u>	5,6	<u>50</u>	0,6
4	6,2	<u>502</u>	10,7	2,0	0,04	<u>947</u>	10,5	<u>38</u>	0,8
5	6,3	271	4,2	2,0	0,03	<u>523</u>	7,1	<u>54</u>	1,1
6	5,7	68	1,8	0,3	0,01	56	1,2	4	0,2
7	6,0	120	2,9	0,3	0,01	113	0,9	2	0,01
8	6,0	49	1,0	0,2	0,00	30	0,9	2	0,1
9	6,4	135	2,8	0,7	0,02	<u>247</u>	3,7	25	0,6
10	5,9	62	1,2	1,0	0,01	117	0,9	<u>65</u>	0,7
11	5,9	35	1,9	0,2	0,00	13	0,3	2	0,01
12	6,0	122	1,4	0,4	0,00	108	1,6	8	0,2

*Valores sublinhados estão acima do valor limite para intervenção agrícola pela CETESB.

De acordo com Kabata-Pendias (2004), o comportamento dos metais é diretamente afetado pelas condições do solo. A biodisponibilidade pode ser elevada ou moderada de acordo com a condição do solo, incluindo pH e aeração do solo. Em solos ácidos bem aerados (pH < 3 e oxidantes), muitos metais, como Cd, Co, Ni, Cu e Zn, ficam altamente móveis e disponíveis as plantas, enquanto nos solos neutros ou alcalinos pouco aerados (redutores), os metais ficam substancialmente menos disponíveis. Além disso, outros metais ficam um pouco menos disponíveis para as plantas de acordo com as condições do solo descritas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

As concentrações de zinco (Zn) variaram nas amostras de solo entre 35 mg kg⁻¹ no ponto 11 a 553 mg kg⁻¹ no ponto 3. As concentrações de Zn

aceitáveis para a qualidade do solo estabelecida pela Companhia de Meio Ambiente e Tecnologia do Estado de São Paulo (CETESB, 2005) são de 60 mg kg^{-1} para valor de referência, 300 mg kg^{-1} para valor de prevenção e 450 mg kg^{-1} para valor de intervenção agrícola. De acordo com a Lista Holandesa de valores para a qualidade do solo (CETESB, 1999) as concentrações de Zn são de 140 mg kg^{-1} para valor de referência e 430 mg kg^{-1} para valor de alerta. Portanto, os teores de Zn apenas nos pontos 8 e 11 estão abaixo do valor de referência, nos pontos de 1 a 5 estão acima dos limites de prevenção e nos pontos 1, 3 e 4 estão acima do limite para intervenção agrícola segundo as normas estabelecidas pela CETESB.

As amostras apresentaram concentrações do elemento cádmio (Cd) variando entre $< 0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (limite de detecção do método) nos pontos 8 e 11 a 2 mg kg^{-1} nos pontos de 1 a 5. As concentrações de Cd aceitáveis na legislação para valores de qualidade do solo estabelecidos pela CETESB são $< 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ valor de referência, $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ valor de prevenção e 3 mg kg^{-1} para intervenção da atividade agrícola. Portanto, os pontos 6, 7, 8, 11 e 12 apresentam concentrações de Cd classificados como seguros, sem riscos para a saúde humana. No entanto, os pontos 1 a 5 apresentam concentrações elevadas, sendo classificadas como valores de prevenção e intervenção agrícola (Tabela 5).

Para o chumbo (Pb) as concentrações variaram entre 13 a 947 mg kg^{-1} , nos pontos 11 e 4, respectivamente. A concentração de Pb considerável de referência para solos é de 17 mg kg^{-1} (CETESB, 1999). Entretanto, os pontos 1 a 5 apresentaram concentrações muito elevadas de Pb, sendo mais elevadas que a concentração estimada para intervenção residencial.

Os teores do elemento arsênio (As) variaram entre 38 a 65 mg kg^{-1} (Tabela 5). A lista de valores de orientação para as substâncias tóxicas no solo (CETESB, 2005), considera a concentração de 35 a 55 mg kg^{-1} os limites inferior e superior para a intervenção agrícola, portanto nos pontos 1; 2; 3; 4; 5 e 10 estas regras se aplicam .

4.1.2 Concentrações de Cu, Zn, Cd, Ni, As, Pb e Ba na parte aérea e raiz

As concentrações de Cu variaram entre 16,31 a 93,36 mg kg⁻¹ nas raízes das plantas coletadas, com o máximo acúmulo nas plantas de Carqueja. As concentrações de Cu variaram entre 8,84 a 21,12 mg kg⁻¹ na parte aérea, sendo o acúmulo máximo nas plantas de Alfazema-brava (Tabela 6).

As concentrações de Zn variaram entre 188,4 a 1.311,1 mg kg⁻¹ nas raízes, sendo a concentração máxima observada nas plantas de Alfazema-brava (Tabela 6). Além disso, foi observado nas plantas de Alfazema-brava o máximo acúmulo de Zn na parte aérea (514,3 mg kg⁻¹). Contudo, as raízes de Gravatá, também continham elevadas quantidades de Zn (924 mg kg⁻¹). Para o elemento Cd, as concentração variaram entre 0,54 a 7,1 mg kg⁻¹ nas raízes das plantas, sendo o máximo acúmulo observado na espécie Alfazema-brava. Entretanto, observou-se na Tabela 6, que a concentração máxima de Cd na parte aérea, ocorreu nas plantas de Carqueja (2,1 mg kg⁻¹). As concentrações de Ni variaram entre 2,85 (Carqueja) e 10,8 mg kg⁻¹ (Tiriricão) nas raízes e entre 1,56 (Carqueja) a 2,76 mg kg⁻¹ (Maria-mole) na parte aérea. De acordo com Alloway et al. (1990) e Yoon et al. (2006) a acumulação de metais pesados em plantas varia de acordo com a espécie vegetal. A absorção de metais pesados a partir do solo ocorre de forma passiva através do fluxo de massa de água pelas raízes, ou por meio de transporte ativo, atravessando a membrana plasmática de células epidérmicas das raízes (Yoon et al., 2006).

Tabela 6. Concentrações de elementos (mg kg⁻¹, peso seco) em amostras de solo rizosférico e plantas espontâneas coletadas em área contaminada por metais pesados no entorno do município de Lavras do Sul, Rio Grande do Sul.

	<i>Samambaia</i>	<i>Gravatá</i>	<i>Maria mole</i>	<i>Catião</i>	<i>Tiriricão</i>	<i>Carqueja</i>	<i>Alfazema</i>
	Cobre(Cu) mg kg ⁻¹						
SR ^a	49,1	19,3	21,3	10,5	38,7	14,3	40,0
PA ^b	8,84	17,2	10,4	14,7	13,7	13,2	21,1

Raiz	56,6	26,9	16,3	26,8	21,5	93,4	35,7
Zinco (Zn) mg kg ⁻¹							
SR	278,6	105,1	162,0	86,2	294,0	86,9	590,9
PA	56,4	116,8	311,8	217,0	83,5	276,8	514,3
Raiz	232,8	924,0	373,2	310,6	192,0	188,4	1311,1
Cádmio (Cd) mg kg ⁻¹							
SR	1,4	0,38	0,63	0,32	1,1	0,33	2,0
PA	0,29	0,24	1,17	1,56	1,13	2,14	0,71
Raiz	0,56	1,12	0,54	3,04	0,88	1,55	7,07
Níquel (Ni) mg kg ⁻¹							
SR	7,5	3,6	4,7	6,3	7,2	3,6	8,2
PA	1,91	2,03	2,76	2,59	1,56	1,56	2,30
Raiz	3,23	4,02	4,22	3,90	10,83	2,85	4,96
Chumbo (Pb) mg kg ⁻¹							
SR	232,5	96,9	62,7	19,1	115,8	64,8	126,1
PA	101,3	188,2	72,3	83,1	73,8	98,3	67,8
Raiz	91,2	72,0	93,8	66,7	29,1	22,5	66,5
Arsênio (As) mg kg ⁻¹							
SR	35,6	7,30	12,5	2,0	15,0	4,1	12,9
PA	1,17	0,62	0,06	0,27	0,32	0,21	1,21
Raiz	0,85	0,92	0,09	nd ^c	0,52	0,46	0,11
Bário (Ba) mg kg ⁻¹							
SR	170,3	86,8	99,8	123,1	134,4	85,8	139,8
PA	0,19	0,05	0,41	0,57	0,06	0,21	0,62
Raiz	0,93	0,07	1,30	0,78	0,95	1,33	1,98

^aSolo rizosférico; ^bParte aérea; e ^cValores abaixo do limite de detecção do aparelho.

As concentrações de Pb variaram entre 22,5 e 93,8 mg kg⁻¹ nas raízes, com o maior acúmulo nas plantas de Maria-mole (Tabela 6). Nas raízes de Samambaia e Gravatá também se observaram quantidades elevadas do elemento chumbo (91,2 e 72,0 mg kg⁻¹, respectivamente). Para o elemento Pb foram observadas concentrações variando entre 67,8 a 188,2 mg kg⁻¹ na parte aérea das plantas, sendo a maior concentração observada nas plantas de Gravatá (Tabela 6). Semelhantemente, na parte aérea de Samambaia e Carqueja também continham quantidades elevadas de Pb (101,3 e 98,3 mg kg⁻¹, respectivamente).

Resultados diferentes foram encontrados por Bech et al. (2012) avaliando espécies espontâneas em depósitos de minas no Peru. Segundo esses autores as espécies de *Senecio* sp. foram capazes de acumular mais de 4.000 mg kg⁻¹ de Pb em suas folhas em uma área contaminada e 146 mg kg⁻¹

de Pb em uma área de referência e nas raízes as concentrações foram de 381 (área de referência) e 451 mg kg⁻¹ (área contaminada). Contudo, muitos fatores podem estar envolvidos nas diferenças entre esses resultados, como o grande número de espécies e sub-espécies dentro do gênero dessas plantas, a concentração total de Pb nas áreas, que variou de 124 (referência), a 13.105 mg kg⁻¹ (contaminada), sendo essas concentrações mais elevadas quando comparadas as concentrações encontradas nas áreas estudadas (Tabela 5); além das características químicas do solo, por exemplo, pH, CTC, capacidade de adsorção, clima, dentre outros fatores (Keller, 2006).

As concentrações de As variaram entre valores abaixo do limite de detecção do método a 1,21 mg kg⁻¹, sendo a concentração máxima de As na parte aérea encontrada nas plantas de Alfazema-brava. As concentrações do elemento Ba variaram entre 0,07 a 1,98 mg kg⁻¹ nas raízes variou e entre 0,05 a 0,62 mg kg⁻¹ na parte aérea das plantas de Gravatá e Alfazema-brava, respectivamente.

A ordem decrescente na acumulação de metais pesados nas espécies espontâneas (mg kg⁻¹ de massa seca) foi Zn > Pb > Cu > Ni > Ba > As > Cd nas raízes de Samambaia e de Pb > Zn > Cu > Ni > As > Cd > Ba na parte aérea de Samambaia e Gravatá. Nas raízes de Gravatá foi de Zn > Pb > Cu > Ni > Cd > As > Ba. Nas raízes de Maria-mole foi de Zn > Pb > Cu > Ni > Ba > Cd > As e na parte aérea foi Zn > Pb > Cu > Ni > Cd > Ba > As (Tabela 6).

Nas raízes e parte aérea de Catião foi Zn > Pb > Cu > Ni > Cd > Ba > As. Nas raízes de Tiriricão foi Zn > Pb > Cu > Ni > Ba > Cd > As e na parte aérea foi de Zn > Pb > Cu > Ni > Cd > As > Ba. Nas raízes de Carqueja foi de Zn > Cu > Pb > Ni > Cd > Ba > As e na parte aérea foi de Zn > Pb > Cu > Cd > Ni > Ba > As e nas raízes de Alfazema-brava foi de Zn > Pb > Cu > Cd > Ni > Ba > As e na parte aérea foi de Zn > Pb > Cu > Ni > As > Cd > Ba (Tabela 6).

Observou-se que os elementos Zn, Cu, Ni e Pb foram os mais acumulados na MSPA e MSR de todas as espécies estudadas, exceto a Alfazema-brava, modificando por algumas vezes a ordem de acumulação entre eles, contudo permanecendo como mais absorvidos. Entretanto, os elementos Cd, As e Ba apresentaram comportamentos semelhantes, estando em concentrações menores tanto da MSPA quanto da MSR em todas as espécies, exceto a Alfazema-brava. De acordo com Mengel & Kirkby (2001) e Pandey

(2012) o Zn inibe a absorção de Cd, devido ao seu comportamento competitivo com o Cd, pois ambos os metais são transportados por um transportador em comum na membrana plasmática da raiz, que tem mais afinidade com o Zn quando comparado ao Cd (Hart et al., 2005), o que poderia explicar as baixas concentrações de Cd no tecido das plantas.

A absorção de As pelas plantas pode ser reduzida, pois apesar do arsênio e o fósforo serem análogos químicos, ou seja, são absorvidos pelo mesmo sistema de transportadores (Meharg & Macnair, 1992), este sistema possui maior afinidade pelo P que pelo As. No entanto, sabe-se que a tendência no acúmulo de metais depende de alguns fatores como, a idade e o tipo de espécies vegetais, as concentrações de metais, o pH do solo e a época de amostragem (Maiti & Jaiswal, 2008; Pandey, 2012).

4.1.3 Fatores de bioconcentração (FBC) e translocação (FT)

A fitoremediação é definida como a utilização de plantas para remover poluentes do meio ambiente ou de torná-los inofensivos (Raskin et al., 1997). De acordo com os critérios de concentração para diferentes metais, descritos por Van der Ent et al. (2013), nenhuma das espécies vegetais estudadas nesse trabalho apresentaram concentrações de metal pesado para ser considerada uma hiperacumuladora. Contudo, espécies vegetais com ambos os fatores, ou seja, o fator de bioconcentração (FBC) e o fator de translocação (FT) maior do que um (> 1), apresentam potencial para serem utilizadas na fitoextração de metais pesados (Fitz & Wenzel, 2002; Yoon et al., 2006).

Para o elemento Cu, observou-se que as plantas de Carqueja obtiveram o maior FBC (Tabela 7), embora o FT tenha sido menor que um. Contudo, o FT para as plantas de Maria-mole foi o mais alto para o Cu, porém a concentração de Cu no tecido vegetal foi $< 300 \text{ mg kg}^{-1}$, não sendo considerada uma hiperacumuladora de Cu. Para o elemento Zn observou-se o mesmo comportamento. Todavia, as plantas de Catião e Carqueja apresentaram ambos os fatores, FBC e FT maiores que um, embora a concentração de Zn no solo rizosférico tenha sido menor, o que pode explicar os elevados valores (Tabela 7).

Tabela 7. Fatores de translocação (FT) e de bioconcentração (FBC) de metais pesados em plantas coletadas em área contaminada por metais pesados.

Nome científico	Fator de bioconcentração (FBC) ^a						
	Cu	Zn	Cd	Ni	Pb	As	Ba
Samambaia	1,15	0,84	0,39	0,43	0,39	0,02	0,84
Gravatá	1,40	8,79	2,91	1,11	0,74	0,13	12,69
Maria-mole	0,77	2,30	0,86	0,90	1,49	0,01	0,60
Catião	2,54	3,60	9,64	0,62	3,49	0,00	1,19
Tiriricão	0,56	0,65	0,82	1,51	0,25	0,03	0,37
Carqueja	6,55	2,17	4,63	0,79	0,35	0,11	1,45
Alfazema-brava	0,89	2,22	3,58	0,60	0,53	0,01	0,78
	Fator de translocação (FT) ^b						
Samambaia	0,39	0,25	0,58	0,59	2,61	1,54	0,88
Gravatá	0,63	0,13	0,22	0,51	2,91	0,80	0,10
Maria-mole	1,05	0,85	2,93	0,77	1,13	0,11	1,72
Catião	0,55	1,03	0,68	0,68	1,22	0,00	0,58
Tiriricão	0,62	0,44	1,74	0,32	3,54	0,48	0,57
Carqueja	0,17	1,46	1,30	0,55	5,48	0,34	0,42
Alfazema-brava	0,63	0,40	0,17	0,48	0,98	1,52	1,48

^aFBC = relação entre a concentração de metal nas raízes e o solo rizosférico;

^bFT = relação entre a concentração do metal na parte aérea e nas raízes. Valores > 1 estão em negrito.

A concentração de Cd no solo rizosférico foi considerada baixa e as plantas não foram identificadas como hiperacumuladoras (Tabela 7), apesar de todas as espécies, exceto a Samambaia e Tiriricão apresentarem FBC e FT maior do que um, sendo consideradas fitoextratoras de Cd. Para o elemento níquel (Ni) foi observado apenas para o Gravatá um FBC maior que um (Tabela 7).

As plantas de Catião e Maria-mole apresentaram ambos os fatores, FBC e FT maior que um para o Pb, sendo consideradas fitoextratoras de chumbo. A maioria das espécies vegetais estudadas apresentaram o FT maior que um para Pb, exceto a espécie Alfazema-brava. Dentre os fatores estudados não foram observados em nenhuma das espécies estudadas, o FBC superior a um para o elemento As, porém apenas duas espécies Samambaia e Alfazema-brava apresentaram o FT maior que um. Na espécie Gravatá foram observados FBC maior que um (12,69) para o elemento Ba, embora o FT tenha sido menor que um. As espécies Catião e Carqueja apresentaram FBC maior que um e as espécies Maria-mole e Alfazema-brava o FT maior que um (Tabela 7).

De acordo com Yoon et al. (2006), espécies tolerantes a metais pesados, com alta FBC e baixa FT podem ser utilizadas na fitoestabilização de áreas contaminadas, juntamente com outras coberturas vegetais. A fitoestabilização utiliza plantas para minimizar a mobilidade e biodisponibilidade dos poluentes no ambiente, ou imobilizando-os, ou impedindo a sua migração (Smith & Bradshaw, 1972; Vangronsveld et al., 1995).

As espécies Samambaia; Gravatá; Catião e Carqueja podem ser consideradas potenciais candidatas para o uso na fitoestabilização de Cu em áreas contaminadas. Em áreas contaminadas com Zn, as espécies Maria-mole e Alfazema-brava poderiam ser utilizadas, enquanto para o Cd as espécies Catião e Alfazema-brava e para o elemento Ba as espécies Catião e Carqueja (Tabela 7). Contudo, a espécie Gravatá mostrou as mesmas características para os metais Zn, Cd, Ni e Ba, podendo ser considerada uma planta tolerante a multi-metals, sendo considerada uma boa candidata a fitoestabilização, impedindo a transferência do metal para a cadeia alimentar.

4.1.4 Isolamento e caracterização de microrganismos rizosféricos resistentes ao chumbo

Dentre os isolados da amostra de solo não rizosférico (SNR), os isolados SNR1 e SNR4 foram identificados como *Citrobacter murlinae* e *Enterobacter* sp., respectivamente, enquanto a identificação dos isolados SNR2 e SNR3 foi inconclusiva. No solo rizosférico da Samambaia foram isoladas quatro bactérias resistentes a chumbo, dessas foram identificadas apenas os isolados DN2 (*Bacillus thuringiensis*) e DN3 (*Klebsiella oxytoca*), enquanto a identificação dos isolados DN1 e DN4 foi inconclusiva (Tabela 8).

Tabela 8. Identificação dos isolados obtidos na rizosfera de espécies vegetais coletadas em Neossolo Litólico contaminado por metais pesados baseado no sequenciamento do rRNA da região 16S.

Isolado	Espécie vegetal	Código de acesso	Nome científico
DN1	<i>D. nervosa</i>		Inconclusivo
DN2	<i>D. nervosa</i>	NR102506.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DN3	<i>D. nervosa</i>	NR041749.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
DN4	<i>D. nervosa</i>		Inconclusivo
EH1	<i>E. horridum</i>		Inconclusivo
EH2	<i>E. horridum</i>		Inconclusivo

EH3	<i>E.horridum</i>		Inconclusivo
EH4	<i>E.horridum</i>	NR103936.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SB1	<i>S. brasiliensis</i>		Inconclusivo
SB2	<i>S.brasiliensis</i>	NR102825.1	<i>Pectobacterium carotavorum</i>
SB3	<i>S.brasiliensis</i>	NR102509.1	<i>Serratia marcescens</i>
SB4	<i>S.brasiliensis</i>	NR028802.1	<i>Kluyvera intermédia</i>
SL1	<i>S. leptolobus</i>		Inconclusivo
SL2	<i>S. leptolobus</i>	NR028803.1	<i>Kluyvera intermédia</i>
CE1	<i>C. eragrostis</i>		Inconclusivo
CE2	<i>C. eragrostis</i>		Inconclusivo
BT1	<i>B. trimera</i>		Inconclusivo
BT2	<i>B.trimera</i>		Inconclusivo
BT3	<i>B.trimera</i>	NR102982.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
HB1	<i>H. brevipes</i>	NR102789.1	<i>Aeromonas veronii</i>
HB2	<i>H.brevipes</i>		Inconclusivo
SNR1	-	NR028688.1	<i>Citrobacter murlinae</i>
SNR2	-		Inconclusivo
SNR3	-		Inconclusivo
SNR4	-	NR074777.1	<i>Enterobacter</i> sp.

A identificação dos isolados EH1; EH2 e EH3 do solo rizosférico da espécie vegetal Gravatá foi inconclusiva, contudo o isolado EH4 foi identificado como *Klebsiella pneumoniae*. Enquanto no solo rizosférico oriundo da Maria-mole dos quatro isolados bacterianos isolados três foram identificados como *Pectobacterium carotavorum*, *Serratia marcescens* e *Kluyvera intermédia* (SB2; SB3 e SB4, respectivamente) e a identificação do isolado SB1 foi inconclusiva. Dos isolados oriundos da rizosfera de Catião a identificação do isolado SL1 foi inconclusiva e o isolado SL2 foi identificado (*Kluyvera intermédia*) (Tabela 8).

A identificação dos isolados oriundos da rizosfera de Tiriricão foi inconclusiva. Contudo, das isoladas da espécie Carqueja a BT2 foi identificada como *Klebsiella oxytoca* e as demais foram inconclusivas. Na espécie vegetal Alfazema-brava foram isoladas duas bactérias resistentes ao chumbo, sendo a primeira identificada como *Aeromonas veronii* (HB1) e a segunda foi inconclusiva (Tabela 8).

O crescimento bacteriano em meio contendo chumbo na concentração de 300 mg L⁻¹, foi expressa em densidade óptica, após leitura em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC) a 600 nm. O máximo crescimento celular observado nas bactérias isoladas no solo não rizosférico (SNR) foi de 1,44

(DO₆₀₀) no isolado SNR1, o que pode se caracterizar como maior adaptação ao meio contaminado (Tabela 9).

Tabela 9. Crescimento e biorremoção por isolados bacterianos em meio líquido contendo elevada concentração de chumbo (Pb²⁺).

Código	Inóculo	Crescimento	Pb ²⁺	Biorremoção
isolado	inicial	final	biorremovido	específica
	DO ₆₀₀	DO ₆₀₀	mg L ⁻¹	mg Pb ²⁺ L ⁻¹ DO ₆₀₀ ⁻¹
SNR1	0,24	1,44 b*	87,10 c	60,69 e
SNR2	0,07	0,35 f	76,40 d	221,3 b
SNR3	0,20	1,35 b	91,40 c	67,60 e
SNR4	0,18	1,39 b	110,0 b	79,30 e
DN1	0,21	1,04 d	77,50 d	74,80 e
DN2	0,20	0,96 d	92,90 c	96,90 d
DN3	0,18	1,00 d	66,20 d	65,90 e
DN4	0,18	1,07 d	100,8 b	94,40 d
EH1	0,07	0,30 f	72,50 d	241,0 a
EH2	0,22	1,71 a	86,20 c	51,10 e
EH3	0,21	0,80 e	100,3 b	125,6 c
EH4	0,31	1,29 b	79,10 d	61,30 e
SB1	0,17	1,24 c	76,40 d	61,10 e
SB2	0,28	1,26 b	79,80 d	63,20 e
SB3	0,16	1,32 b	77,30 d	58,60 e
SB4	0,21	1,37 b	148,0 a	107,8 d
SL1	0,17	1,22 c	106,8 b	87,80 d
SL2	0,16	1,08 d	113,5 b	104,9 d
CE1	0,19	1,26 b	72,70 d	58,10 e
CE2	0,22	1,55 a	78,20 d	50,70 e
BT1	0,15	1,12 d	64,20 d	57,40 e
BT2	0,08	0,30 f	66,00 d	224,2 b
BT3	0,18	1,30 b	79,80 d	61,70 e
HB1	0,26	1,59 a	73,30 d	46,20 e
HB2	0,22	1,35 b	90,60 c	67,50 e

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,01).

Na Tabela 9 observou-se que o máximo crescimento celular foi observado no isolado DN4 com 1,07 unidades de DO₆₀₀ oriunda do solo rizosférico da Samambaia, na rizosfera da espécie Gravatá a máximo crescimento celular foi de 1,71 unidades de DO₆₀₀ no isolado EH2. A maior densidade de células entre as bactérias isoladas no solo rizosférico da espécie Maria-mole, foi de 1,37 (DO₆₀₀) no isolado SB4, enquanto na espécie Catião o máximo crescimento celular foi observado no isolado SL1 (1,22 unidades de

DO₆₀₀). Nas bactérias isoladas no solo rizosférico da espécie Tiriricão, o máximo crescimento celular foi no isolado CE2 com 1,55 (DO₆₀₀) e na espécie Carqueja foi de 1,30 no isolado BT3 e 1,59 no isolado HB1 oriundo do solo rizosférico da Alfazema-brava. Todos os isolados foram considerados tolerantes a presença de chumbo em elevada concentração no meio.

As bactérias isoladas do solo rizosférico de espécies espontâneas foram capazes de remover mais de 20% do íon metálico (Pb²⁺) do meio líquido. Dentre estas se destacou, o isolado SB4, que foi capaz de biorremover 148 mg Pb L⁻¹, aproximadamente 50% do total. Nas amostras não rizosféricas, o isolado SNR1 se destacou dos demais, biorremovendo aproximadamente 33% do chumbo presente no meio. Resultados semelhantes foram observados por Kumar et al. (2011) com a biorremoção de 186 mg Pb L⁻¹ por bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. Ainda de acordo com esses autores, as paredes das bactérias gram-negativas são eficientes quelantes de metais e em bactérias gram-positivas, o grupo carboxílico do ácido glutâmico do peptidoglicano é o principal local de deposição dos metais.

4.2 Fatores ambientais no crescimento e na biorremoção de Pb⁺² por isolados resistentes

4.2.1 Efeito da temperatura

Entre as bactérias estudadas (Isolado SB4 - *Kluyvera intermédia*; Isolado SL1 - Inconclusivo e Isolado BT3 - *Klebsiella oxytoca*), não foi observada diferença significativa no crescimento celular na incubação sob temperatura de 20 °C, porém quando a temperatura de incubação foi de 25 °C o isolado BT3 produziu a maior densidade de células com 1,34 unidades de DO₆₀₀, seguido do isolado SB4 com 1,15 e com a menor densidade o isolado SL1 (0,99). Sob incubação a 30 °C, o maior crescimento foi observado nos isolados SB4 e BT3, seguidos do isolado SL1, porém, com o aumento de cinco unidades de temperatura, o maior crescimento foi observado no isolado BT3, seguido dos isolados SB4 e SL1, que não diferiram entre si (Figura 3).

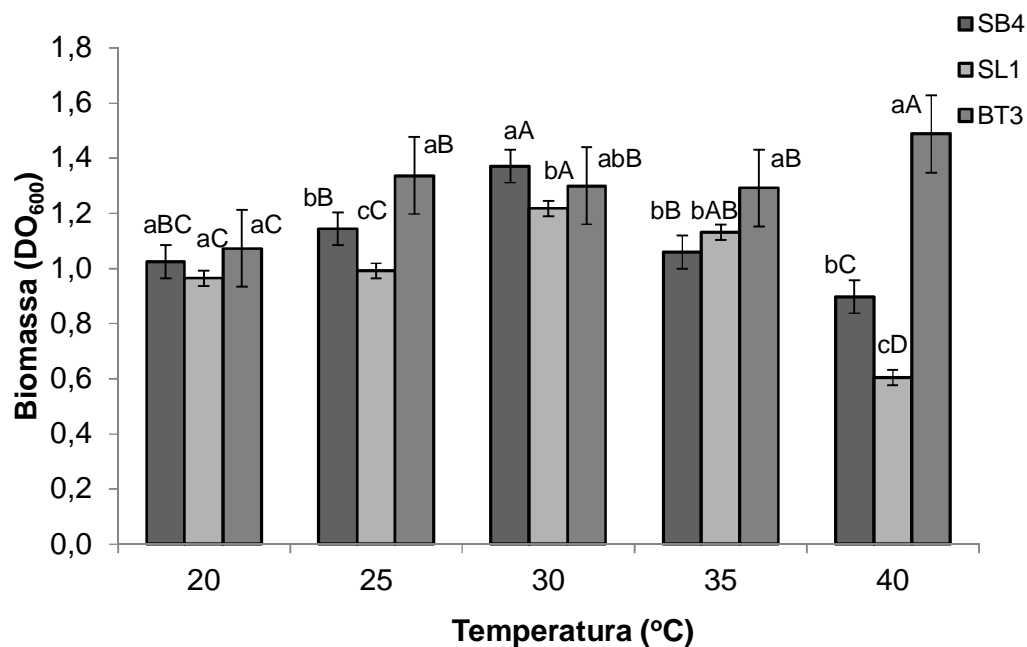


Figura 3. Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes temperaturas em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo, quantificadas pelo crescimento celular (DO₆₀₀). *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada temperatura e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre temperaturas dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média.

Indicando que os isolados são distintos entre si em relação à resistência à baixa temperatura de incubação. Considerando que as temperaturas médias do solo descoberto na camada de 0-5 cm variam entre 16 °C a 20,8 °C no final do mês de setembro durante décadas em quase a totalidade do Estado do Rio Grande do Sul (Maluf et al., 1999), observou-se que todos os isolados manteriam suas atividades.

Os isolados SB4 e SL1 incubados a 40 °C apresentaram o menor crescimento entre as temperaturas avaliadas, sendo de 0,90 e 0,60 unidades de DO₆₀₀, respectivamente, indicando que todos são microrganismos termotolerantes, porém o crescimento celular do isolado BT3 parece ter sido estimulado nessa temperatura, alcançando uma produção celular de 1,49 unidades de DO₆₀₀, sendo esta, a maior DO₆₀₀ observada para o isolado BT3 entre as temperaturas avaliadas (Figura 3). O isolado BT3 foi identificado como *Klebsiella oxytoca*, esta espécie pertence a um reduzido grupo coliforme que

compartilham esta peculiaridade fenotípica (termotolerância), e basicamente as presentes em águas poluídas são às espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* (Cabral & Marques, 2006). Dentre essas três espécies de coliformes termotolerantes, a *E. coli* se destaca por possuir origem quase que exclusivamente fecal, pois se trata de um membro permanente da comunidade da flora intestinal de animais de sangue quente e mamíferos (Mossel et al., 1995), enquanto as demais espécies são menos prevalentes ou transientes no ambiente intestinal (Leclerc, 2001).

O máximo crescimento celular foi observado sob temperatura de incubação de 30 °C, seguida das temperaturas de 25 e 35 °C para o isolado SB4 e para o isolado SL1 quando incubado a 30 °C, seguida da temperatura de 35 °C (Figura 3). Andreazza et al. (2010), observaram que o crescimento de *Pseudomonas* sp. se deu entre 20 e 30 °C, porém os autores descrevem o crescimento ótimo da bactéria sob temperatura de 30 °C. Chatterjee et al. (2012), observaram a faixa ótima de temperatura para o crescimento de duas bactérias resistentes a chumbo entre 37 e 45 °C.

A temperatura influenciou diretamente a biorremoção do chumbo do meio líquido (Figura 4). Quando os isolados foram incubados a 20; 25 e 35 °C a biorremoção de chumbo não ultrapassou 20 mg L⁻¹, não sendo observada diferença entre os isolados na temperatura de 20 °C e a menor biorremoção sob temperaturas de 25 e 35 °C foi observada no isolado SL1. A maior biorremoção de Pb⁺² foi observada no isolado SB4 incubado a 30 °C, seguido do isolado SL1 e por último o isolado BT3. Sob temperatura de incubação de 40 °C, o isolado SB4 obteve a máxima biorremoção de chumbo, superando os demais isolados que não diferiram entre si (Figura 4).

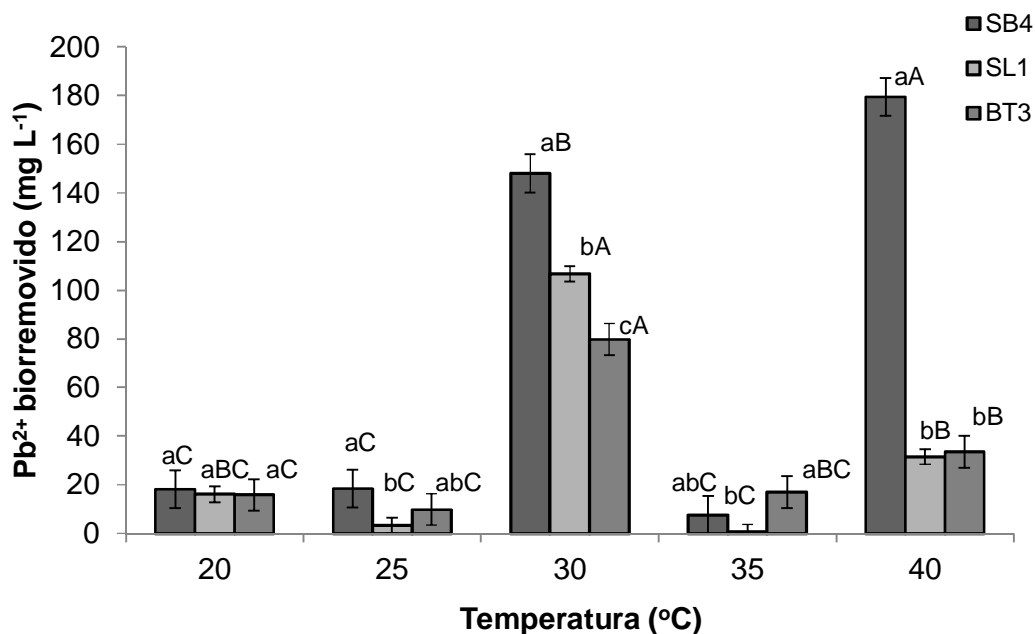


Figura 4. Caracterização quanto à biorremoção de chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes temperaturas em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo, quantificadas pelo chumbo remanescente em meio líquido (mg L⁻¹). *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada temperatura e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre temperaturas dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média.

O isolado SB4 biorremoveu 49,3 e 59,8% do chumbo presente, quando incubado sob temperaturas de 30 e 40 °C, respectivamente. O isolado SL1 biorremoveu 35,6 e 10,5% e o isolado BT3 biorremoveu 26,6 e 11,2% do chumbo disponível no meio sob as mesmas temperaturas. Esse comportamento é uma vantagem metabólica no biotratamento de ambientes naturais contaminados em que a temperatura pode variar (Andreazza et al., 2010).

A biorremoção de chumbo decresceu na seguinte ordem de temperaturas para o isolado SB4 de 30 > 40 > 25 > 20 > 35 °C; no isolado SL1 de 30 > 40 > 20 > 25 > 35 °C e no isolado BT3 de 30 > 40 > 35 > 20 > 25 °C. Muthy et al. (2012) observaram que a bioadsorção de chumbo por *Bacillus cereus* reduziu na seguinte ordem de temperaturas: 30 > 40 > 20 > 50 °C (Figura 4). Andreazza et al. (2010) observaram a máxima remoção de Cu (II) por *Pseudomonas* sp. sob a temperatura de 35 °C.

Estas observações podem ser explicadas pelo fato de elevadas temperaturas, até certo limite, conduzir o aumento da atividade metabólica (Prescott et al., 2002) e da energia do sistema, promovendo a absorção ativa ou a fixação do metal na superfície celular, respectivamente (Goyal et al., 2003; Kefala et al., 1999) ou ainda compartilhar a peculiaridade fenotípica de sobreviver e manter as funções metabólicas ativadas mesmo em temperaturas elevadas como acontece nos microrganismos termotolerantes.

4.2.2 Efeito do pH inicial

O pH do meio influenciou o crescimento celular dos isolados bacterianos (Figura 5). Os isolados SL1 e BT3 apresentaram maior produção celular (1,16 e 1,3 unidades de DO_{600} , respectivamente) em pH 5,0 e 6,0, seguidos do isolado SB4 com o menor crescimento celular em ambos os pHs. Em pH 6,5 os isolados SB4 e BT3 apresentaram elevado crescimento celular, porém o crescimento do isolado SL1 foi menor, com aproximadamente 0,2 unidades de DO_{600} . Em pH 7,0 os isolados apresentaram elevado crescimento celular, não diferindo entre si (Figura 5).

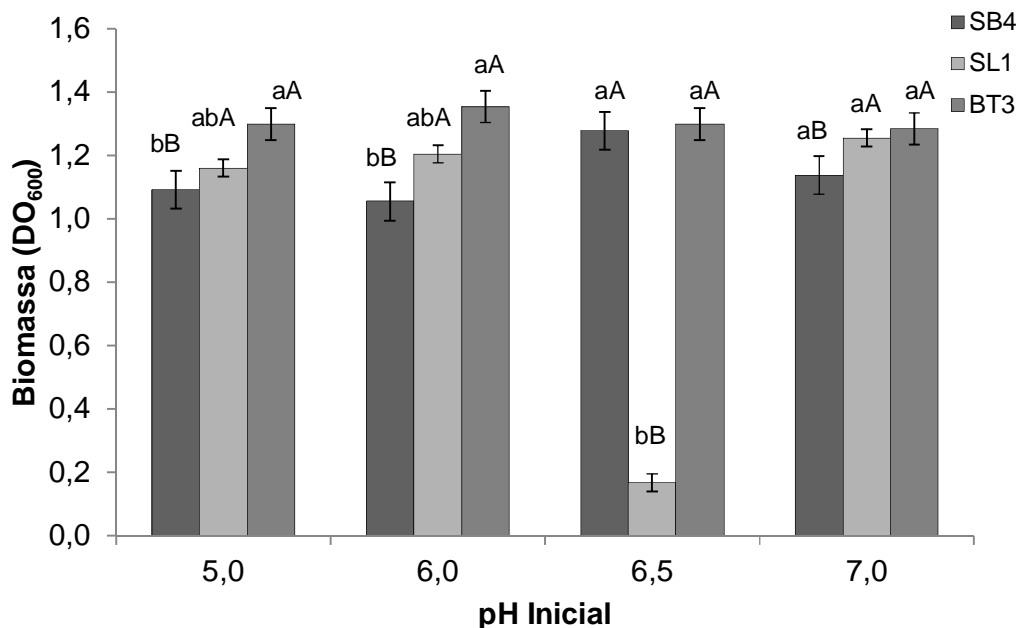


Figura 5. Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes pH em meio líquido contendo 300 mg L^{-1} de chumbo, quantificadas pelo crescimento celular (DO_{600}); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada pH e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre pH dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média.

Entre os pHs avaliados, o isolado SB4 apresentou máximo crescimento a pH 6,5, seguido dos demais pHs iniciais. A produção celular do isolado SL1 não diferiu nos pHs 5,0; 6,0 e 7,0, porém no pH 6,5 atingiu o menor crescimento. A mudança de pH do meio não influenciou o crescimento do isolado BT3 (Figura 5).

O pH da matriz de crescimento é um dos parâmetros mais importantes que afetam o processo de bioabsorção de metais pesados (Donmez & Aksu, 1999). Neste trabalho, não se observou crescimento dos isolados sob pH inicial do meio de 3,5 e 4,0 (mais ácidos), mostrando que todos os isolados são dependentes de pHs neutros ou próximos a neutralidade. De acordo com a Figura 6, todos os isolados alcalinizaram o meio, elevando o pH na faixa entre 6,5 e 7,0.

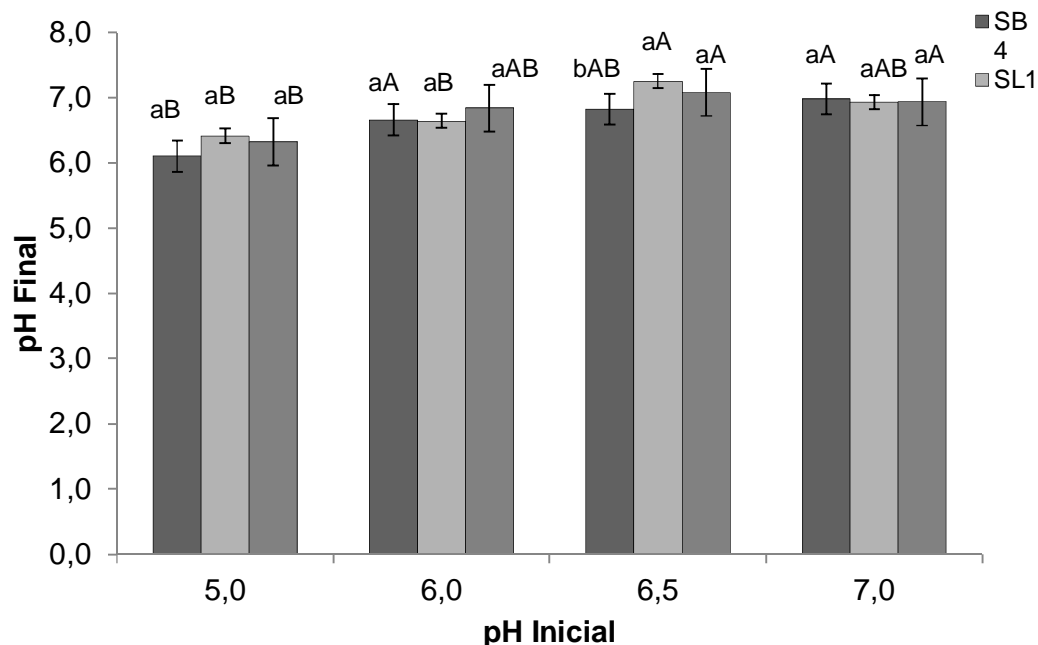


Figura 6. Caracterização da capacidade de alteração do pH do meio dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Bactéria inconclusiva (SL1) e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes pHs iniciais em meio líquido contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo; *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro de cada pH inicial e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre pH inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.

4.2.3 Efeito da concentração inicial de Pb²⁺

No meio de cultura sem a presença do chumbo e nas concentrações de 200; 400 e 600 mg L⁻¹ o máximo crescimento celular foi observado no isolado SB4, seguido dos demais. Na concentração de 300 mg L⁻¹ foi observado o máximo crescimento celular nos isolados SB4 e BT3, seguidos do isolado SL1. Na concentração de 600 mg L⁻¹ o máximo crescimento celular foi observado no isolado BT3, seguido dos demais isolados, que não diferiram entre si (Figura 7).

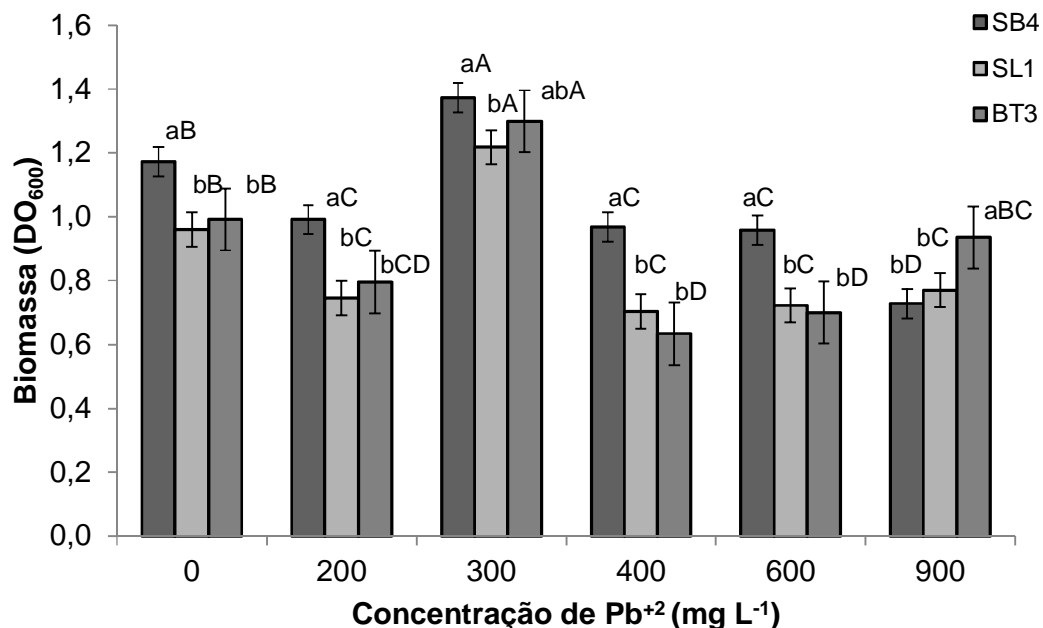


Figura 7. Caracterização quanto à resistência ao chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes concentrações de chumbo em meio líquido, quantificadas pelo crescimento celular (DO₆₀₀); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro da concentração e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre concentração inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey (p < 0,01); Barras representam o desvio padrão da média.

Avaliando-se o crescimento microbiano entre as diferentes concentrações, observou-se que a maior produção celular do isolado SB4 (1,37 unidades de DO₆₀₀) foi na concentração de 300 mg L⁻¹, seguido do meio sem chumbo e das concentrações de 200, 400 e 600 mg L⁻¹ e, o menor crescimento celular (0,73 DO₆₀₀), na concentração mais elevada. Observou-se o máximo crescimento celular do isolado SL1 (1,22 unidades de DO₆₀₀) na concentração de 300 mg L⁻¹, seguida do meio sem chumbo e o menor crescimento nas demais concentrações que não diferiram entre si. O isolado BT3 crescido em meio contendo 300 mg L⁻¹ de chumbo obteve seu máximo crescimento celular, seguido dos meios sem chumbo, com 200 e 900 mg L⁻¹, sendo os menores crescimentos celulares observados nos tratamentos com 400 e 600 mg L⁻¹ de chumbo (Figura 7).

Esta resposta dos isolados, pode estar relacionada à expressão de genes de tolerância ao chumbo codificados pelo plasmídeo durante as etapas de isolamento e purificação dos isolados em meio contendo Pb²⁺ na

concentração de 300 mg L⁻¹, aumentando consideravelmente a tolerância ao chumbo nessa concentração. A resistência ao chumbo foi reconhecida cedo, como sendo plasmidial em *R. metallidurans* (Diels et al., 1989), embora só nas últimas décadas fosse descrita em um nível molecular (Borremans et al., 2001). Contudo, foram relatadas informações sobre resistência ao chumbo por *Arthrobacter* sp. e outros Firmicutes, isolados em uma área utilizada como depósito de resíduos de uma fábrica australiana de baterias a base de chumbo (Trajanovska et al., 2007). Rouch et al. (1985), observaram que várias estirpes de *E. coli* abrigam genes codificados pelo plasmídeo, que aumentam consideravelmente a tolerância ao cobre, o que permite o crescimento destas bactérias em ambientes ricos em cobre. Além disso, esta hipótese é reforçada, quando observamos que os isolados, apenas biorremoveram quantidades consideráveis de chumbo, a partir da concentração de 300 mg L⁻¹. Enquanto, bactérias da espécie *Pseudomonas marginalis* demonstraram capacidade de exclusão de chumbo extracelular e *Bacillus megaterium* demonstraram acumulação intracelular de chumbo via citoplasma, sendo estas bactérias isoladas de solos contaminados com chumbo (Roane, 1999). O operon de resistência a chumbo, pbr, de *R. metallidurans* CH34 é único, pois ele combina funções envolvidas na captação, efluxo e acúmulo de Pb (II) (Borremans et al., 2001).

Em geral, o percentual de biorremoção de chumbo nos meios contaminados foi maior na concentração de 300 mg L⁻¹, após 24 horas de incubação (Figura 8).

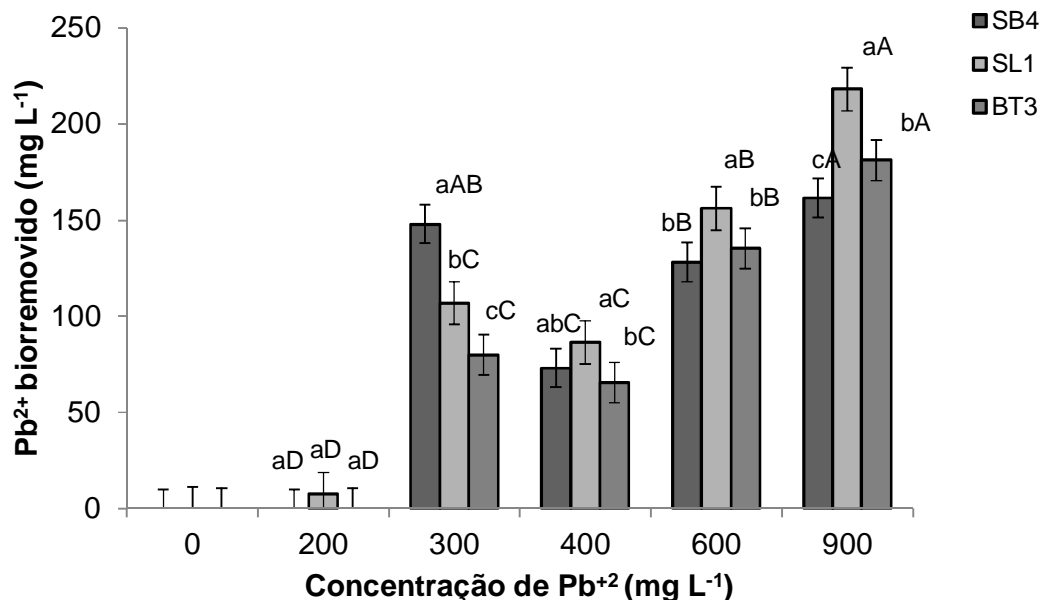


Figura 8. Caracterização quanto à biorremoção de chumbo dos isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Bactéria inconclusiva (SL1) e *Klebsiella oxytoca* (BT3) em diferentes concentrações de chumbo, quantificadas pelo percentual de chumbo remanescente em meio líquido (mg L⁻¹); *Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os isolados dentro da concentração e mesma letra maiúscula não diferem entre si entre concentração inicial dentro de cada isolado pelo teste Tukey ($p < 0,01$); Barras representam o desvio padrão da média.

Na concentração de 200 mg L⁻¹, apenas o isolado SL1 biorremoveu chumbo do meio, porém a remoção foi baixa ($\approx 4\%$). Na concentração de 300 mg L⁻¹, a máxima biorremoção foi observada no isolado SB4 (49%), seguido do isolado SL1 ($\approx 36\%$) e a menor biorremoção foi observada no isolado BT3 ($\approx 27\%$). Na concentração de 400 mg L⁻¹, a máxima biorremoção foi observada nos isolados SB4 e SL1 (18 e 22%, respectivamente), na concentração de 600 mg L⁻¹, foi observada nos isolados SL1 e BT3 (26 e 23%, respectivamente) e na maior concentração foi observada no isolado SL1 (24%), seguido dos demais isolados (Figura 8).

A biorremoção de chumbo decresceu na seguinte ordem de concentrações de chumbo no meio: no isolado SB4 de 300 > 600 > 400 > 900 > 200 mg L⁻¹; no isolado SL1 de 300 > 600 > 900 > 400 > 200 mg L⁻¹ e no isolado BT3 de 300 > 600 > 900 > 400 > 200 mg L⁻¹ (Figura 8). Embora os mecanismos de resistência bacteriana aos metais pesados estão sendo estudados muito cuidadosamente, os exatos mecanismos por trás da resistência ao elemento

chumbo permaneceram vagos (Hynninen, 2010). Várias Zn^{2+}/Cd^{2+} ATPase de efluxo são conhecidas para transportar também o Pb^{2+} (Rensing et al., 1998) e, além disso, o seqüestro de chumbo é conhecido por ser utilizado como um mecanismo de resistência (Levinson et al., 1996; Levinson & Mahler, 1998; Mire et al., 2004).

No entanto, os mecanismos moleculares por trás do seqüestro de chumbo, ainda são pouco claros. Um dos poucos determinantes conhecidos da resistência de chumbo é codificado pelo agrupamento de genes *pbrTRABCD* oriundo de *C. metallidurans* CH34 (Borremans et al., 2001). Este aglomerado de genes, consiste de seis genes que codificam para as proteínas que são hipoteticamente, para combinar as funções envolvidas na absorção (PbrT), efluxo (PbrABC) e acumulação (PbrD) de Pb^{2+} (Borremans et al., 2001). No entanto, as suas funções exatas na resistência ao Pb^{2+} são desconhecidas (Hynninen, 2010).

4.3 Promotores de crescimento em isolados resistentes ao Pb^{+2}

Os isolados bacterianos *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) foram avaliados quanto a produção de promotores de crescimento. É amplamente aceito que os microorganismos presentes na rizosfera e rizoplano podem influenciar o crescimento e desenvolvimento das plantas (Giongo et al., 2010).

Estas formas de promoção do crescimento de plantas têm sido relatadas para uma série de espécies de bactérias, incluindo *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia* (Versalovic et al., 1994; Glick, 1995; Han et al., 2005). Embora, alguns mecanismos ainda não sejam completamente compreendidos (Glick, 1995; Ahmad et al., 2008), essas bactérias podem melhorar o crescimento das plantas por fixação do N atmosférico, pela produção de fitohormônios e sideróforos, pela solubilização de fósforo e controle de doenças (Bashan & Holguin, 1998; Barea et al., 2005; Compant et al., 2005; Chakraborty et al., 2006).

Entre os isolados oriundos do solo rizosférico *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3), nenhum foi capaz de solubilizar fosfato de cálcio ($CaHPO_4$) em experimento de incubação em placas de Petri

(Tabela 10). As bactérias solubilizadoras de fosfato são utilizadas, para facilitar a dissolução de P de fontes orgânicas e inorgânicas de P total, presentes nos solos, por meio de enzimas e da produção de ácidos orgânicos (Hilda & Fraga, 1999; Chen et al., 2006).

Tabela 10. Caracterização dos isolados bacterianos resistentes a chumbo quanto ao teste de gram, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e de sideróforos.

Código Isolado	Velocidade de crescimento	Teste de Gram	Solubilização de fosfato	Produção de AIA	Produção de sideróforo
SB4	Elevada	Gram negativa	Não	Sim	Sim
SL1	Elevada	Gram negativa	Não	Sim	Sim
BT3	Elevada	Gram negativa	Não	Sim	Sim

Os isolados *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) produziram o ácido indol acético (AIA) em meio contendo chumbo na concentração de 300 mg L⁻¹ (Tabela 10). Segundo Barbieri et al. (1986) e Radwan et al. (2005) entre as auxinas, o ácido indol acético (AIA) é o mais estudado e, o mais produzido pelas bactérias. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares. Evidências sobre a ação dessa substância, no desenvolvimento radicular, foram obtidas pela inoculação de um mutante de *Azospirillum* deficiente na produção desse fitohormônio (Dobbelaere et al., 1999).

Além disso, os isolados *Kluyvera intermédia* (SB4); Isolado SL1 e *Klebsiella oxytoca* (BT3) produziram sideróforo em meio contendo chumbo na concentração de 300 mg L⁻¹ (Tabela 10). Entre os vários metabólicos produzidos por bactérias promotoras de crescimento, os sideróforos desempenham um papel significativo na mobilização e acumulação de metal solubilizando formas indisponíveis de metais ligadas ao ferro, além de formar complexos com íons bivalentes de metais que podem ser assimilados por processos mediados pela raiz (Carrillo-Castañeda et al., 2003; Braud et al., 2009; Dimkpa, et al., 2009a,b; Rajkumar et al., 2010).

4.3 Fitoextração de metais pesados por *Mucuna deeringiana* associada a bioaugmentação por rizobactérias resistentes a chumbo

As amostras de solo estudadas (S1 e S2), possuem características químicas distintas, principalmente quanto a concentração de micronutrientes e metais pesados, que podem influenciar positivamente ou negativamente a absorção de determinados elementos pelas plantas de mucuna após 70 dias de crescimento (Tabela 3).

4.3.1 Produção de fitomassa

A massa seca da parte aérea e da raiz, o número e massa seca de nódulos e a relação número/massa seca de nódulos das plantas de mucuna-anã cultivadas por 70 dias, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e relação NN/MSN de plantas de mucuna-anã, após crescimento em diferentes solos contaminados com metais pesados e inoculação com bactérias resistentes a metais.

Tratamento	MSPA	MSR
	g	
	Solo 1	
I1	13,19 aB	2,28 aA
I2	14,48 aA	2,71 aA
I3	13,67 aB	2,53 aA
Controle	13,87 aA	2,54 aA
	Solo 2	
I1	15,43 aA	2,82 aA
I2	15,16 aA	2,95 aA
I3	15,52 aA	3,04 aA
Controle	15,43 aA	3,12 aA
C.V. (%)	7,53	15,82

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada solo e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre solos dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação; I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Isolado SL1 e I3 - *Klebsiella oxytoca*.

Não houve diferença entre os tratamentos na massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de mucuna-anã cultivadas nas amostras de solo S1 e S2. Contudo, observou-se que o aumento na concentração de metais pesados na amostra S2, ocasionou uma redução na MSPA, exceto nos tratamentos I2 e controle. Resultados semelhantes foram observados por Melo et al. (2006) em plantas de mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) cultivadas em solo contaminado por Pb, Cu e Zn e não contaminado, com redução de 81% da MSPA. Para a massa seca de raízes (MSR), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 11).

Os metais pesados interferem com a homeostase iônica e atividade enzimática, e esses efeitos são visíveis em processos fisiológicos que envolvem órgãos individuais (tais como a absorção de nutrientes pelas raízes), seguido por processos mais gerais, como a germinação, crescimento, fotossíntese, balanço hídrico das plantas, metabolismo primário, e reprodução (DalCorso, 2012).

De acordo com DalCorso (2012), os sintomas visíveis de toxicidade de metais pesados incluem clorose, laminação de folhas e necrose, senescência, murcha e crescimento atrofiado, baixa produção de biomassa, um número limitado de sementes, e, eventualmente, a morte. Contudo nesse trabalho, nenhum dos sintomas foi visualmente observado nas plantas de mucuna, principalmente a redução da fitomassa da parte aérea e raízes, que foi detectada após a pesagem da fitomassa seca.

4.3.2 Teores de macronutrientes na fitomassa

Os teores de macronutrientes na fitomassa da parte aérea e radicular da mucuna-anã após 70 dias de crescimento em duas amostras de solo contaminado por metais pesados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Macronutrientes da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).

Isolado bacteriano	Parte aérea						Raiz					
	N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S
	g kg ⁻¹											
	<i>Parte aérea</i>						<i>Raiz</i>					
	<i>Amostra S1</i>											
I1 ^a	245,0 aA ^b	1,9 aA	14,7 aA	19,1 aA	2,7 aA	1,5 aB	238,4 aA	1,8 aB	20,5 aA	7,4 aB	6,8 aA	1,7 aB
I2	269,2 aA	1,8 aB	15,8 aA	18,4a B	2,7 aA	1,5 aB	233,9 aA	1,7 aB	20,5 aA	7,2 aB	8,2 aA	1,8 aB
I3	252,0 aA	1,6 aA	13,7 aA	17,3 aA	2,4 aA	1,3 aA	232,2 aA	1,9 aB	21,6 aA	7,0 aB	7,3 aA	1,7 aB
Controle	236,5 aA	1,9 aA	16,0 aA	20,0 aA	2,7 aA	1,6 aA	242,1 aA	1,7 aB	20,2 aA	7,9 aA	6,5 aA	1,5 aB
	<i>Amostra S2</i>											
I1	239,2 aA	2,2 aA	15,0 aA	21,3 aA	2,6 aA	1,8 abA	263,5 aA	2,5 aA	16,2 aB	8,9 aA	7,9 aA	3,4 aA
I2	228,9 aB	2,3 aA	15,2 aA	22,4 aA	2,6 aA	1,9 aA	257,1 aA	2,6 aA	17,1 aB	9,3 aA	8,0 aA	3,8 aA
I3	257,3 aA	1,7 bA	11,5 aA	17,0 bA	1,9 bB	1,4 bA	249,5 aA	2,7 aA	17,2 aB	8,9 aA	8,3 aA	3,4 aA
Controle	243,3 aA	2,1 abA	14,7 aA	20,9 aA	2,6 aA	1,7 abA	256,1 aA	2,2 aA	13,9 aB	8,5 aA	7,3 aA	2,9 aA
C.V. (%) ^c	10,67	11,53	16,46	11,12	11,04	11,86	8,47	13,30	10,67	7,98	25,84	18,16

^aI1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Isolado SL1 e I3 - *Klebsiella oxytoca*; ^bMédias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada solo e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre solos dentro de cada tratamento pelo teste Tukey (p< 0,05); ^cC.V. – coeficiente de variação;

O teor de nitrogênio na MSPA e na MSR das plantas de mucuna não diferiu entre os tratamentos ou entre os solos. Na amostra S1, os teores de P na MSPA foram os mesmos entre os tratamentos, porém na amostra S2, o menor teor de P foi observado no tratamento com o isolado I3. Entre os solos, apenas no tratamento com o isolado I2, observou-se maior teor de P na MSPA das plantas cultivadas na amostra S2. Os teores de P na MSR da mucuna permaneceram iguais entre os tratamentos para ambos os solos. Contudo, nas plantas cultivadas na amostra S2, os teores de P foram maiores que as cultivadas na amostra S1 (Tabela 12).

Os teores de K na MSPA das plantas de mucuna, não diferiram entre os tratamentos e entre os solos estudados, porém na MSR, apesar de não se observarem diferenças entre os teores de K nos tratamentos, entre os solos, os teores foram estatisticamente maiores nas raízes das plantas cultivadas na amostra S1 (Tabela 12).

Na MSPA das plantas de mucuna-anã cultivadas em ambas as amostras de solo, observou-se diferenças entre os teores de Ca e Mg, apenas no tratamento com o isolado I3 na amostra S2. Contudo, entre os solos observou-se o menor teor de Ca no tratamento com o isolado I2 na amostra S1 e de Mg no tratamento com o isolado I3 na amostra S2. Na MSR não se observou diferenças entre os teores de Ca e Mg nos tratamentos em ambos os solos, entretanto, os teores de Ca nas plantas cultivadas na amostra S2 foram maiores que as da amostra S1, exceto no tratamento controle. Os teores de Mg não diferiram entre os solos (Tabela 12).

Na Tabela 12, observou-se que os teores do macronutriente enxofre na MSPA das plantas cultivadas na amostra S1, não diferiu entre os tratamentos, porém nas plantas cultivadas na amostra S2, observou-se o menor teor de enxofre no tratamento com o isolado I3. Entre os solos, os teores de enxofre apenas foram significativamente diferentes nos tratamentos com os isolados I1 e I2, sendo superiores na amostra S2. Na MSR os teores foram praticamente iguais entre os tratamentos em ambos os solos, porém quando se comparou os teores de enxofre nas plantas entre os solos, observou-se que as plantas cultivadas na amostra S2 apresentaram teores de enxofre maiores que as cultivadas na amostra S1 em todos os tratamentos.

4.3.3 Teores de micronutrientes na fitomassa

Na Tabela 13 estão apresentados os teores de micronutrientes na massa seca da parte aérea e na massa seca de raiz de plantas de mucuna após 70 dias de crescimento em duas amostras de solo contaminado por metais pesados.

Apesar de alguns metais pesados serem micronutrientes essenciais, a maioria pode ser em altas concentrações, tóxico para todas as formas de vida, incluindo os microrganismos, os seres humanos e animais (Kumar et al., 2011). Os teores de micronutrientes na MSPA e MSR das plantas de mucuna aumentaram ou diminuíram de acordo com as concentrações de cada elemento no solo (Tabela 13). Resultados semelhantes foram observados por Gregor (2004), onde o autor afirma que a acumulação de metais por ambas, as raízes e as folhas, aumenta com o aumento da concentração de metais disponíveis no meio externo.

Os teores do micronutriente Fe na MSPA e na MSR das plantas de mucuna cultivadas em ambos os solos sob todos os tratamentos foram iguais, não apresentando diferença significativa entre os valores encontrados. Os teores de Zn na MSPA da mucuna não variaram entre os tratamentos na amostra S1, contudo, na amostra S2 o menor teor de Zn foi observado no tratamento com o isolado I3. Os teores mais elevados de Zn na MSPA e na MSR das plantas cultivadas na amostra S2 foram de 20,6 g kg⁻¹ (I2) e 94 g kg⁻¹ (I3), representando uma elevação de 90,3 e 95,6%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos na amostra S1 (Tabela 13).

Tabela 13. Micronutrientes da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).

Isolado bacteriano	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni
	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
Parte aérea						Raiz				
Amostra S1										
I1	8,6 aA	1,4 aB	176,9 aB	10,2 aA	26,4 aB	139,6 aA	3,0 aB	343,8 aB	6,4 aA	128,9 aB
I2	9,0 aA	1,3 aB	165,2 aB	10,5 aA	26,8 aB	118,8 aA	4,1 aB	287,5 aB	5,9 aA	117,4 aB
I3	7,1 aA	1,2 aB	150,7 aB	9,2 aA	25,2 aB	149,4 aA	3,9 aB	329,8 aB	6,7 aA	142,3 aB
Controle	8,8 aA	2,0 aB	340,6 aB	8,3 aA	51,3 aA	135,1 aA	3,5 aB	320,9 aB	6,8 aA	173,5 aB
Amostra S2										
I1	7,0 aA	18,8 aA	729,4 aA	2,8 aB	93,5 aA	149,8 aA	77,7 aA	2.508,3 aA	3,8 aB	487,8 aA
I2	7,6 aA	20,6 aA	785,6 aA	3,6 aB	104,9 aA	160,8 aA	86,5 aA	2.787,1 aA	3,9 aB	552,2 aA
I3	7,2 aA	15,0 bA	568,4 aA	2,7 aB	75,9 aA	191,1 aA	93,9 aA	2.712,4 aA	4,3 aB	563,8 aA
Controle	6,8 aA	20,4 aA	628,6 aA	4,2 aB	82,5 aA	156,1 aA	79,3 aA	2.464,5 aA	3,7 aB	445,2 aA
C.V. (%)	20,09	17,40	36,83	31,77	36,58	19,30	28,23	25,83	14,42	21,92

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada solo e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre solos dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação; I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Bactéria inconclusiva e I3 - *Klebsiella oxytoca*.

Quando comparado o teor de Zn na MSPA entre os solos, observou-se que os teores de Zn foram muito elevados nas plantas cultivadas na amostra de solo S2, o mesmo ocorrendo para os elementos Cu e Ni na MSPA e na MSR. Contudo, os teores de Mn foram maiores na MSPA e na MSR das plantas cultivadas na amostra de solo S1. Entre os tratamentos avaliados, não se observaram diferenças nos teores de Cu, Mn e Ni na fitomassa da mucuna (Tabela 13).

Para o elemento Cu o maior teor observado na MSPA e MSR das plantas cultivadas na amostra S2 foi de $785,6 \text{ mg kg}^{-1}$ e $2.787,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I2), respectivamente, representando uma elevação de 79 e 87,7%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos na amostra S1. Para o elemento Ni, observaram-se elevações nos teores da MSPA e MSR das plantas cultivadas na amostra S2 de 74,5% (isolado I2) e 74,8% (isolado I3), respectivamente, quando comparados aos mesmos tratamentos na amostra S1. Entretanto, os teores de Mn na MSPA e MSR das plantas cultivadas na amostra S1 foram 72,5 e 45,6%, respectivamente, maiores que das plantas de mucuna coletadas na amostra de solo S2 (Tabela 13).

De acordo com Van der Ent et al. (2013), as espécies hiperacumuladoras são consideradas as plantas que apresentam concentrações para diferentes metais na fitomassa seca das folhas de 100 mg kg^{-1} para Cd, Se e Ti; 300 mg kg^{-1} de Co, Cu e Cr; 1.000 mg kg^{-1} para o Ni, Pb e As, 3.000 mg kg^{-1} de Zn; $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn. Portanto, a planta de mucuna-anã pode ser considerada uma hiperacumuladora dos elementos Cu e Zn, sendo vantajosa sua recomendação nas etapas do processo de fitorremediação de áreas contaminadas por estes elementos, além de se desenvolver bem em solo contaminado por vários metais e possuir elevada produção de fitomassa, o que aumenta a capacidade de acumulação e remoção de Cu e Zn. Contudo, estas respostas foram observadas com o aumento da concentração dos elementos no solo.

4.3.4 Metais pesados na fitomassa

Os teores de metais pesados na MSPA e na MSR das plantas de mucuna cultivadas em dois solos contaminados durante 70 dias estão apresentados na Tabela 14. Observou-se que nas plantas cultivadas na amostra de solo S1, independente do tratamento, a ordem decrescente da acumulação de metais pesados (mg kg^{-1} de massa seca) foi $\text{Cr} = \text{As} > \text{Ba} > \text{Pb} = \text{Cd}$ e na amostra de solo S2 de $\text{Cd} > \text{As} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Ba} > \text{Cd} > \text{Ba}$ na parte aérea da mucuna-anã. Nas raízes da mucuna cultivada na amostra de solo S1 foi de $\text{Pb} > \text{Cr} > \text{As} = \text{Cd} > \text{Ba}$ e na S2 foi de $\text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{As} > \text{Ba}$. De acordo com Pongrac et al. (2010), as plantas podem evitar a absorção de metais em suas raízes (resistência) ou restringir o transporte de metal para a parte aérea (tolerância).

Os teores de Cd na MSPA das plantas cultivadas na amostra de solo S1, não variaram em função da aplicação dos inóculos microbianos, porém na amostra S2, o teor de Cd no tratamento com o isolado I3 foi o menor observado (58 mg kg^{-1}). Entre os solos estudados, observou-se uma ampla variação entre teores de Cd na MSPA. Na amostra S1, os teores de Cd variaram entre 2,1 (isolado I2) e $3,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (controle), entretanto, na amostra S2 estes teores variaram entre 58 (isolado I3) e $80,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I2), sendo mais elevados em todos os tratamentos. Na MSR os teores de Cd foram ainda mais elevados, variando na amostra de solo S1 entre 29,6 (isolado I1) e $40,8 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I2) e na amostra de solo S2 entre 851,3 (controle) e $1.280,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I3). Entre os tratamentos com inóculo microbiano avaliados na amostra de solo S1 não foram observadas diferenças significativas e na amostra de solo S2, observou-se o menor teor de Cd na MSR no tratamento controle quando comparado aos demais tratamentos, que não diferiram entre si. Os teores mais elevados de Cd na MSPA e na MSR das plantas cultivadas na amostra de solo S2 foram de $80,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I2) e $1.280,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (isolado I3), representando uma elevação de 97,4 e 97,1%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos na amostra de solo S1 (Tabela 14).

Tabela 14. Metais pesados da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de mucuna-anã, inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados (I1, I2 e I3), após crescimento em solos contaminados (S1 e S2).

Isolado bacteriano	Parte aérea					Raiz				
	Cd	Cr	Pb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	As	Ba
	mg kg ⁻¹									
	<i>Amostra S1</i>									
I1	2,2 aB	44,7 aA	2,7 aB	44,8 aA	8,7 aA	29,6 aB	118,7 aB	236,9 aB	20,6 aB	8,5 aA
I2	2,1 aB	43,2 aA	4,4 aB	41,4 aA	10,1 aA	40,8 aB	129,9 aB	219,2 aB	46,7 aB	8,1 aA
I3	2,5 aB	42,5 aA	2,0 aB	48,0 aA	10,7 aA	37,3 aB	124,3 aB	251,8 aB	23,2 aB	8,5 aA
Controle	3,1 aB	44,7 aA	2,5 aA	37,3 aA	8,1 aA	31,5 aB	159,6 aB	258,2 aB	48,3 aB	8,7 aA
	<i>Amostra S2</i>									
I1	78,8 aA	32,1 abB	16,6 bA	50,9 aA	3,0 aB	1.080,9 abA	267,4 aA	1.431,6 bA	133,3 aA	4,2 aB
I2	80,9 aA	36,0 abA	16,5 bA	55,0 aA	3,8 aB	1.168,1 abA	283,7 aA	1.592,5 abA	131,8 aA	4,6 aB
I3	58,0 bA	29,1 bB	23,9 aA	33,4 aA	4,0 aB	1.280,4 aA	334,0 aA	1.831,4 aA	138,2 aA	4,6 aB
Controle	68,3 abA	47,7 aA	2,3 cA	55,5 aA	5,8 aA	851,3 bA	277,4 aA	1.451,8 bA	135,2 aA	4,0 aB
C.V. (%)	24,38	20,44	27,47	34,16	32,44	31,20	18,76	18,08	20,93	12,13

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada solo e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre solos dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação; I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Bactéria inconclusiva e I3 - *Klebsiella oxytoca*.

Os teores de Cr na MSPA das plantas cultivadas na amostra S1, não variaram com os tratamentos, contudo na amostra S2, o teor de Cr foi menor no tratamento com o isolado I3. Entre os solos, observou-se que os teores de Cr foram 28,2 e 31,5%, respectivamente maiores nos tratamentos com o isolado I1 (44,7 mg kg⁻¹) e com o isolado I3 (42,5 mg kg⁻¹) na amostra S1, nos demais tratamentos não se observaram diferenças significativas. Na MSR da mucuna cultivada nas amostras S1 e S2, os teores de Cr não variaram entre os tratamentos, entretanto os teores foram maiores nas plantas cultivadas na amostra S2 em todos os tratamentos, variando entre 267,4 no tratamento com o isolado I1 e 334 mg kg⁻¹ com o isolado I3, com um incremento no teor de Cr de 62,8% (isolado I3), quando comparado ao mesmo tratamento na amostra de solo S1. (Tabela 14).

Os teores de chumbo (Pb) na MSPA e na MSR das plantas de mucuna cultivadas em solos contaminados durante 70 dias estão apresentados na Tabela 14. Observou-se que os teores de Pb na MSPA da mucuna na amostra S1 variaram entre 2,0 e 4,4 mg kg⁻¹, não diferenciando entre os isolados microbianos aplicados, porém na amostra S2, os teores de chumbo variaram entre 2,3 e 23,9 mg kg⁻¹ com o isolado I3, sendo o menor valor observado no tratamento controle. Entre os solos avaliados, os teores de chumbo na MSPA foram maiores nos tratamentos com isolados microbianos dentro da amostra S2, exceto o controle que não diferiu entre os solos. Na MSR das plantas de mucuna cultivadas na amostra S1 os teores de chumbo variaram entre 219 e 258 mg kg⁻¹, entretanto não observou-se diferença entre os tratamentos. Já na amostra S2, os teores de chumbo na MSR das plantas em todos os tratamentos foram maiores que aos da amostra S1, porém dentro da amostra de solo S2, os teores mais elevados foram encontrados onde se aplicou os isolados bacterianos I2 e I3 (1.592,5 e 1.831,4 mg kg⁻¹, respectivamente), seguidos do isolado I1 (1.431,6 mg kg⁻¹) e do controle (1.451,8 mg kg⁻¹) que não diferiram entre si (Tabela 14). Para o elemento Pb os teores mais elevados foram observados na MSPA e MSR das plantas cultivadas na amostra de solo S2, sendo de 23,9 mg kg⁻¹ e 1.831,4 mg kg⁻¹ (isolado I3), respectivamente, representando uma elevação de 91,6 e 86,3%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos na amostra S1.

Resultados diferentes foram observados por Melo et al. (2006), que encontraram na MSPA e na MSR da mucuna preta teores 37,8 e 4.566,9 mg Pb kg⁻¹, respectivamente, cultivadas em solo contaminado com Pb, Cu e Zn. Contudo, o solo utilizado por estes autores foi contaminado via solução e incubados durante 30 dias, visando elevar a concentração de Pb, Zn e Cu no solo para 500, 300 e 200 mg kg⁻¹, respectivamente. Na literatura diversos autores (Barrow, 1998; Christensen, 1984; Lock & Janssen, 2003; Lu et al., 2005; Lim et al., 2002) afirmam que a disponibilidade de metais no solo diminui com o tempo após a contaminação, o que explicaria a diferença nas concentrações fitoextraídas destes elementos pela mucuna, visto que, os solos utilizados possuem um histórico de contaminação de mais de 40 anos. Ou ainda, a biodisponibilidade dos metais pode ter sido reduzida pela calagem realizada antes do início do experimento, com o intuito de elevar o pH dos solo. Melo et al. (2008) observaram que a calagem do solo reduziu os teores disponíveis de Cd, Pb, Cu e Zn em um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico.

Os teores de arsênio (As) na MSPA das plantas de mucuna cultivadas na amostra de solo S1 variaram entre 37,3 mg kg⁻¹ no tratamento controle e 48 mg kg⁻¹ no tratamento com o isolado I3 e na amostra S2 variaram entre 33,4 mg kg⁻¹ no tratamento com o isolado I3 e 55,5 mg kg⁻¹ no tratamento controle, contudo não observaram-se diferenças entre os tratamentos. Observaram-se elevações nos teores da MSPA e MSR das plantas cultivadas na amostra S2 de 24,7% (isolado I2) e 83,2% (isolado I3), respectivamente, quando comparados aos mesmos tratamentos na amostra S1 (Tabela 14).

Observou-se que entre os tratamentos, os teores de bário (Ba) na MSPA e MSR das plantas de mucuna cultivadas nas amostras de solo S1 e S2 não diferiram significativamente entre si, contudo, os teores de Ba na MSPA das plantas cultivadas na amostra S1 foram maiores que das cultivadas na amostra S2 para um mesmo tratamento, exceto no controle e na MSR seguiu-se a mesma tendência em todos os tratamentos. Os teores de Ba na MSPA e MSR nas plantas de mucuna cultivadas na amostra S1 foram 62,6 e 45,9% (isolado I3), respectivamente, quando comparados aos mesmos tratamentos na amostra S2 (Tabela 14).

De acordo com os critérios de Van der Ent et al. (2013), a planta de mucuna-anã não foi classificada como hiperacumuladora de nenhum dos metais

pesados avaliados, contudo, o teor de Cd na MSPA da mucuna no tratamento com o isolado I2, cultivada na amostra S2, foi de 81 mg kg⁻¹, sendo próximo ao estabelecido para hiperacumuladoras de Cd (100 mg kg⁻¹). Portanto, a espécie estudada tem potencial para remediar áreas onde o elemento Cd se encontra em elevadas concentrações juntamente com outros metais potencialmente tóxicos, como o Pb, As, Cr e Ba. Hipoteticamente, caso houvesse a remoção da planta inteira (parte aérea + raízes), haveria remoção bruta de 1.338,4 mg kg⁻¹ de Cádmio (isolado I3 - amostra S2); 363,1 mg kg⁻¹ de Cromo (isolado I3 - amostra S2); 1.855,3 mg kg⁻¹ de Chumbo (isolado I3 - amostra S2); 186,8 mg kg⁻¹ de Arsênio (isolado I2 - amostra S2) e 19,2 mg kg⁻¹ de Bário (isolado I3 - amostra S1) na massa seca.

4.3.5 Fitoextração de metais pesados por *Mucuna deeringiana*

Nas plantas de mucuna-anã cultivadas na amostra S1 observaram-se valores maiores que um (> 1) para o fator de translocação (FT) dos micronutrientes e metais pesados, apenas no tratamento controle para o elemento cobre (Cu), para o elemento manganês (Mn) em todos os tratamentos e nos tratamentos com os isolados I1 e I3 para o metalóide arsênio (As). Contudo, na amostra S2 observou-se FT > 1, apenas no tratamento controle para o elemento Mn, não se observando nos demais tratamentos (Tabela 15).

Tabela 15. Fator de translocação (FT) de micronutrientes e metais pesados de plantas de mucuna-anã inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados após crescimento em solos contaminados.

Isolado bacteriano	Cu	Zn	Mn	Ni	Cd	Cr	Pb	As	Ba
<i>Amostra S1</i>									
I1	0,51	0,49	1,59	0,21	0,08	0,38	0,01	2,89	0,02
I2	0,58	0,33	1,79	0,23	0,07	0,34	0,02	0,93	0,02
I3	0,47	0,39	1,43	0,18	0,07	0,36	0,01	2,40	0,02
Controle	1,06	0,72	1,27	0,39	0,11	0,33	0,01	0,75	0,02
<i>Amostra S2</i>									
I1	0,30	0,25	0,75	0,20	0,08	0,13	0,01	0,39	0,02
I2	0,29	0,24	0,91	0,19	0,05	0,13	0,01	0,42	0,02
I3	0,21	0,17	0,64	0,14	0,05	0,09	0,01	0,24	0,01
Controle	0,30	0,26	1,09	0,19	0,08	0,18	0,00	0,43	0,02

* Valores > 1 estão em negrito; I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Bactéria inconclusiva e I3 - *Klebsiella oxytoca*.

Observou-se que nas amostras de solo S1 e S2, os valores para o fator de bioconcentração (FBC) foram maiores que um (Tabela 16). Para o elemento Cu nas amostras S1 e S2, observaram-se em todos os tratamentos $FBC > 1$, sendo de 429,8; 359,3; 412,2 e 401,1 nas plantas cultivadas na amostra S1 e de 264,1; 293,4; 285,5 e 259,4 nas cultivadas na amostra S2 para os tratamentos com os isolados I1, I2, I3 e controle, respectivamente. Para o elemento níquel (Ni), os valores do FBC foram de 41,6; 39,1; 47,5 e 57,8 nas plantas cultivadas na amostra de solo S1 e de 54,2; 61,4; 62,7 e 49,5 nas cultivadas na amostra S2 para os tratamentos com os isolados I1, I2, I3 e controle, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16. Fator de bioconcentração (FBC) de micronutrientes e metais pesados de plantas de mucuna-anã inoculadas com rizobactérias resistentes a metais pesados após crescimento em solos contaminados.

Isolado bacteriano	Cu	Zn	Mn	Ni	Cd	Cr	Pb	As	Ba
	<i>Amostra S1</i>								
I1	429,80	0,32	0,18	41,95	29,55	23,74	3,29	20,59	0,06
I2	359,31	0,43	0,16	39,13	40,81	25,96	3,05	46,66	0,06
I3	412,22	0,41	0,18	47,45	37,30	24,87	3,50	23,15	0,06
Controle	401,10	0,37	0,18	57,82	31,48	31,91	3,59	48,33	0,06
<i>Amostra S2</i>									
I1	264,10	0,46	0,13	54,20	540,44	17,83	6,31	19,04	0,02
I2	293,38	0,51	0,13	61,36	584,07	18,91	7,02	18,83	0,03
I3	285,52	0,55	0,15	62,65	640,19	22,27	7,63	19,74	0,03
Controle	259,42	0,47	0,13	49,46	425,63	18,49	6,39	19,31	0,02

* Valores > 1 estão em negrito; I1 - *Kluyvera intermédia*; I2 - Bactéria inconclusiva e I3 - *Klebsiella oxytoca*.

Os valores do fator de bioconcentração (FBC) para o elemento cádmio (Cd) em plantas de mucuna-anã foram de 29,6; 40,8; 37,3 e 31,5 nas plantas cultivadas na amostra S1, sendo maiores nas plantas cultivadas na amostra de solo S2 com valores de 540,4; 584,1; 640,2 e 425,6 para os tratamentos onde se aplicaram os isolados I1; I2 e I3 e no tratamento controle, respectivamente. Já para o elemento Cr, os valores do FBC foram de 23,7; 26,0; 24,9 e 31,9 nas plantas cultivadas na amostra S1 e de 17,8; 18,9; 22,3 e 18,5 nas plantas cultivadas na amostra S2 para os tratamentos onde se aplicaram os isolados I1; I2 e I3 e no tratamento controle, respectivamente (Tabela 16).

Observou-se que os valores do FBC foram de 3,3; 3,1; 3,5 e 3,6 para o elemento Pb e de 20,6; 46,7; 23,2 e 48,3 para o As nas plantas cultivadas na amostra S1 e nas plantas cultivadas na amostra S2 de 6,3; 7,0; 7,6 e 6,4 para o chumbo e de 19,0; 18,8; 19,7 e 19,3 para o arsênio nos tratamentos onde se aplicaram os isolados I1; I2 e I3 e no tratamento controle, respectivamente (Tabela 16). Contudo, espécies tolerantes a metais pesados, com alto FBC e baixo FT podem ser utilizadas na fitoestabilização de áreas contaminadas, juntamente com outras coberturas vegetais (Yoon et al., 2006). A fitoestabilização utiliza plantas para minimizar a mobilidade e biodisponibilidade dos poluentes no ambiente, ou imobilizando-os, ou impedindo a sua migração (Smith & Bradshaw, 1972; Vangronsveld et al., 1995).

As plantas de mucuna-anã cultivadas na amostra de solo S2, independente do tratamento, apresentaram elevado FBC para os micronutrientes Cu e Ni e para os metais Cd, Cr, Pb e para o metalóide As, sendo considerada uma espécie com elevado potencial para fitoestabilização de elementos tóxicos. Segundo Efrogmson et al. (2001); Zhao et al. (2003), o fator de bioconcentração diminui com o aumento da concentração de metais pesados no solo. Contudo, observou-se que apenas os elementos Cu, Cr e As se comportaram dessa forma, ao contrário dos elementos Ni, Cd e Pb, que apresentaram FBC em plantas de mucuna no solo mais contaminado, maiores que no solo menores concentrações desses elementos.

Microorganismos da rizosfera associados a plantas tolerantes e acumuladoras de metais desempenham papéis importantes no crescimento da planta, na tolerância da planta aos metais, bem como na fitorremediação de solos contaminados por metais pesados (Kuffner et al., 2008). Contudo, em geral, não se observaram esses efeitos após a aplicação dos isolados nas plantas de mucuna-anã.

As plantas de mucuna-anã apresentaram ambos os fatores, ou seja, fator de bioconcentração (FBC) e o fator de translocação (FT) maior do que um (> 1) nas plantas cultivadas na amostra de solo S1 no tratamento controle para o elemento Cu e nos tratamentos com os isolados I1 e I3 para o metalóide As (Tabelas 15 e 16). De acordo com Fitz & Wenzel (2002) e Yoon et al. (2006) estes resultados caracterizam a mucuna como uma espécie com elevado potencial para utilização na fitoextração desses elementos.

4.4 Acumulação de metais pesados nas espécies medicinais *Cynara scolymus*, *Ocimum basilicum* e *Rosmarinus officinalis*.

4.4.1 Produção de fitomassa

Em geral, a produção de massa seca da parte aérea (MSPA) foi menor nas plantas crescidas na amostra de solo S3 (contaminação elevada), quando comparadas ao solo natural, exceto para as plantas de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*). (Tabela 17). A MSPA da Alcachofra (*Cynara scolymus*), cultivada nas amostras de solo S3, S4 e S5, reduziram aproximadamente 57,7; 3,4 e 27,2%, respectivamente, quando comparadas ao solo natural. Entretanto, a MSPA da Alcachofra cultivada nas amostras de solo S4 e S5 não diferiram das cultivadas no solo natural, sendo o menor valor observado nessa variável nas plantas cultivadas na amostra S3 (Tabela 17).

Tabela 17. Massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais, após crescimento em diferentes solos contaminados com metais pesados.

Amostra	MSPA	MSR
---------	------	-----

de solo	g	
	<i>Alcachofra (Cynara scolymus)</i>	
S3	2,1 b	1,00 b
S4	4,79 a	0,87 b
S5	3,61 ab	0,87 b
Solo natural	4,96 a	2,91 a
	<i>Manjeriço (Ocimum basilicum)</i>	
S3	8,86 c	1,00 a
S4	10,63 bc	1,03 a
S5	17,35 a	1,47 a
Solo natural	12,51 b	1,07 a
	<i>Alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>	
S3	7,91 a	1,68 a
S4	6,51 a	1,38 a
S5	6,64 a	1,30 a
Solo natural	6,33 a	1,12 a
C.V. (%)	15,74	31,66

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada espécie pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação.

A redução da variável massa seca da raiz (MSR) da Alcachofra nas amostras S3, S4 e S5 quando comparadas ao solo natural foi de aproximadamente 65,6; 70,1 e 70,1%, respectivamente (Tabela 17).

A MSPA do Manjeriço (*Ocimum basilicum*) foi significativamente reduzida na amostra S3, quando comparada aos demais tratamentos. Observou-se redução de 29,2 e 15,0% nas amostras de solo S3 e S4, respectivamente, e um incremento de 38,7% na MSPA das plantas cultivadas na amostra de solo S5 quando comparadas as cultivadas no solo natural, sendo a maior MSPA nas plantas cultivadas na amostra S5, seguida da amostra S4 e do solo natural e o pior resultado para MSPA nas plantas cultivadas na amostra S3. Todavia, para a variável massa seca da raiz das plantas de Manjeriço não foram observadas diferenças significativa entre os solos estudados (Tabela 17). Nas plantas de Alecrim não se observaram diferenças significativas para a MSPA e MSR nas amostras de solo avaliadas (Tabela 17).

Dentre as espécies estudadas, as plantas de Alcachofra cultivadas na amostra de solo S3 foram as únicas que apresentaram sintomas visuais de toxicidade, apresentando clorose nas folhas. Em geral, as espécies estudadas reduziram o peso da massa seca da parte aérea quando cultivadas no solo com

concentrações elevadas de metais (amostra S3), principalmente o chumbo, porém as plantas de Alecrim não apresentaram redução da fitomassa seca quando comparadas as plantas cultivadas no solo natural (Tabela 17), portanto, a avaliação da redução do tamanho da planta ou produção de fitomassa, não são indicadores confiáveis para o biomonitoramento da contaminação ou da presença de íons metálicos nos solos cultiváveis, pois algumas espécies são resistentes a presença desses metais, não demonstrando aspectos visuais de toxidez. Contudo, Houshmandfar & Moraghebi (2011) e Siddhu et al. (2008) consideram que fatores como a fitomassa reduzida, comprimento de raiz e comprimento da parte aérea são indicadores comuns de toxicidade metal pesado.

4.4.2 Teores de macronutrientes na fitomassa

Na massa seca da parte aérea e da raiz (MSPA e MSR) da Alcachofra os teores de fósforo (P) variaram em razão do tipo de amostra de solo (Tabela 18).

Observaram-se os maiores teores de P na MSPA e na MSR das plantas cultivadas nas amostras S3 (3,2 e 2,2 g kg⁻¹, respectivamente) e S5 (2,9 e 2,7 g kg⁻¹, respectivamente) e os menores teores observados nas amostras S4 e solo natural. Contudo, os maiores teores de potássio (K) na MSPA foram observados nas plantas cultivadas nas amostras S4 e solo natural e na MSR nas amostras S4 e S5. Para o elemento cálcio (Ca) o maior teor foi na MSPA das plantas cultivadas na amostra S3, seguido da S5 e das amostras S4 e solo natural. Para o magnésio (Mg) os maiores teores foram observados nas amostras de solo S5 e solo natural. Os teores de Ca e Mg na MSR não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Os teores do elemento enxofre (S) na MSPA não diferiram entre os tratamentos. Entretanto, na MSR o maior teor foi observado nas plantas cultivadas na amostra S5, seguido das amostras S3 e S4 e o menor teor nas plantas cultivadas no solo natural (Tabela 18).

Tabela 18. Macronutrientes na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).

Amostra de solo	g kg ⁻¹					g kg ⁻¹				
	P	K	Ca	Mg	S	P	K	Ca	Mg	S
	<i>Parte aérea</i>					<i>Raiz</i>				
	<i>Alcachofra (Cynara scolymus)</i>					<i>Alcachofra (Cynara scolymus)</i>				
S3	3,2 aA	48,8 bA	41,3 aA	4,2 bA	2,2 aAB	2,2 abA	20,8 bB	7,9 aB	2,7 aB	1,5 bA
S4	2,4 bcB	57,8 abA	25,0 cA	4,2 bA	2,3 aA	1,8 bA	31,3 aAB	6,4 aB	3,1 aA	1,3 bcB
S5	2,9 abAB	50,2 bA	33,1 bA	5,0 abA	2,4 aAB	2,7 aA	29,7 aB	6,8 aB	2,7 aB	2,6 aA
Solo natural	2,0 cB	61,8 aA	23,2 cA	5,7 aA	2,4 aA	1,7 bB	17,8 bC	4,3 bB	3,2 aB	0,9 cB
	<i>Manjeriço (Ocimum basilicum)</i>					<i>Manjeriço (Ocimum basilicum)</i>				
S3	3,0 aA	27,4 aB	26,8 aB	3,8 bA	1,9 aB	1,9 bcA	28,1 bA	6,2 aB	3,8 bAB	1,5 aA
S4	3,4 aA	30,9 aB	23,2 abA	4,5 abA	1,5 aB	1,5 cA	35,9 bA	5,0 aB	3,2 bA	1,0 bB
S5	3,5 aA	29,9 aC	19,8 bB	4,6 abA	1,9 aB	2,1 bB	50,2 aA	5,7 aB	4,1 abAB	1,2 abC
Solo natural	2,9 aA	28,3 aB	13,3 cB	5,3 aA	1,6 aB	2,7 aA	50,4 aA	5,7 aB	6,9 aA	1,6 aA
	<i>Alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>					<i>Alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>				
S3	1,7 bB	25,1 bB	14,95 aC	3,5 cA	2,4 aA	1,2 bB	24,9 bAB	11,3 aA	6,2 aA	1,9 aA
S4	2,1 abB	30,9 abB	13,1 aB	4,0 bcA	2,6 aA	1,4 abA	27,3 bB	13,0 aA	5,5 aA	1,9 aA
S5	2,5 aB	39,8 aB	13,3 aC	4,7 bA	2,8 aA	1,8 aB	36,0 aB	11,5 aA	6,4 aA	2,1 aB
Solo natural	2,5 aAB	33,0 abB	11,2 aB	6,0 aA	2,9 aA	1,5 abB	31,8 abB	8,1 bA	6,5 aA	1,8 aA
C.V. (%)	16,85	14,75	11,91	12,15	13,93	17,76	14,60	15,75	40,66	19,57

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada espécie medicinal e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre espécies dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação.

Os teores de P, K e S na fitomassa da parte aérea do Manjeriço não diferiram entre os tratamentos. Contudo, na MSR o maior teor de P foi observado nas plantas cultivadas no solo natural, seguido das amostras de solo S3 e S5 e o menor teor na amostra S4. Para o elemento K os maiores teores na MSR do manjeriço foram observados nas amostras S5 e solo natural, seguidos das amostras S3 e S4. O maior teor de Ca na MSPA do Manjeriço foi observado nas amostras S3 e S4, seguidas das S5 e solo natural, porém na MSR não foram observadas diferenças significativas. Os teores de Mg variaram de 4,2 a 5,7 g kg⁻¹, sendo o maior observado nas plantas cultivadas nas amostras de solo S4, S5 e solo natural e o menor teor de Mg observado na amostra S3. Todavia, na MSR os maiores teores foram nas amostras S5 e solo natural e os menores nas amostras S3 e S4. Não foram observadas diferenças significativas nos teores de enxofre na MSPA do Manjeriço, porém na MSR os teores mais elevados foram observados nas plantas cultivadas nas amostras S3, S5 e solo natural e o menor teor na amostra S4 (Tabela 18). De acordo com CQFS-RS/SC (2004) estes valores são adequados para a cultura.

Nas plantas de Alecrim observaram-se diferenças entre os teores de macronutrientes na MSPA. Os maiores teores na MSPA e na MSR do elemento P foram observados nas plantas cultivadas nas amostras de solo S4, S5 e solo natural, seguidas da amostra S3. Para o elemento potássio (K) os maiores teores na MSPA foram observados nas plantas cultivadas nas amostras de solo S4, S5 e solo natural, seguidas da amostra S3, entretanto na MSR os teores foram maiores nas amostras S5 e solo natural e menor nas amostras S3 e S4. Na MSPA do Alecrim não foram observadas diferenças nos teores dos elementos Ca e S entre os tratamentos e na MSR os maiores teores de Ca foram observados nas plantas cultivadas nas amostras S3, S4 e S5, sendo o menor teor observado nas plantas cultivadas solo natural e para o elemento enxofre (S) não foram observadas diferenças nos teores na MSPA e MSR. Entretanto, para o elemento Mg o maior teor foi observado no solo natural, seguido das amostras S5 e da S3 e S4. Na MSR do Alecrim não foram observadas diferenças nos teores de Mg (Tabela 18).

Dentre as espécies vegetais medicinais estudadas, o Manjeriço apresentou os maiores teores de P na MSPA, quando comparado as demais

espécies. Para o elemento K na MSPA a Alcachofra e na MSR o Manjeriço. Os teores do elemento Ca na MSPA foram maiores na Alcachofra e na MSR no Alecrim. O teor de Mg na MSPA não diferiu entre as espécies estudadas, porém na MSR, em geral, foi mais elevado no Alecrim e os maiores teores de enxofre na MSPA e MSR foram observados no Alecrim (Tabela 18). Os resultados observados foram independentes dos tratamentos e os teores de macronutrientes na parte aérea e raiz não mantiveram um padrão, variando entre espécies e solos, e por isso, os teores de macronutrientes na fitomassa seca, não podem ser considerados bioindicadores da presença de íons metálicos no solo ou dos efeitos fitotóxicos inerentes a eles. Subramanian et al. (2012) avaliando 15 espécies medicinais observaram que os teores de nutrientes minerais (macro e micronutrientes) nas plantas apresentaram uma ampla faixa de variação, não sendo possível caracterizar a presença de contaminantes apenas com esta variável.

4.4.3 Teores de micronutrientes na fitomassa

Os teores de micronutrientes na parte aérea e raízes das espécies avaliadas foram considerados elevados. Apesar de, esses elementos, serem considerados essenciais às plantas, participando de funções estruturais e metabólicas, quando presentes em elevadas concentrações podem causar prejuízos ao consumidor final, seja ele animal ou humano.

O elemento ferro (Fe) é considerado essencial para todas as plantas devido ao seu papel no processo de fotossíntese das plantas, no desenvolvimento de cloroplastos e na biossíntese da clorofila (Olowoyo et al., 2012). No corpo humano o Fe é necessário como um catalisador e que contém hemoglobina. Nas MSPA das plantas de Alcachofra e Manjeriço e na MSR do alecrim os teores de ferro na não diferiram entre os tratamentos. Contudo, os teores de Fe na MSPA das plantas de Alecrim cultivadas nas amostras S4, S5 e solo natural foram 25,6; 88,6 e 27,7% maiores que na amostra S3. Nas plantas de Alcachofra o teor de Fe na MSR foi menor na amostra S5, não diferindo nos demais tratamentos e as plantas de Manjeriço cultivadas na amostra S3 apresentaram o menor teor de Fe na MSR. Dentre as espécies medicinais estudadas, não se observaram diferenças nos teores de Fe na MSPA das plantas cultivadas na amostra S3. Na amostra S4 os maiores teores de Fe foram

observados no Manjerição e no Alecrim. Nas amostras S5 e solo natural os maiores teores desse elemento foram observados na MSPA do Alecrim. Os teores de Fe na MSR das plantas cultivadas não apresentaram diferenças, exceto no tratamento solo natural onde o Alecrim apresentou o menor teor (Tabela 19).

Os teores de Fe variaram entre espécies e solo, observando-se os maiores valores na MSPA da Alcachofra nas plantas cultivadas na amostra S3 (539 mg kg⁻¹), no Manjerição na amostra S3 (327 mg kg⁻¹) e no Alecrim na amostra S5 (870 mg kg⁻¹). Contudo, na MSR os maiores valores foram observados nas plantas de Alcachofra cultivadas no solo natural (4674 mg kg⁻¹), nas de Manjerição cultivadas no solo natural (4108 mg kg⁻¹) e nas plantas de Alecrim cultivadas na amostra S5 (2917 mg kg⁻¹).

Os teores mais elevados de zinco (Zn) na MSPA e na MSR da Alcachofra, Manjerição e Alecrim foram observados na amostra S3, seguidos dos demais solos (Tabela 19). Dentre as espécies estudadas, os maiores teores de Zn na MSPA das plantas cultivadas na amostra S3, foram observados no Manjerição, seguido da Alcachofra e do Alecrim. Na amostra S4, o maior teor de Zn na MSPA foi observado no Manjerição, seguido da Alcachofra e Alecrim que não diferiram entre si. Nas amostras S5 e solo natural não se observaram diferenças nos teores de Zn na MSPA das espécies medicinais avaliadas. Os teores de Zn na MSR não diferiram entre as espécies, exceto na amostra S3, que apresentou teores mais elevados no Manjerição, seguido Alecrim e da Alcachofra. (Tabela 19).

De acordo com um relatório apresentado por Ajasa et al. (2004) o valor de Zn de produtos agrícolas não deve exceder 200 mg kg⁻¹, com uma ingestão de 150 mg kg⁻¹ (Hashmi et al., 2007). Contudo, as plantas de Alcachofra, Manjerição e Alecrim cultivados na amostra S3, apresentaram teores de Zn na parte aérea em torno de 765, 1.024 e 293 mg kg⁻¹ e nas raízes em torno de 788, 2.087 e 1.662 mg kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 19. Micronutrientes na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).

Amostra de solo	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni
	mg kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	Parte aérea					Raiz				
	Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i>)					Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i>)				
S3	538,6 aA	765,0 aB	13,3 aB	63,0 bA	1,6 aA	2929,5 abA	788,3 aC	96,1 aB	64,7 bAB	4,4 aB
S4	190,5 aB	33,6 cB	7,6 bB	90,5 bA	0,6 bB	3240,9 abA	30,8 bB	31,0 bA	152,1 aA	3,0 aB
S5	182,1 aB	306,5 bA	6,6 bB	70,8 bA	0,6 bB	2184,7 bA	257,1 bA	21,8 bB	95,7 abA	4,6 aB
Solo natural	160,0 aB	46,4 cA	3,8 bB	226,6 aA	1,1 abB	4674,0 aA	34,1 bA	9,5 bA	114,0 abA	8,5 aA
	Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)					Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>)				
S3	326,5 aA	1023,5 aA	18,4 aA	73,4 aA	1,9 aA	1990,7 bA	2087,1 aA	124,6 aA	45,8 bB	9,3 aB
S4	272,0 aAB	351,8 bA	14,7 aA	95,5 aA	1,3 aA	2144,1 abA	563,0 bA	20,4 cA	75,3 abB	12,9 aAB
S5	268,8 aB	54,7 cB	16,8 aA	112,2 aA	1,7 aA	3835,1 abA	53,1 cA	70,4 bA	146,0 aA	8,8 aAB
Solo natural	190,8 aB	55,1 cA	10,0 bA	136,0 aB	1,8 aA	4108,1 aA	67,8 cA	23,0 cA	117,1 abA	20,6 aA
	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)					Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)				
S3	461,4 bA	293,2 aC	11,3 abB	76,0 aA	1,5 bA	2102,6 aA	1661,9 aB	145,5 aA	131,8 aA	32,3 aA
S4	579,8 abA	121,0 bB	8,7 bB	89,4 aA	1,6 bA	2018,6 aA	472,0 bA	28,4 cA	167,9 aA	24,0 aA
S5	870,4 aA	39,7 bB	16,0 aA	88,3 aA	1,6 bA	2917,0 aA	50,5 cA	55,6 bA	149,0 aA	25,6 aA
Solo natural	589,3 abA	51,9 bA	10,1 bA	117,0 aB	2,3 aA	1953,0 aB	69,4 cA	13,3 cA	151,9 aA	27,0 aA
C.V. (%)	60,95	31,24	20,69	41,41	26,77	42,06	31,37	25,65	39,68	89,00

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada espécie medicinal e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre espécies dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação.

O cobre (Cu) é considerado um micronutriente para as plantas e também desempenha um papel importante na assimilação de CO₂ e na síntese de ATP (Olowoyo et al., 2012). Entretanto, Stadtman & Olivier (1991) relataram que a exposição das plantas ao excesso de cobre pode gerar estresse oxidativo, que por sua vez pode causar perturbação das vias metabólicas e danos às macromoléculas.

O teor de cobre na MSPA e na MSR da Alcachofra cultivada na amostra S3 foi maior que nos demais solos. Os teores do elemento Cu na MSPA do Manjeriço, não diferiu entre os solos estudados, exceto no solo natural onde se observou o menor teor. O teor de Cu na raiz do Manjeriço foi maior na amostra S3, seguido da amostra S5 e dos demais solos. Na cultura do Alecrim os maiores teores de Cu na MSPA foram encontrados nas plantas cultivadas nas amostras S3 e S5, sendo os menores teores observados nas amostras S4 e solo natural. Contudo, os teores de Cu na MSR do Alecrim foram maiores na amostra S3. Dentre as espécies medicinais os teores de cobre mais elevados na MSPA foram observados nas plantas de Manjeriço e na MSR no Manjeriço e Alecrim (Tabela 19).

Os teores de Cu na parte aérea da Alcachofra, Manjeriço e Alecrim cultivados na amostra S3, foram de 13, 18 e 11 mg kg⁻¹, sendo considerados muito elevados quando comparados com o padrão da WHO, de 15 mg kg⁻¹, embora os valores para a Alcachofra e Alecrim ainda estejam dentro do limite. Na massa seca da raiz, os valores foram considerados muito altos, sendo de 96, 125 e 146 mg kg⁻¹ (Tabela 19). A ingestão excessiva de Cu em humanos pode causar hemólise e efeitos nefrotóxicos. A ingestão contínua de cobre a partir de alimentos pode induzir a intoxicação crônica por cobre no homem (Olowoyo et al., 2012).

Os teores de manganês (Mn) na MSPA da Alcachofra foram maiores no solo natural, seguido dos demais solos e na MSR o menor teor foi observado na amostra S3, seguido dos demais tratamentos. Na MSPA do Manjeriço não se observaram diferenças significativas nos teores de Mn, contudo na MSR os maiores teores foram nas amostras de solo S4, S5 e solo natural. Na MSPA e na MSR do Alecrim não foram observadas diferenças significativas nos teores de Mn (Tabela 19). Dentre as espécies cultivadas no mesmo solo, apenas a

Alcachofra cultivada no solo natural acumulou mais Mn na MSPA que as outras espécies. Nos demais solos não se observaram diferenças significativas. Na variável MSR nas amostras S3 e S4, a Alcachofra e o Alecrim apresentaram os maiores teores de Mn (Tabela 19). Esta resposta das plantas pode ser devido à concentração deste elemento no solo. Contudo, na MSR as concentrações de Mn entre solos e plantas não seguiram um padrão.

Os teores de níquel (Ni) na MSPA das espécies medicinais variaram entre 0,6 (Alcachofra – amostras S4 e S5) a 2,3 mg kg⁻¹ (Alecrim – Solo natural), e na raiz os teores variaram entre 3,0 (Alcachofra – amostra S5) e 32,3 mg kg⁻¹ (Alecrim – amostra S3). Os teores mais elevados de Ni foram observados na MSR do Alecrim (Tabela 19). Olowoyo et al. (2012) observaram teores de Ni na parte aérea e raízes de *A. spinosus* variando entre 4,36 e 15,78 mg kg⁻¹. O Ni em excesso no solo pode causar alterações fisiológicas e diversos sintomas de toxicidade, como clorose e necrose em diferentes espécies de plantas (Rahman et al., 2005). Entretanto, o Ni é um constituinte da urease, e pequenas quantidades de Ni (0,01 a 5 mg kg⁻¹), são essenciais para algumas espécies de plantas (Seregin & Kozhevnikova, 2006).

Os teores de níquel na MSPA da alcachofra foram maiores nas amostras S3 e solo natural, seguidos das amostras S4 e S5, porém na MSR não se observaram diferenças entre os tratamentos. Nas plantas de Manjericão não se observou diferença entre os teores de Ni na MSPA e na MSR e na cultura do Alecrim o maior teor de Ni foi observado nas plantas cultivadas no solo natural, contudo as concentrações de Ni na MSR não diferiram entre os tratamentos (Tabela 19).

4.4.4 Teores de metais pesados na fitomassa

Na Tabela 20 estão apresentados os teores de metais pesados na massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas medicinais.

Tabela 20. Metais pesados na massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de espécies vegetais medicinais após o cultivo em solos contaminados por metais pesados (S3; S4 e S5) e solo não contaminado (Solo natural).

Amostra de solo	mg kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	Cd	Cr	Pb	As	Ba	Cd	Cr	Pb	As	Ba
	<i>Parte aérea</i>					<i>Raiz</i>				
	<i>Alcachofra (Cynara scolymus)</i>					<i>Alcachofra (Cynara scolymus)</i>				
S3	6,2 aA	2,0 aA	20,7 aA	2,2 aA	283,4 aA	3,8 aC	5,5 aB	144,4 aB	3,7 A	177,9 aA
S4	0,3 cA	0,9 aB	nd	nd	279,0 aA	nd	5,0 aA	3,8 bA	nd	136,7 aB
S5	3,4 bA	1,0 aB	nd	nd	230,2 bA	1,7 abA	4,5 aA	9,6 bA	nd	167,3 aB
Solo natural	0,3 cA	1,3 aB	nd	nd	104,4 cA	0,2 bA	13,5 aA	2,6 bA	nd	65,9 bB
	<i>Manjeriço (Ocimum basilicum)</i>					<i>Manjeriço (Ocimum basilicum)</i>				
S3	1,6 aB	3,2 aA	4,7 aC	nd	158,6 aB	22,0 aA	16,4 aAB	153,2 aB	nd	87,6 aB
S4	1,2 abA	2,6 aA	nd	nd	187,6 aB	8,0 bA	18,3 aA	14,3 bA	nd	113,8 aB
S5	0,6 bB	2,8 aA	nd	nd	176,5 aB	1,0 cA	14,8 aA	5,4 bA	nd	135,6 aB
Solo natural	0,1 bA	2,5 aB	nd	nd	74,3 bAB	0,7 cA	35,5 aA	4,1 bA	nd	94,7 aAB
	<i>Alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>					<i>Alecrim (Rosmarinus officinalis)</i>				
S3	0,9 aB	1,9 bA	13,1 aB	1,6 aB	81,7 abC	17,5 aB	47,8 aA	192,5 aA	2,2 aB	195,5 bA
S4	0,7 aA	2,4 bA	2,6 bA	0,7 cA	88,1 aC	5,1 bB	39,1 aA	12,6 bA	1,7 aA	279,2 aA
S5	0,4 aB	2,3 bAB	1,1 bA	1,3 bA	100,5 aC	1,3 cA	32,2 aA	4,4 bA	2,3 aA	232,9 abA
Solo natural	0,4 aA	4,1 aA	0,8 bA	0,9 cA	46,7 bB	1,2 cA	42,5 aA	1,9 bA	1,5 aA	129,2 cA
C.V. (%)	51,16	40,56	45,21	27,30	16,55	34,15	98,00	49,70	90,00	23,00

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si entre os tratamentos dentro de cada espécie medicinal e de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre espécies dentro de cada tratamento pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C.V. – coeficiente de variação.

Na MSPA da Alcachofra os teores de cádmio foram maiores nas plantas cultivadas na amostra S3, seguido das amostras S5 e da S4 e solo natural. Na MSR os maiores teores foram observados nas plantas cultivadas nas amostras S3 e S5, seguidas do solo natural que teve a concentração abaixo do limite de detecção do método. Na MSPA do Manjericão as plantas cultivadas nas amostras S3 e S4 apresentaram os maiores teores de Cd, seguidos das cultivadas nas amostras de solo S5 e solo natural. Contudo, o maior teor de Cd na MSR foi observado na amostra S3, seguido da amostra S4 e dos demais tratamentos. Na MSPA do Alecrim não foram observadas diferenças entre os tratamentos, porém na MSR do Alecrim os teores de Cd foram maiores na amostra S3, seguido da amostra S4 e dos demais solos (Tabela 20).

Na Tabela 20 observou-se que os teores de Cd mais elevados na MSPA foram observados nas plantas de Alcachofra cultivadas nas amostras S3 e S5. Nos demais solos não houve diferença entre as culturas. Nas amostras S3 e S4 as plantas de Manjericão apresentaram os maiores teores de Cd na MSR e nos demais solos não se observou diferença.

O Cd esteve presente em elevadas concentrações nas folhas e raízes das espécies medicinais avaliadas. Nas plantas de Alcachofra o teor de Cd na MSPA variou entre 0,3 (Solo natural) e 6,2 mg kg⁻¹ (amostra S3) e na MSR entre 0,2 (Solo natural) e 3,8 mg kg⁻¹ (amostra S3). Nas plantas de Manjericão e Alecrim os teores na MSPA foram inferiores aos da Alcachofra variando entre 0,1; 0,4 (Solo natural) e 1,6; 0,9 mg kg⁻¹ (amostra S3), respectivamente, porém na MSR os valores superaram os da Alcachofra variando entre 0,7; 1,2 (Solo natural) e 22; 17,5 mg kg⁻¹ (amostra S3), respectivamente (Tabela 20). Portanto, esses valores se encontram muito acima dos teores máximos permissíveis preconizados pela Organização Mundial da Saúde - OMS (WHO, 1998), que determina teores de até 0,3 mg kg⁻¹ de Cd em materiais cru, sem processamento industrial. Annan et al. (2010) avaliaram os níveis de metais pesados em 27 espécies de plantas medicinais coletadas em seu habitat natural em Gana e concluíram que o Cd estava presente em todas as amostras. O cádmio é um dos metais pesados mais fitotóxicos porque é altamente solúvel em água e prontamente absorvido pelas plantas. Isso representa também a sua principal entrada na cadeia alimentar, tornando-se uma ameaça à saúde humana. Mesmo

em baixas concentrações, a absorção pelas raízes e transporte de Cd para órgãos vegetativos e reprodutivos têm um efeito negativo sobre a nutrição mineral, a homeostase, o crescimento e desenvolvimento (DalCorso et al., 2010).

Na MSPA da Alcachofra e Manjerição os teores de cromo (Cr) não diferiram entre os tratamentos, porém nas plantas de Alecrim cultivadas no solo controle se observou o maior teor de Cr na MSPA, seguido dos demais tratamentos. Na MSR das plantas medicinais não se observou diferença entre as concentrações de Cr (Tabela 20). O elemento cromo tem recebido relativamente pouca atenção dos cientistas talvez porque ele é onipresente no meio ambiente e, devido a sua complexidade eletroquímica, pois o Cr existe em muitos estados de oxidação sobre os quais depende a sua toxicidade (Shanker et al., 2005).

A OMS não estabelece teores máximos permissíveis para o Cr, contudo países como o Canadá, estabeleceram teores de até 2 mg kg^{-1} para produtos não industrializados e de $0,02 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o consumo do produto final industrializado (WHO, 2005). Nas plantas de Manjerição os teores de Cr na MSPA mantiveram-se dentro do limite estabelecido, contudo na MSR foi observado teor de Cr de $13,5 \text{ mg kg}^{-1}$ nas plantas cultivadas no solo natural. Entretanto, nas plantas de Manjerição e Alecrim os teores foram muito acima do estabelecido para material não industrializado, alcançando o dobro do teor estabelecido na MSPA do Alecrim cultivado no solo natural e $47,8 \text{ mg kg}^{-1}$ na MSR da raiz do Alecrim cultivado na amostra de solo S3 (Tabela 20).

Os teores de Cr na MSPA das plantas cultivadas na amostra S3 não diferiram entre si, porém nas amostras S4 e S5 as plantas de Manjerição e Alecrim apresentaram os maiores teores de Cr na MSPA e no solo natural as plantas de Alecrim. Os teores de Cr na MSR das plantas medicinais não diferiram, exceto nas cultivadas na amostra S3, onde o Manjerição e o Alecrim apresentaram os teores mais elevados (Tabela 20).

Na MSPA da Alcachofra e Manjerição somente foi detectada a presença do elemento chumbo (Pb) nas plantas cultivadas na amostra S3. Nos demais solos essas plantas apresentaram teores de Pb abaixo do limite de detecção do método. Na MSPA do Alecrim o maior teor de Pb foi observado nas plantas cultivadas na amostra S3, seguido dos demais solos. De acordo com DalCorso (2012), o chumbo (Pb) é um dos metais pesados mais abundantes, em

ambos os ambientes terrestres e aquáticos, predominantemente decorrentes das atividades humanas, tais como mineração, fundição, uso de combustíveis e explosivo, e do descarte de lodo de esgoto municipal enriquecido com Pb. Juntamente com cádmio, o chumbo também é considerado um dos mais perigosos para a saúde humana, uma vez que é facilmente absorvido pelas plantas e, portanto, pode facilmente entrar na cadeia alimentar. Na MSR da Alcachofra, Manjerição e Alecrim os teores de chumbo foram maiores nas plantas cultivadas nas amostras S3, seguido dos demais solos que não diferiram entre si (Tabela 20).

O teor máximo permissível para o elemento Pb em materiais vegetais crus ou não industrializados, preconizado pela OMS (WHO, 2005) é de 10 mg kg⁻¹, contudo esse limite é de 20 mg kg⁻¹ na China e de 30 mg kg⁻¹ na Coréia. Observou-se que as plantas de Alcachofra, Manjerição e Alecrim cultivadas em solo com alta concentração de Pb (amostra S3) apresentaram teores de Pb na MSPA de aproximadamente 21; 5 e 13 mg kg⁻¹, respectivamente e nas raízes de 144; 153 e 193 mg kg⁻¹, respectivamente (Tabela 20).

Nos demais solos, com menores concentrações de chumbo, os teores nas plantas, tanto na parte aérea quanto na raiz, foram abaixo do limite estabelecido pela OMS. Portanto, a escolha consciente do local juntamente com o manejo do solo adequado pode reduzir a absorção de metais pesados pelas plantas medicinais (Chaiyarat et al., 2011) evitando-se o risco de exposição e contaminação por Pb via cadeia alimentar.

O arsênio (As) é um metalóide tóxico que se origina a partir de ambos, fontes geogênicas e atividades antrópicas, como a mineração, a queima de combustíveis fósseis, e uso de pesticidas à base de As e conservantes de madeira. Na MSPA e na MSR da Alcachofra somente foram observados teores de As de 2,2 e 3,7 mg kg⁻¹, respectivamente, nas plantas cultivadas na amostra de solo S3. Na MSPA e na MSR das plantas de Manjerição os teores de As foram abaixo do limite de detecção do método em todos os tratamentos. Contudo, na MSPA do Alecrim, os teores de As foram maiores nas plantas cultivadas na amostra de solo S3 (1,6 mg kg⁻¹), seguida das cultivadas na amostra S5 e por último nos demais tratamentos. Na MSR do Alecrim os teores de As não diferiram entre os tratamentos (Tabela 20), estando esses teores abaixo do limite

estabelecido pelo Canadá para produtos não industrializados (5 mg kg^{-1}) de acordo com WHO (2005).

O bário (Ba) é um metal alcalino naturalmente presente nos solos e relativamente em altas concentrações (Suwa et al., 2008). Algumas pesquisas mostraram provável toxicidade do Ba em plantas, mas tais estudos eram de curto prazo e realizados em solução nutritiva (Suwa et al., 2008; Llugany et al., 2000). Nas plantas de Alcachofra os teores de Ba na MSPA variaram entre 104 e 283 mg kg^{-1} e na MSR os teores foram menores, variando entre aproximadamente 66 e 178 mg kg^{-1} no solo natural e na amostra S3, respectivamente. Nas plantas de Manjeriço estes valores foram menores tanto na MSPA quanto na MSR. Contudo, na MSPA do Alecrim os teores de Ba variaram aproximadamente entre 47 (solo natural) e 101 mg kg^{-1} (amostra S5) e na MSR o maior teor de Ba (279 mg kg^{-1}) foi observado nas plantas cultivadas na amostra S4 (Tabela 20). Na maior parte das plantas, a concentração de Ba varia de 4 a 50 mg kg^{-1} (Chaudhry et al., 1977), e as concentrações de 200 e 500 mg kg^{-1} são considerados ligeiramente tóxica ou tóxica, respectivamente (Pais & Jones, 1997).

Em geral, as plantas de Alcachofra (*Cynara scolymus*), Manjeriço (*Ocimum basilicum*) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) permaneceram vivas quando cultivadas em solos com diferentes concentrações de metais pesados e não apresentaram sintomas visuais de toxicidade nas folhas, portanto os sintomas visuais de fitotoxicidade das plantas medicinais não podem garantir a segurança quanto a contaminação, principalmente quando as atividades agrícolas são realizadas próximas a áreas contaminadas (Olowoyo et al., 2012), pois os metais pesados podem entrar em plantas medicinais ativamente ou passivamente (Annan et al., 2010; Kumar et al., 2011).

De acordo com Sarma (2011); Sharma et al. (2009), um elevado número de espécies vegetais tem sido utilizado com o propósito da fitorremediação, porém, o acúmulo de metais pesados em plantas comestíveis e/ou medicinais, ainda necessita de investigações minuciosas para evitar que concentrações elevadas de metais pesados cheguem ao consumidor final.

Das espécies medicinais avaliadas, nenhuma delas poderia ser recomendada para o cultivo na área estudada, devido ao risco da contaminação de seres humanos com a entrada dos metais pesados na cadeia trófica pela ingestão direta das partes comestíveis das espécies medicinais ou através de

extratos oriundos dessas. Portanto, o conhecimento das características químicas do solo, o comportamento das culturas nos solos, assim como o histórico da área são imprescindíveis para o cultivo de plantas medicinais e comestíveis. Por outro lado, a dependência de plantas coletadas diretamente na natureza, não só provoca, uma ameaça para a biodiversidade vegetal medicinal (Grace, 2011), mas também eleva o risco com relação à segurança, devido ao crescimento industrial que tem contaminado os lençóis freáticos e os solos (Zhuang et al., 2009).

5. CONCLUSÕES

1. Nenhuma das plantas espontâneas nativas estudadas oriundas da área contaminada é caracterizada como hiperacumuladora de metais pesados.

2. As espécies vegetais espontâneas identificadas fitoextraem e/ou fitoestabilizam os metais Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Pb, Cr, Ba e o metalóide As.

3. Bactérias isoladas da rizosfera de plantas espontâneas em área contaminada por metais são adaptadas a elevadas concentrações de chumbo.

4. A biorremediação de chumbo e o crescimento microbiano são dependentes da temperatura, pH inicial e da concentração inicial de chumbo.

5. Os isolados não crescem em pH 3,5 e 4,0 e alcalinizam o meio, elevando o pH na faixa entre 6,5 e 7,0.

6. Os isolados são bactérias gram negativas, incapazes de solubilizar fosfato e produtoras de ácido indol-3-acético (AIA) e sideróforos.

7. As plantas de mucuna inoculadas com isolados bacterianos crescem em solos com elevadas concentrações de Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Pb, Cr, Ba e As simultaneamente e, não apresenta sintomas visuais de fitotoxidez.

8. A mucuna inoculada com isolados bacterianos é eficiente em extrair e/ou estabilizar os micronutrientes Fe, Zn, Cu, Mn e Ni e os metais e metalóide Cd, Pb, Cr, Ba e As em solos contaminados a mais de 40 anos e, é considerada uma hiperacumuladora de Cu e Zn.

9. As plantas de Alecrim e Manjerição não apresentam sintomas visuais de fitotoxicidade em solos com altas concentrações de Zn, Cu, Mn, Ni, Cd, Cr, Pb, As e Ba, estando os teores acima das preconizadas pela Organização Mundial da Saúde em material vegetal para consumo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C.A. et al. Organic matter and barium absorption by plant species grown in an area polluted with scrap metal residue. **Applied and Environmental Soil Science**, Nasr City, v.2012, p.1-7, 2012.
- ADESODUN, J.K. et al. Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v.207, p.195–201, 2010.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Case studies in environmental medicine – lead toxicity**. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1992.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Toxicological profile for lead**. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1999.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of freeliving rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. **Microbiological Research**, Pavia, v.163, p.173-181, 2008.
- AJASA, M.A. et al. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. **Food Chemistry**, New York, v. 85, p.67–71, 2004.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, Oxford, v.91, p.869-881, 2013.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 339p.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. London: Blackie Academic, 1995. 368p.
- ALLOWAY, B.J.; AYERS, D.C. **Chemical principles of environmental pollution**. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. 395p.
- ALLOWAY, B.J.; JACKSON, A.P.; MORGAN, H. The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.91, p.223-236, 1990.

- AMARAL SOBRINHO, N.M.B. **Interação dos metais pesados de resíduos siderúrgicos com um solo podzólico vermelho-amarelo**. 1993. 163f. Tese (Doutorado) - Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, 1993.
- ANDREAZZA, R. et al. Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.408, p.1501–1507, 2010.
- ANDREAZZA, R. et al. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.42, n.1, p.66-74, 2011.
- ANDREAZZA, R.; et al. Characterization of copper-resistant rhizosphere bacteria from *Avena sativa* and *Plantago lanceolata* for copper bioreduction and biosorption. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.146, p.107-115, 2012.
- ANDREAZZA, R. et al. Biosorption and bioreduction of copper from different copper compounds in aqueous solution. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.152, p.411-416, 2013.
- ANDREAZZA, R. et al. Use of high-yielding bioenergy plant castor bean (*Ricinus communis* L.) as a potential phytoremediator for copper-contaminated soils. **Pedosphere**, Beijing, v.23, p.651-661, 2013.
- ANNAN, K. et al. Profile of heavy metals in some medicinal plants from Ghana commonly used as components of herbal formulations. **Pharmacognosy Research**, Mumbai, v.2, p.41-44, 2010.
- ARAÚJO, W.S. et al. Relação entre adsorção de metais pesados e atributos químicos e físicos de classes de solos do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 17-27, 2002.
- ARIENS, E.J.; LEHMANN, P.A.; SIMONIS, A.M. **Introducción a la toxicología general**. México: Ed. Diana, 1978. 337p.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4^{ed}. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science Publishing, 1997. 694p.
- BAIS, H.P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.57, p.233–266, 2006.
- BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.3, p.643-654, 1981.

- BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Washington, v.1, p.81-126, 1989.
- BAKER, A.J.M.; WHITING, S.N. In search of the Holy Grail – a further step in understanding metal hyperaccumulation? **New Phytology**, Oxford, v.155, p.1-7, 2002.
- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.36, p.87-90, 1986.
- BAREA, J.M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.1761-1778, 2005.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Phytoremediation: principles and perspectives. **Contributions to Science**, Catalonia, v.2, p.333-344, 2003.
- BARROW, N.J. Effects of time and temperature on the sorption of cadmium, zinc, cobalt, and nickel by a soil. **Australian Journal of Soil Research**, Ottawa, v.36, p.941-50, 1998.
- BARRUTIA, O. et al. Native plant communities in an abandoned Pb–Zn mining area of northern Spain: implications for phytoremediation and germplasm preservation. **International Journal of Phytoremediation**, New Haven, v.13, p.256-270, 2011.
- BARTENFELDER, D. Stabilization: a strategy for RCRA corrective action. In: RCRA Corretive Action Stabilization Technologies: proceedings. Washington: USEPA, 1992. p.1-9.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.30, p.1225-1228, 1998.
- BECERRA-CASTRO, C. et al. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: a description of the plant–microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.217– 218 p.350– 359, 2012.
- BECH, J. et al. Accumulation of Pb and Zn in *Bidens triplinervia* and *Senecio* sp. spontaneous species from mine spoils in Peru and their potential use in phytoremediation. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v.123, p.109-113, 2012.
- BELLINGER, D.C. Interpreting the literature on lead and child development: the neglected role of the experimental system. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v.17, n.3, p. 201-212, 1995.

- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, London, v.17, p.478-486, 2012.
- BHATTACHARJEE, S.; KAR, S.; CHAKRAVARTY S. Mineral compositions of datura: a traditional tropical medicinal plant. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.35, p.937–946, 2004.
- BIDAR, G. et al. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: plant metal concentration and phytotoxicity. **Environmental Pollution**, London, v.147, p.546-553, 2007.
- BIONDI, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. 2008. 170f. Tese (Doutorado) - Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, 2008.
- BORREMANS, B. et al. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.183, p.5651-5658, 2001.
- BRAUD, A. et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr and Pb contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v.74, p.280-286, 2009.
- BRUINS, M.R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.45, p.198-207, 2000.
- BRUSCHI, M. GOULHEN, F. New bioremediation technologies to remove heavy metals and radionuclides using Fe(III), sulfate- and sulfur- reducing bacteria. In: S.N. SINGH; R.D. TRIPATHI (Ed.). **Environmental Bioremediation Technologies**. New York: Springer, 2007. p.35-56.
- CABRAL, J.P.; MARQUES, C. Faecal coliform bacteria in Febros river (Northwest Portugal): Temporal variation, correlation with water parameters, and species identification. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v.118, p.21-36, 2006.
- CALÓGERAS, P. **As Minas do Brasil e sua legislação: geologia econômica do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1938. 507p.
- CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F.; CASAGRANDE, J.C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos. In: FERREIRA, M.E. et al. (Ed.) **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. Cap. 5, p.89-124.
- CAMARGO, F.A.O. et al. Uso de microrganismos para remediação de metais. In: CERETTA, C.A.; SILVA, L.S.; REIHCERT, J.M. (Ed.). **Tópicos Especiais em Ciência do Solo**. Viçosa: Editora SBCS, 2007. v. 5, p.468- 496.

- CARRILLO-CASTAÑEDA, G. et al. Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.26, p.1801-1814, 2003.
- CENTENÁRIO Lavras do Sul - CLS. Organizado por Comissão Central das Comemorações do Centenário de Lavras do Sul. Bagé: Quadra, 1982.
- CETESB. **Lista Holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea.** São Paulo, 1999. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf> Acesso em: 10 ago. 2013.
- CETESB. **Relatório de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001.** São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/media/files/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf> Acesso em: 10 ago. 2013.
- CHAIYARAT, R. et al. Effects of soil amendments on growth and metal uptake by *Ocimum gratissimum* growth in Cd/Zn-contaminated soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.214, p.383-392, 2011.
- CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v.46, p.186-195, 2006.
- CHATTERJEE, S. et al. Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Delaware, v.3, p.290-295, 2012.
- CHAUDHRY, F.M.; WALLACE, A.; MUELLER, R.T. Barium toxicity in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.8, n.9, p.795-797, 1977.
- CHEHREGANI, A., NOORI, M., YAZDI, H.L. Phytoremediation of heavy metalpolluted soils: screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.72, p.1349-1353, 2009.
- CHEN, Y.P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Belfield, v.34, p.33-41, 2006.
- CHERIAN, S.; OLIVEIRA, M.M. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.39, p. 9377-9390, 2005.

- CHRISTENSEN, T.H. Cadmium soil sorption at low concentrations; I. Effect of time, cadmium load, pH, and calcium. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.21, p.105-114, 1984.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10^a Ed. Porto Alegre: Núcleo Regional Sul/SBCS, 2004. 400p.
- COMPANT, S. et al. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Ghent, v.71, p.4951-4959, 2005.
- DALCORSO, G. Heavy metal toxicity in plants. In: A. FURINI (Ed.). **Plants and Heavy Metals**. Berlin: Springer, 2012. p.1-26. (Springer Briefs in Biometals)
- DALCORSO, G.; FARINATI, S.; FURINI, A. Regulatory networks of cadmium stress in plants. **Plant Signaling & Behavior**, New Jersey, v.5, p.663-667, 2010.
- DATTA, R.; QUISPE, M.A.; SARKAR, D. Greenhouse study on the phytoremediation potential of Vetiver Grass, *Chrysopogon zizanioides* L., in arsenic-contaminated soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.86, p.124-128, 2011.
- DIELS, L.; SADOUK, A.; MERGEAY, M. Large plasmids governing multiple resistance to heavy metals: a genetic approach. **Toxicological & Environmental Chemistry**, United Kingdom, v.23, p.79-89, 1989.
- DIMKPA, C.O. et al. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, Oxford, v.74, p.19-25, 2008.
- DIMKPA, C.O. et al. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.41, p.154-162, 2009a.
- DIMKPA, C.O. et al. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.107, p.1687–1696, 2009b.
- DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.212, p.155-164, 1999.
- DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Watford, v.35, p.135–142, 1999.

- ELEUTÉRIO, L. **Diagnóstico da situação ambiental da cabeceira da Bacia do rio Doce, MG, no âmbito das contaminações por metais pesados em sedimentos de fundo**. 1977. 137f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto, 1977.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2013. 353p.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, 2011.
- FITZ, W.J.; WENZEL, W.W. Arsenic transformation in the soil–rhizosphere–plant system, fundamentals and potential application of phytoremediation. **Journal of Biotechnology**, Amstredam, v.99, p.259-78, 2002.
- GERMAINE, K. J.; MCGUINNESS, M.; DOWLING, D. N. Improving phytoremediation through plant-associated bacteria. In: BRUIJN, F. J. DE (Ed.). **Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere**: Volume 1. 2ª ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p.963-974.
- GIONGO, A. et al. Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.361-369, 2010.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.109-114, 1995.
- GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.28, p.367-374, 2010.
- GOMES, M. P. et al. Phosphorus improves arsenic phytoremediation by alleviating induced oxidative stress. **International Journal of Phytoremediation**, New Haven, v.15, p.633-646, 2013.
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.26, p.192-195, 1951.
- GOVINDASAMY, C. et al. Concentration of heavy metals in seagrasses tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. **International Journal of Environmental Sciences**, New Delhi, v.2, p.145-153, 2011.
- GOYAL, N.; JAIN, S.C.; BANERJEE, U.C. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. **Advances in Environmental Research**, Daejeon, v.7, n.2, p.311-319, 2003.
- GOYER, R.A. Toxic Effects of Metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**, New York: McGraw Hill, 1996. p.691-736.

- GRACE, O.M. Current perspectives on the economic botany of the genus *Aloe* L. (Xanthorrhoeaceae). **South African Journal of Botany**, Grahamstown, v.77, p.980–987, 2011.
- GRAZIA, C.A.; PESTANA, M.H.D. Contaminação por mercúrio antrópico em solos e sedimentos de corrente de Lavras do Sul, RS, Brasil. In: SILVA, C.R. et al. (Ed.). **Geologia Médica no Brasil: efeitos dos materiais e fatores geológicos na saúde humana e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CPRM, 2006. p.140-147.
- GREGOR, M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants - from biomolecules to ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p.1–27.
- GRČMAN, H. et al. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.235, p.105-114, 2001.
- HAN, J. et al. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, p.66-76, 2005.
- HART, J.J. et al. Zinc effects on cadmium accumulation and partitioning in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration. **New Phytologist**, Cambridge, v.167, p.391-401, 2005.
- HASHMI, D.S.; ISMAIL, S.; SHAIKH, G.H. Assessment of the level of trace metals in commonly edible vegetables locally available in the markets of Karachi city. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.39, p.747-751, 2007.
- HE, Z. et al. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.163, p.869-873, 2009.
- HERMAN, R.P. et al. Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. **Applied and Environmental Microbiology**, Ghent, v.59, p.3021-3026, 1993.
- HILDA, R.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, p.319–339, 1999.
- HOUSHMANDFAR, A.; MORAGHEBI, F. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower. **African Journal of Agricultural Research**, Embu, v.6, p.1463–1468, 2011.

- HURST, C.J. An introduction to viral taxonomy and the proposal of Akamara, a potential domain for the genomic acellular agents. In: HURST, C.J. (Ed.) **Viral ecology**. San Diego: Academic Press, 2002. p.41–62.
- HUSSAINE, M.A.; SALLEH, A.; MILLOW, P. Characterization of the adsorption of lead (II) by the nonliving biomass *Spirogyra neglecta* (Hasall) Kutzing. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.5, p.75-83, 2009.
- HUTCHINSON, T.C.; SYMINGTON, M.S. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v.58, p.323-330, 1997.
- IDRIS, R. et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Ghent, v.70, p.2667-2677, 2004.
- IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, 165 – Inorganic lead**. Geneva: World Health Organization (WHO), 1995. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>>. Acesso em: 15 jul 2013.
- IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, 61 - Chromium**. Geneva: World Health Organization (WHO), 1988. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm>>. Acesso em: 15 jul 2013.
- IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, 134 - Cadmium**. Geneva: World Health Organization (WHO), 1992. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>>. Acesso em: 13 jul 2013.
- IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, 224 - Arsenic and Arsenic Compounds**. Geneva: World Health Organization (WHO), 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>>. Acesso em: 15 jul 2013.
- JADIA, C.D.; FULEKAR, M.H. Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. **Environmental Engineering and Management Journal**, Iasi, v. 7, p. 547–558, 2008.
- JADIA, C.D.; FULEKAR, M.H. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, p.921–928, 2009.

- JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M.; WILLIAMS, P.L. **General Principles of Toxicology**. In: **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. p.1-34.
- Jl, G.L.; LI, H.Y. Electrostatic adsorption of cations. In: YU, T.R. (Ed.). **Chemistry of variable charge soils**. New York: Oxford University Press, 1997. p.65-79.
- JING, Y.; HE, Z.; YANG, X. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v.8, p.192-207, 2007.
- JIMÉNEZ, M.N. et al. Potential use in phytoremediation of three plant species growing on contaminated mine-tailing soils in Sardinia. **Ecological Engineering**, Oxford, v.37, p.392-398, 2011.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3^a ed. Florida: Boca Raton, CRC Press, 2001. 413p.
- KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue. **Geoderma**, Amsterdam, v.122, p.143-149, 2004.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.5, p.79-85, 1959.
- KEFALA, M.I.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A. Biosorption of cadmium ions by actinomycetes and separation by flotation. **Environmental Pollution**, London, v.104, p.283–293, 1999.
- KELLER, C. **Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-metal contaminated sites**, In: MOREL, J.; GONCHAROVA, G.E.N. (Eds.), **Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils**. Springer, Netherlands, 2006. p.241-266,
- KELLY, R.A.; ANDREWS, J.C.; DEWITT J.G. An X-ray absorption spectroscopic investigation of the nature of the zinc complex accumulated in *Datura innoxia* plant tissue culture. **Microchemical Journal**, New York, v.71, p.231–245, 2002.
- KIDD, P. et al. Trace element behaviour at the root–soil interface: implications in phytoremediation. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.67, p.243–259, 2009.
- KING, L.D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.T.; FONTES, M.P.F. (Ed.). **O Solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa: Editora SBCS: UFV- DPS, 1996. p.823–836.

- KUFFNER, M. et al. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.304, p.35–44, 2008.
- KUMAR, A. et al. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. **International Journal of Environmental Sciences**, New Delhi, v.1, p.1079-1093, 2011.
- KUMAR, A.; BISHT, B.S.; JOSHI, V.D. Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste. **International Journal of Environmental Sciences**, New Delhi, v.2, n.2, p.896-908, 2011.
- KUMAR, C.S. et al. Standardization of anti-arthritic herbo-mineral preparation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, India, v.2, p.679–684, 2011.
- KUMARI, B.; SINGH, S.N. Phytoremediation of metals from fly ash through bacterial augmentation. **Ecotoxicology**, London, v.2, p.166–176, 2011.
- LADISLAS, S. et al. Potential of aquatic macrophytes as bioindicators of heavy metal pollution in urban stormwater runoff. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.223, p.877–888, 2012.
- LARINI, L. **Toxicologia**. 3^a ed. São Paulo: Editora Manole, 1997. 302p.
- LECLERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.55, p.201-234, 2001.
- LEVINSON, H.S.; MAHLER, I. Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.161, p.135-138, 1998.
- LEVINSON, H.S. et al. Lead resistance and sensitivity in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.145, p.421-425, 1996.
- LI, J.T. et al. Cadmium tolerance and accumulation in cultivars of a high-biomass tropical tree (*Averrhoa carambola*) and its potential for phytoextraction. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 39, p. 1262-1268, 2010.
- LIM, S.R.; SCHOENUNG, J.M. Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.177, p.251–259, 2010.
- LIM, T.T.; TAY, J.H.; THE, C.I. Contamination time effect on lead and cadmium fractionation in a tropical coastal clay. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.30, p.806-812, 2002.

- LIMA e SILVA, A.A. et al. Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43, n.4, p.1620-1631, 2012.
- LIMA, F.D.S. et al. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.44, p.234-241, 2013.
- LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. "Assessment of barium toxicity in bush beans," **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.39, n.4, p.440-444, 2000.
- LOCK, K.; JANSSEN, C.R. Influence of aging on metal availability in soils. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.178, p.1-21, 2003.
- LU, A.; ZHANG, S.; SHAN, X. Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. **Geoderma**, Amsterdam, v.125, p.225- 234, 2005.
- MA, L.Q.; RAO, G.N. Aqueous Pb reduction in Pb contaminated soils by Florida phosphate rocks. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.110, p.1-16, 1999.
- MA, Y. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.29, p.248-258, 2011.
- MACKAY, D. Correlation of bioconcentration factors. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.16, p.274-278, 1982.
- MAITI, S.K.; JAISWAL, S. Bioaccumulation and translocation of metals in the natural vegetation growing on fly ash lagoons: a field study from Santaldih thermal power plant, West Bengal India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v.136, p.355-370, 2008.
- MALUF, J.R.T.; MATZENAUER, R.; CAIAFFO, M.R. Análise da temperatura do solo desnudo a 5 cm de profundidade visando antecipação da semeadura de culturas de verão no estado do Rio Grande do Sul. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 9p. ilustr. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online 2). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci02.htm> Acesso em: 07 fev. 2013.
- MANSOUR, S.A.; GAD, M.F. Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: a novel bioassay method using *Daphnia magna* Straus. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v.48, p.377-389, 2010.
- MEHARG, A.A.; MACNAIR, M.R. Suppression of the phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.43, p.519-524, 1992.

- MEJÁRE, M.; BÜLOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.19, p.67–73, 2001.
- MELO, E.E.C.; NASCIMENTO, C.W.A.; SANTOS, A.C.Q. Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.1051-1060, 2006.
- MELO, E.E.C. et al. Disponibilidade e fracionamento de Cd, Pb, Cu e Zn em função do pH e tempo de incubação com o solo. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.776-784, 2008.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 5ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.
- MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Genesis, 2000. 173p.
- MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 2ª ed. Porto Alegre: Genesis, 2004. 290p.
- MILIC, D. et al. Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas. **Central European Journal of Biology**, Berlin, v.7, p.307-317, 2012.
- MIRE, C.E. et al. Lead precipitation by *Vibrio harveyi*: evidence for novel quorum-sensing interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Ghent, v.70, p.855-864, 2004.
- MORALES-BARRERA, L. et al. Isolation, identification and characterization of a *Hypocrea tawa* strain with high Cr(VI) reduction potential. **Biochemical Engineering Journal**, United Kingdom, v.40, p.284-292, 2008.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªed. atual. e ampl. Lavras: Ufla, 2006. 729p.
- MOSSEL, D.A.A. et al. **Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies**. New York: J. Wiley, 1995. 699p.
- MURTHY, S.; BALI, G.; SARANGI, S.K. Biosorption of lead by *Bacillus cereus* isolated from industrial effluents. **British Biotechnology Journal**, West Bengal, v.2, p.73-84, 2012.
- NAIK, M.M.; DUBEY, S.K. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.98, p.1-7, 2013.
- NASCIMENTO, C.W.A; AMARASIRIWARDENA, D.; XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction

of metals from a multi-metal contaminated soil. **Environmental Pollution**, London, v.140, p.114-123, 2006.

NESLER, A.; FURINI, A. Phytoremediation: the utilization of plants to reclaim polluted sites. In: A. FURINI (Ed.). **Plants and Heavy Metals**, Berlin: Springer, 2012. p.75–86. (Springer Briefs in Biometals)

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.51, p.730-750, 1999.

NIES, D.H.; SILVER, S. Ion efflux system involved in bacterial metal resistances. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.14, p.186-199, 1995.

NOWELL, L.H.; CAPEL, P.D.; DILEANIS, P.D. **Pesticides in Stream Sediment and Aquatic Biota - Distribution, Trends, and Governing Factors**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 1040p. (Pesticides in the Hydrologic System series, v.4)

NWAICHI, E.O.; NYEIKE E.N. Cu Tolerance and Accumulation by *Centrosema Pubescens* Benth and *Mucuna Pruriens* Var *Pruriens*. **Archives of Applied Science Research**, India, v.2, p.238-247, 2010.

OLIVEIRA, L.M. et al. Effects of arsenate, chromate, and sulfate on arsenic and chromium uptake and translocation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.. **Environmental Pollution**, London, v.184, p.187-192, 2014.

OLIVEIRA, T.S.; COSTA, L.M. Metais pesados em solos de uma topolitossequência do Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.785-796, 2004.

OLIVEIRA, F.C.; MATTIAZZO, M.E. Mobilidade de metais pesados em um latossolo amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, São Paulo, v.58, n.4, p.807-812, 2001.

OLOWOYO, J.O. et al. Uptake and translocation of heavy metals by medicinal plants growing around a waste dump site in Pretoria, South Africa. **South African Journal of Botany**, Grahamstown, v.78, p.116–121, 2012.

PAIS, I.; JONES, J.R. **The Handbook of Trace Elements**. Boca Ratón: St. Lucie Press, USA, 1997. 240p.

PANDEY, V.C. Phytoremediation of heavy metals from fly ash pond by *Azolla caroliniana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.82, p.8-12, 2012.

PARK, J.H. et al. Bacterial-assisted immobilization of lead in soils: implications for remediation. **Pedologist**, Japan, p.162-174, 2011.

- PESTANA, M.H.D.; FORMOSO, M.L.L. Mercury contamination in Lavras do Sul, south Brazil: a legacy from past and recent gold mining. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.305, p.125-140, 2003.
- PETRONI, S.L.G. **Estudos de adsorção de zinco e cádmio em turfa. Potencialidade de utilização de um bioadsorvedor natural em sistemas de tratamento de efluentes**. 1999. 99f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo - São Paulo, 1999.
- PONGRAC, P. et al. At the crossroads of metal hyperaccumulation and glucosinolates: is there anything out there?. In: I. SHERAMETI; A. VARMA (Ed.). **Soil Heavy Metals, Soil Biology**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. p.139–162. (Vol 19, Chapter 7).
- PRASAD, M.N.V.; SAJWAN, K.S.; NAIDU, R. **Trace elements in the environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation**, New York: CRC Press, 2009. 101p.
- PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**, 5^a ed. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2002. p.95-112.
- QUINÁGLIA, G.A. **Estabelecimento de um protocolo analítico de preparação de amostras de solo para determinação de metais e sua aplicação em um estudo de caso**. 2001. 164p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo - São Paulo, 2001.
- RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.40, p.997-1004, 2005.
- RAHMAN, H. et al. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.28, p.393–404, 2005.
- RAI, P.K. Heavy-metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an eco-sustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, New Haven, v.10, p.133-160, 2008.
- RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.28, p.142–149, 2010.
- RAJKUMAR, M. et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.30, p.1562–1574, 2012.
- RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, Limerick, v.180, p.169–181, 2011.

- RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v.8, p.221-226, 1997.
- RENSING, C. et al. Pb(II)-translocating P-type ATPases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.32614-3617, 1998.
- RENSING, C.; GHOSH, M.; ROSEN, B.P. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.181, p.5891–589, 1999.
- ROANE, T.M. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. **Microbial Ecology**, Cambridge, v.37, p.218-224, 1999.
- RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.R. et al. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Waltham, v.451, p.1-7, 2006.
- ROUCH, D. et al. Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.939–943, 1985.
- SANUTH, H.A.; OGUNJOBI, A.A.; FAGADE, O.E. The growth and survival of lead solubilizing strains of *Pseudomonas* in the presence of carbon and nitrogen sources supplements in a lead culture medium. **AU JOURNAL of Technology**, Bangkok, v.14, p.88-96, 2010.
- SAKAKIBARA, M. et al. Phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. **Clean - Soil, Air, Water**, Weinheim, v.39, p.735–741, 2011.
- SARMA, H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. **Journal of Environmental Science and Technology**, Paquistão, v.4, p.118–138, 2011.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.160, p.46-56, 1987.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. Distribution of cadmium, lead, nickel, and strontium in imbibing maize caryopses, *Fiziol. Rast Russ.* **Journal of Plant Physiology**, Cambridge, v.52, p.635–640, 2006.
- SHARMA, R.K.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F.M. Heavy metals in vegetables collected from production and market sites of a tropical urban area of India. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v.47, p.583–591, 2009.
- SHANKER, A.K. et al. Chromium toxicity in plants. **Environment International**, United Kingdom, v.31, p.739–753, 2005.

- SHABANI, N.; SAYADI, M.H. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. **The environmentalist**, Sutton, v.32, p.91–98, 2012.
- SHEORAN, V.; SHEORAN, A.; POONIA, P. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v.41, p.168–214, 2011.
- SIDDHU, G. et al. Toxicity of cadmium on the growth and yield of *Solanum melongena* L. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v.29, p.853–857, 2008.
- SIKORA, F.J. et al. Comparison of colorimetric and ICP determination of phosphorus in Mehlich-3 soil extracts. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.36, p.875-887, 2005.
- SILVA, R.M.P. et al. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v.100, p.1533–1538, 2009.
- SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, n.11-12, p.587-605, 2005.
- SIKORA, F.J. et al. Comparison of colorimetric and ICP determination of phosphorus in Mehlich-3 soil extracts. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.36, p.875-887, 2005.
- SMITH, R.A.H.; BRADSHAW, A.D. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. **Transactions of The Institution of Mining and Metallurgy Section A**, London, v.81, p.230-237, 1972.
- SOLTAN EL-SAYED, M.; MOHAMED, R. M.; SHOREIT, A.A. Behavioral response of resistant and sensitive *Pseudomonas aeruginosa* S22 isolated from Sohag Governorate, Egypt to cadmium stress. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.2375-2385, 2008.
- SRIPRANG, R.; MUROOKA, Y. Accumulation and detoxification of metals by plants and microbes. In: SINGH, S.N.; TRIPATHI, R.D. (Ed.). **Environmental Bioremediation Technologies**. New York: Springer, 2007. p.77-100.
- STADTMAN, E.R.; OLIVIER, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.266, p.2005–2008, 1991.
- STREET, R.A. Heavy metals in medicinal plant products - an African perspective. **South African Journal of Botany**, Grahamstown, v.82, p.67–74, 2012.

- SUN, Y. et al. The role of EDTA on cadmium phytoextraction in a cadmium-hyperaccumulator *Rorippa globosa*. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, Tanta, v.3, p.45–51, 2011.
- SUWA, R. et al. Barium toxicity effects in soybean plants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.55, n.3, p. 397–403, 2008.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995. (Boletim Técnico, 5).
- TESTIATI, E. et al. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.248-249, p.131-141, 2013.
- TRAJANOVSKA, S.; BRITZ, M.L.; BHAVE, M. Detection of heavy metal ion resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. **Biodegradation**, Dordrecht, v.8, p.113-124, 1997.
- TURGAY, O.C.; GÖRMEZ, A.; BILEN, S. Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v.184, p.515–526, 2012.
- UMRANIA, V.V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v.97, p.1237-1242, 2006.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Reviews of the environmental effects of pollutants. III. Chromium**. Washington: USEPA, 1978. 285p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Introduction to Phytoremediation**. EPA 600/R-99/107. Cincinnati: USEPA, Office of Research and Development, 2000. 72p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 3050 B**. 1998. Disponível em: <<http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/3050b.pdf>>. Acesso em: fev. 2013.
- UZEL, A.; OZDEMIR, G. Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v.100, p.542-548, 2009.
- VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.26, p.327-338, 2002.

- VAN DER ENT, A. et al. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.362, p.319–334, 2013.
- VANGRONSVELD, J.; VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. **Environmental Pollution**, London, v.87, p.51–59, 1995.
- VEGA-DIENSTMAIER, J.M. et al. Lead levels and cognitive abilities in peruvian children. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v.28, n.1, p.33-39, 2006.
- VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.
- VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, North Carolina, v.73, n.7, p.1163–1172, 2001.
- VIOLANTE, A. et al. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v.10, p.268-292, 2010.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.38, p.291–316, 2006.
- WHO, **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.
- WHO, **Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants**. Geneva, 2003.
- WHO, **National policy on traditional medicine and regulations of herbal medicines**. Geneva, 2005.
- WONG, M.H. Ecological restoration of mine degraded soil, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, Oxford, v.50, p.775–780, 2003.
- WONG, M.H.; LAU, W.M. The effects of applications of phosphate, lime, EDTA, refuse compost and pig manure on the Pb contents of crops. **Agricultural Wastes**, Philadelphia, v.12, p.61-75, 1985.
- YOON, J. et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.368, p.456–464, 2006.
- ZHANG, W. et al. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead–zinc mine tailings. **Chemosphere**, Oxford, v.87, p.1171–1178, 2012.

ZHUANG, X. et al. New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation, **Environment International**, United kingdom, v.33, p.406–413, 2007.

ZHUANG, P. et al. Heavy metal contamination in soils and food crops around Dabaoshan mine in Guangdong, China: implication for human health. **Environmental Geochemistry and Health**, Renfrewshire, v.31, p.707–715, 2009.

8. RESUMO BIOGRÁFICO

Cácio Luiz Boechat, filho de José Luiz Boechat e Rita de Cácia Boechat, irmão de Sávio Luiz Boechat e Yuri Luiz Boechat, nasceu em 25 de junho de 1983 em Bom Jesus do Itabapoana – RJ. De 1999 a 2001 estudou no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RJ) onde completou o ensino médio e o curso Técnico em Agropecuária. Em 2002 ingressou na Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE (MG), realizando de

2006 a 2007, intercâmbio na Universidade de Minnesota (Minneapolis/E.U.A.), graduando-se em Agronomia em julho de 2008. Em 2009 iniciou seu Mestrado em Ciências Agrárias no Programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (BA), concluindo o curso de Especialização em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas no Agronegócio pela Universidade Federal de Lavras (MG) no mesmo ano. No dia 13 de fevereiro de 2010 casou-se com Lorena Pereira Oliveira Boechat. Em fevereiro de 2011 concluiu seu Mestrado, iniciando em março do mesmo ano seu Doutorado em Ciência do Solo no Programa de Pós-graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio grande do Sul (RS).