



PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

**TOLERÂNCIA DE *Cupriavidus necator* A
CÁDMIO E ZINCO E SUA EFICIÊNCIA
SIMBIÓTICA EM LEGUMINOSAS**

LAVRAS – MG

2011

PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

**TOLERÂNCIA DE *Cupriavidus necator* A CÁDMIO E ZINCO E
SUA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM LEGUMINOSAS**

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

Orientadora: Prof^ª. PhD Fatima Maria de Souza Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares

Co-orientador: Prof. PhD Luiz Roberto Guimarães Guilherme

LAVRAS - MG

2011

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

Ferreira, Paulo Ademar Avelar.

Tolerância de *Cupriavidus necator* a cádmio e zinco e sua
eficiência simbiótica em leguminosas / Paulo Ademar Avelar
Ferreira. – Lavras : UFLA, 2011.

141 p. : il.

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

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Áreas degradadas. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3.
Silicato. 4. β -proteobactéria. 5. Poluição. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 631.64

PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

**TOLERÂNCIA DE *Cupriavidus necator* A CÁDMIO E ZINCO E
SUA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM LEGUMINOSAS**

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

Aprovada em 16 de Agosto de 2011

Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares UFSC

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme UFLA

Dra. Cleide Aparecida Abreu IAC

Dra. Maria Rita Scotti Muzzi UFMG

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

LAVRAS-MG

2011

A Deus,

Por seu amor incondicional, por
iluminar meus caminhos e por ter
concedido a sabedoria para gozar dos
momentos alegres e superar os
momentos de dificuldade abençoando
minha vida.

As minhas irmãs, **Márcia Avelar e**
Maita Avelar, pela amizade, pela
compreensão e incentivo constante ao
longo desta jornada.

Aos meus queridos pais, **José Ferreira da**
Silva (in memória) e Odília Avelar da
Silva, por todo o apoio, ensinamentos,
conselhos, incentivos, compreensão e fé a
mim dedicados.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solos, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação, paciência, oportunidades concedidas e pelos ensinamentos passados.

À Fapemig pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme pelo apoio e pela participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Ciência do Solo, pelo auxílio, apoio, disponibilidade e ajudas prestadas. Aos funcionários João Guarberto, Roberto e Manuel Aparecido da Silva, pela valiosa contribuição na execução das análises.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo que, de alguma forma, sempre tiveram dispostos a discutir dúvidas e pontos de vista, além das grandes ajudas e auxílios nos momentos mais difíceis: Bruno, Rogério, Leandro, Plínio, Wesley, Jesse, Paula e Silvia. Em especial ao amigo Romildo Junior pela ajuda durante o desenvolvimento do nosso trabalho.

À todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo, incluindo alunos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários, pela agradável convivência durante todos estes anos.

Ao amigo de república Guilherme Amaral de Souza, pela amizade, convívio intenso e por compartilharem dos momentos felizes e também pela força nas horas difíceis.

À Cleide pela ajuda, paciência, amor e companheirismo e também pelo auxílio em todos os momentos.

Muito Obrigado!!!

RESUMO

A contaminação por metais pesados como cádmio, cobre, chumbo e zinco no solo, provenientes de atividades de mineração, causa sérias consequências ambientais e impactos à saúde pública devido a sua toxicidade e capacidade de acumulação. Assim, a recuperação de áreas degradadas pela atividade de mineração deve ser eficaz e realizada visando acelerar a sucessão natural. Com este propósito, a revegetação tem sido a principal prática para recompor e proteger o solo, evitar a poluição das águas e promover o retorno da biota edáfica. Para garantir o sucesso da recuperação de áreas degradadas, é necessário selecionar espécies vegetais tolerantes a metais pesados e capazes de produzirem grande quantidade de matéria orgânica. Neste contexto, a revegetação com leguminosas associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2), tem-se mostrado uma técnica viável para recuperação destes solos. Tais associações favorecem o estabelecimento da cobertura vegetal, funcionando como catalisadoras de importantes funções ecológicas. Dentre as bactérias capazes de fixar nitrogênio em associação com leguminosas, uma com destaque é a espécie *Cupriavidus necator*, que além de nodular eficientemente algumas espécies hospedeiras, possui uma elevada habilidade de tolerar Pb, Cd, Zn e Cu. No entanto, são poucos os trabalhos sobre fixação biológica de nitrogênio entre esta bactéria e espécies de leguminosas e assim, novos estudos sobre essa interação podem ser úteis para recuperação de áreas degradadas.

Palavras-Chave: Fixação biológica de nitrogênio, contaminação, biorremediação, β -proteobactéria

ABSTRACT

Contamination by heavy metals such as cadmium, copper, lead and zinc in the soil from mining activities, causes serious environmental consequences and public health impacts due to its toxicity and accumulation potential. Thus, the recovery of degraded areas by mining activities should be carried out effectively to accelerate the natural succession. For this purpose, the revegetation has been the main practice to restore and protect the soil, prevent water pollution and promote the reoccurrence of edaphic biota. To ensure the success of recuperation, it is necessary to select plant species tolerant to heavy metals and capable of producing large amounts of organic matter. In this context, the revegetation of legumes associated with nitrogen fixing bacteria, has proved to be a viable technique for recovery of these soils. Such associations improve the establishment of vegetation, acting as catalysts for important ecological functions. Among the bacteria capable of fixing nitrogen in association with legumes, the species *Cupriavidus necator* seems to nodulate efficiently some host species showing the ability to tolerate high heavy metal contents. However, there are few studies on biological nitrogen fixation between this bacterial species and legumes and in this way, new studies about this interactions could be usefull in the recuperation of degraded areas.

Keywords: Biological nitrogen fixation, contamination, bioremediation, β -proteobacteria

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO.....	10
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Poluição do solo por metais pesados.....	11
2.2 Biorremediação.....	14
2.2.1 Biorremediação microbiana.....	14
2.2.2 Fitorremediação.....	16
2.3 Leguminosas em solos degradados.....	18
2.4 Fixação biológica em solos contaminados.....	20
2.4 Referências.....	23
SEGUNDA PARTE – Artigos.....	31
ARTIGO 1: Bioacumulação De Zn E Cd Por Estirpes De <i>Cupriavidus necator</i> Isoladas De Solo Não Contaminado.....	31
ARTIGO 2: Eficiência de estirpes de <i>Cupriavidus necator</i> em fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com diferentes espécies de leguminosas.....	72
ARTIGO 3: Utilização de amenizantes em solo contaminado com zinco e cádmio sob a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas inoculadas com estirpes de <i>Cupriavidus necator</i>	105

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos metais pesados é encontrada naturalmente na crosta terrestre em concentrações suficientes para a nutrição dos sistemas vivos e sem causar toxicidade aos mesmos. No entanto, desde a revolução industrial a poluição por metais pesados tem aumentado substancialmente devido ao aumento crescente das atividades mineradoras, descarte de efluentes industriais, uso de pesticidas e fertilizantes, utilização de combustíveis fósseis, entre outras.

Uma vez que os metais pesados não podem ser degradados, estes se acumulam no ambiente e na cadeia alimentar, acarretando em consequente acúmulo nas plantas, animais e humanos (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Os metais pesados têm ação bloqueadora sobre grupos químicos funcionais, modificando as conformações ativas das moléculas biológicas resultando muitas vezes em mutagêneses e carcinogêneses (HASSEN et al., 1998).

Devido ao problema natural e antropogênico decorrente do acúmulo destes elementos no ambiente, o desenvolvimento de técnicas de remediação de solos, sedimentos e águas contaminadas tem recebido grande atenção nos últimos anos. A utilização de tecnologias biológicas, como o emprego de microrganismos, oferece uma alternativa eficiente e de baixo custo para a remoção destes poluentes.

Além dos microrganismos, diferentes espécies de plantas também têm sido utilizadas na remediação de solos contaminados, com destaque especial para as leguminosas que, por fixarem nitrogênio atmosférico em simbiose com rizóbios, dispensam a adubação nitrogenada, sendo capazes de se adaptar a solos

pobres em nitrogênio orgânico ou mineral, contribuindo com o nitrogênio fixado para o estabelecimento de outras espécies consorciadas ou em sucessão.

Dentre as bactérias capazes de fixar nitrogênio em associação com leguminosas, foi recentemente descrita uma nova espécie, denominada de *Cupriavidus necator*, isoladas de solo rizosférico da leguminosa *Sesbania virgata*, utilizando *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala* como plantas iscas de bactérias que nodulam leguminosas (FLORENTINO et al., 2009; SILVA 2010). No entanto, estudos com o enfoque nesta bactéria e espécies de leguminosas tolerantes a metais pesados não são ainda conhecidos nas condições brasileiras, onde a contaminação do solo e a existência de áreas degradadas pelo excesso de metais são cada vez maiores. Portanto, o conhecimento do comportamento de espécies arbóreas e herbáceas com potencial para revegetação dessas áreas associadas com esta espécie bacteriana capaz de tolerar altas concentrações de metais pesados se reveste de grande importância ecológica e econômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Poluição do solo por metais pesados

Na exploração dos recursos naturais não renováveis, os metais pesados apresentam-se como uma das bases para o desenvolvimento tecnológico e industrial de nossa sociedade, sendo utilizados como matéria-prima em diversas indústrias de bens de consumo e de insumos agrícolas.

Todavia, a contaminação do solo e da água decorrente do excesso de metais pesados é cada vez mais frequente e preocupante por causa do seu impacto negativo no ecossistema (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Essas contaminações provêm de diferentes fontes antropogênicas, como efluentes

industriais, fertilizantes e pesticidas agrícolas, água de irrigação contaminada, combustão de carvão mineral, incineração de resíduos urbanos e industriais, mineração, fundição e refinamento (GUILHERME et al., 2005).

Alguns destes metais pesados são considerados micronutrientes essenciais por serem necessários em pequenas quantidades para o metabolismo celular normal. No entanto, outros parecem não ter função biológica relevante tais como Cd, Pb e Hg.

Além dos impactos no funcionamento e biodiversidade do ecossistema, a contaminação do solo por metais pesados é uma séria ameaça à saúde humana. Ao contrário de poluentes orgânicos, estes não são biodegradáveis e tendem a se acumular nos organismos vivos através da cadeia alimentar, poluindo o meio ambiente e trazendo sérios problemas para o ser humano. Estes elementos exercem ações inibitórias, bloqueando a atividade de grupos funcionais e modificando as conformações ativas das moléculas biológicas (HASSEN et al., 1998), podendo resultar em toxicidade aguda ou crônica, bem como mutagênese ou carcinogênese. Entre os diferentes metais pesados, As, Pb, Hg, Cd, Cu, Ni e Zn são considerados os mais perigosos (CAMERON, 1992).

Em áreas de exploração de minerais metálicos, o processamento destes gera uma grande quantidade de rejeitos que podem ser fontes de contaminação ambiental decorrente da presença de metais pesados. A atividade mineradora, quando comparada a outras fontes de degradação do ambiente, como a agricultura e a pecuária, afeta diretamente apenas pequenas áreas, entretanto, os elementos solubilizados destes rejeitos, se atingirem os cursos d'água, podem impactar negativamente áreas localizadas a centenas de quilômetros da mineração (SALOMONS, 1995).

Em áreas próximas à atividade de mineração, podem ser encontradas concentrações elevadas de metais pesados na cadeia trófica, devido à entrada desses elementos em solos agrícolas, cursos d'água e alimentos produzidos

próximo a estas áreas, colocando em risco a população localizada próximo aos empreendimentos de mineração (PRIETO, 1998; JUNG, 2001).

Devido à ação negativa dos metais pesados na saúde humana e nos demais seres vivos, o desenvolvimento de tecnologias para remediar solos contaminados tem recebido grande destaque nos últimos anos (NASCIMENTO; ACCIOLY; BIONDI, 2009). A restauração da vegetação em locais com acúmulo de metais pesados pode ser facilitada pela utilização de agentes imobilizantes, ou amenizantes que reduzem a disponibilidade destes metais tóxicos (RIBEIRO-FILLHO et al., 2011), representando um tratamento químico de grande importância para a recuperação destas áreas de mineração.

A aplicação de calcário é considerada a técnica mais antiga e mais utilizada para imobilizar metais no solo, mas seu efeito tem uma baixa longevidade e esta técnica precisa ser repetida com o uso de altas taxas de aplicação para permanecer efetiva (RIBEIRO-FILLHO et al., 2011). Silicatos de cálcio e magnésio também podem ser compostos efetivos na redução da fitotoxicidade de metais no solo, uma vez que o silício é mediador de efeitos na nutrição de plantas e na tolerância a metais (ACCIOLY; SOARES; SIQUEIRA, 2009; CHEN et al., 2000; CHENG; HSEU, 2002; MA, 2004; RIBEIRO FILHO et al., 2011; SHI et al., 2005). Assim, a utilização de tratamentos químicos ou físicos combinados com tecnologias alternativas baseadas em processos biológicos, têm sido desenvolvidas para remediação de ambientes contaminados.

2.2 Biorremediação

2.2.1 Biorremediação microbiana

A aplicação de processos biotecnológicos envolvendo microrganismos com o objetivo de solucionar ou minimizar problemas de poluição ambiental com metais pesados, tem se tornado crescente. A grande diversidade de microrganismos contribui para o aumento da eficiência desses processos, modificando a mobilidade destes metais para aumentar sua remoção ou diminuindo sua toxicidade.

A biorremediação se constitui, portanto, em uma alternativa atrativa para a remoção destes poluentes ambientais, sendo um método mais barato, que pode resultar na destoxificação do ambiente sem efeitos nocivos para a flora e fauna local podendo ser utilizada ainda, *in situ*, em ambientes com baixas concentrações, porém toxicamente relevantes, destes metais.

Muitos microrganismos, incluindo bactérias, algas, fungos e leveduras, possuem a habilidade de remover metais pesados do meio ambiente. A capacidade de bioissorção, assim como os mecanismos de acumulação, podem variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo entre diferentes isolados da mesma espécie. Tanto as células, como os produtos excretados, parede e membrana celular e polissacarídeos são bioacumuladores eficientes para as formas solúveis de metais pesados (COMTE; GUIBAUD; BAUDU, 2008; DIAZ-MARRERO et al., 2004; FOSTER; MOY; ROGERS, 2000; KAZY et al., 2002; LEDIN; KRANTZ-ROLCKER; ALLARD, 1996; LOVLEY et al., 1993; NIU et al., 1993; SILVER; PHUNG, 1996).

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os metais pesados. A acumulação por mecanismos independentes do metabolismo celular se dá através de interações físico-químicas entre o metal e

constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros compostos associados à face externa da membrana celular. A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário o gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (GADD, 1992).

O transporte de íons de metais pesados através da membrana celular e sua acumulação intracelular são dependentes do metabolismo, ocorrendo somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção de íons metálicos por este tipo de mecanismo é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-químico. Em contrapartida, maiores quantidades de metal podem ser acumuladas (GADD, 1992).

As bactérias, por serem capazes de habitar os mais diversos nichos ecológicos, incluindo aqueles contendo altas concentrações de metais pesados, têm desenvolvido diferentes sistemas de resistência a uma ampla variedade destes metais (GADD; WHITE, 1993). O sequestro extracelular de metais pesados foi observado em *Cupriavidus metallidurans* CH34, quando os cátions metálicos Zn e Cd são complexados por carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos. Exopolissacarídeos (EPS) e proteínas de membrana externa também parecem estar envolvidos com a imobilização destes elementos (Collard et al., 1994). O acúmulo do excesso de Cu no espaço periplasmático foi documentado para estirpes de *Escherichia coli* capazes de sobreviver em ambientes contaminados com este metal (RENSING; GRASS, 2003).

Várias bactérias são capazes ainda, de obter energia através da redução de diferentes metais pesados. Entre as mais estudadas estão as redutoras de Fe e Mn, incluindo as espécies *Geobacter metallidurences* (LOVLEY et al., 1993), *Geovibrio ferrireducens* (CACCAVO JUNIOR et al., 1996), *Geotrix fermentans* (COATES et al., 1999), *Ferrobacter limneticum*, *Sulfurospirillum arnesii*

(OREMLAND et al., 1994), sendo capazes de remediar solos e águas contaminadas. A redução de Cr altamente tóxico e móvel para formas menos tóxicas pode ser realizada por estirpes de bactérias das espécies *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp e *Streptomyces* sp. (WANG et al., 2000). *Sulfurospirillum arsenophilium* (STOLZ et al., 1999) e *Chrysiogenes arsenatis* (MACY et al., 1996) são capazes de reduzir As como mecanismo de resistência.

Algumas bactérias também possuem componentes intracelulares envolvidos na captação de metais pesados, como as proteínas metalotioneínas, capazes de se ligar e sequestrar diferentes metais, protegendo as células contra a ação tóxica destes elementos (CAVET; BORRELLY; ROBINSON, 2003). Estas proteínas já foram bem caracterizadas em *Pseudomonas putida*, estando relacionadas ao sequestro de Cd (TREVOS; STRATTON; GADD, 1986) e nas cianobactérias *Synechococcus* e *Oscillatoria brevis*, conferindo resistência a Zn e Cd (BLINDAUER et al., 2001; LIU et al., 2003).

Uma vez que as tecnologias baseadas na biorremediação estão geralmente ligadas com a capacidade genética e bioquímica dos microrganismos em interagirem e sobreviverem aos efeitos tóxicos dos metais, e considerando que apenas 12% das espécies de bactérias foram estudadas (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992), estudos relacionados com a capacidade de remediação por estes microrganismos oferecem ainda, um grande potencial a ser explorado.

2.2.2 Fitorremediação

Na busca de alternativas para remediação de áreas contaminadas por metais pesados, cresce também o interesse pela utilização da fitorremediação,

técnica caracterizada por sua eficiência na descontaminação, simplicidade em sua execução e baixo custo (NASCIMENTO; ACCIOLY; BIONDI, 2009).

A fitorremediação é uma estratégia que envolve o emprego de plantas, com o fim de controlar ou reduzir a presença dos contaminantes no meio. A fitorremediação envolve diversos métodos, entre eles a fitoestabilização e a fitoextração (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000).

Fitoestabilização é o emprego de plantas com a finalidade de imobilizar os contaminantes no solo, impedindo a migração destes para outras áreas pela ação do vento, lixiviação e erosão hídrica evitando assim maiores contaminações (CUNNINGHAM et al., 1996). A presença de plantas em áreas contaminadas diminui o processo de lixiviação, evitando a migração do lixiviado para águas subterrâneas ou corpos receptores.

A fitoextração envolve a absorção dos contaminantes pelas raízes, os quais são transportados e acumulados na parte aérea. Esta técnica utiliza plantas chamadas hiperacumuladoras, que tem a capacidade de armazenar altas concentrações de metais específicos (0,1% a 1% do peso seco, dependendo do metal). As espécies de *Brassica juncea*, *Aeolanthus biformifolius*, *Alyssum bertolonii* e *Thlaspi caerulescens* são exemplos de plantas acumuladoras de Pb, Cu, Co, Ni e Zn, respectivamente (McGRATH, 1998).

Esta capacidade de diferentes espécies em tolerar altas concentrações de metais pesados parece estar relacionada principalmente com o acúmulo destes metais em diferentes partes do tecido vegetal. Em algumas espécies como *Machaerium nictidans*, *Myroxylon peruiferum*, *Piptadenia gonoacantha*, *Senna macranthera* e *Trema micrantha*, que tiveram o crescimento muito inibido pela contaminação, houve elevada translocação de Zn e Cd para parte aérea. *Dendropanax cuneatum*, que foi pouco afetada pelos metais, também apresentou índice elevado de translocação de Zn e Cd, mas reteve esses elementos no caule. *Acacia mangium*, *Copaifera langsdorffi* e *Cedrella fissilis* também apresentaram

baixa sensibilidade à contaminação e elevado acúmulo de Zn e Cd nas raízes, indicando que a baixa translocação desses elementos para a parte aérea está envolvida na tolerância dessas espécies ao excesso de metais pesados no solo (SOARES et al., 2001).

O conhecimento do comportamento de espécies herbáceas com potencial para fitorremediação dessas áreas se reveste, portanto, de grande importância econômica e ecológica (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

Por apresentar um custo relativamente baixo, esta técnica se torna viável para a descontaminação de solos poluídos por metais pesados, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Entretanto, são poucos os estudos com esse enfoque para as condições brasileiras, mesmo sendo a contaminação do solo e a existência de áreas degradadas pelo excesso de metais, cada vez mais crescente no país.

2.3 Leguminosas em solos degradados

Com o passar dos anos, extensas áreas no Brasil vêm sendo degradadas por atividades antrópicas. Essas ações vêm ocasionando o desmatamento, a perda da fertilidade do solo, perda da diversidade biológica, diminuição da retenção de água no solo e a queda de produtividade do sistema (WIEGLEB; FELINKS, 2001).

A utilização de leguminosas arbóreas ou arbustivas na recuperação de solos degradados e na melhoria daqueles de baixa fertilidade natural tem sido uma prática bastante usual nas regiões tropicais. A família Leguminosae é uma das maiores famílias botânicas, com aproximadamente 19.700 espécies (LEWIS et al., 2005), as quais são, em sua maior parte, árvores tropicais. Muitas leguminosas conhecidas são capazes de formar nódulos com bactérias fixadoras

de nitrogênio e têm potencial para uso na reabilitação da sustentabilidade dos solos (FARIA, 1995).

Além de fixar grandes quantidades de N e contribuir com aporte elevado de biomassa ao solo, estas espécies podem contribuir para a ciclagem de nutrientes de modo efetivo, uma vez que a qualidade do material aportado é geralmente superior àquela oriunda de espécies não leguminosas.

A grande importância das leguminosas se deve, pois ao fato dessas espécies serem capazes de crescer, incorporar, reciclar o carbono (C), o nitrogênio (N) e outros nutrientes, principalmente em solos exauridos, favorecendo a posterior colonização da área por outras espécies mais sensíveis ou exigentes quanto às características de solo (COSTA et al., 2004; SIQUEIRA; SOARES; SILVA, 2008). Segundo estes mesmos autores, as leguminosas possuem vantagens do ponto de vista econômico e ambiental, pois permitem a redução do uso de adubação nitrogenada e a menor aplicação de fertilizante, além de minimizarem o risco de contaminação do ecossistema, principalmente no uso excessivo de nitrogênio na adubação.

Portanto, diferentes espécies de leguminosas com potencial para utilização nos programas de revegetação de áreas degradadas, por fixarem nitrogênio atmosférico em simbiose com rizóbios, dispensando a adubação nitrogenada, são capazes de se adaptar a solos pobres em nitrogênio orgânico ou mineral contribuindo, com o nitrogênio fixado, para o estabelecimento de outras espécies consorciados ou em sucessão. Assim, tornam-se importantes os estudos visando à seleção de leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio eficientes e tolerantes a condições estressantes.

2.4 Fixação biológica em solos contaminados

A população microbiana do solo exerce um papel fundamental para o perfeito funcionamento do sistema solo-planta, especialmente nos ecossistemas naturais em que a fertilidade do solo depende quase exclusivamente dos processos microbianos. No entanto, solos sob impacto de metais pesados podem reduzir significativamente as atividades metabólicas realizadas pelos microrganismos, tornando ineficientes os processos essenciais do solo, como degradação e ciclagem da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, respiração e as simbioses entre microrganismos e plantas.

Solos contaminados com altas concentrações de metais pesados podem inibir a fixação biológica de nitrogênio, afetando o processo infectivo e a nodulação, atividade da nitrogenase e a produção de leghemoglobina (HASAN et al., 2008; IBEKWE et al., 1995; MARTENSSON; WITTER, 1990; TRANNIN et al., 2001).

O processo de formação de nódulos efetivos em solos contaminados é bastante afetado pela presença de elevadas concentrações de metais pesados (SMITH; GILLER 1992). A avaliação da sobrevivência de rizóbio a longo prazo em ensaios de campo em solos tratados há mais de 10 anos com lodo de esgoto com concentrações de 90 a 250 mg Zn kg⁻¹, apresentou um efeito deletério na sobrevivência bacteriana, não podendo ser determinado o número células por grama de solo ou este número sendo menor que 100 (CHAUDRI et al., 1993, 2000).

Plantas de trevo branco inoculadas com uma quantidade de 10⁷ células por grama de solo com a estirpe tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* apresentaram nódulos efetivos em seu sistema radicular. Quando o mesmo solo foi inoculado e incubado por um período de 2 meses antes do plantio do trevo branco, houve apenas a formação de nódulos inefetivos (GILLER; MCGRATH;

HIRSCH, 1989). No entanto, na aplicação de taxas extremamente altas de inóculo (10^{10} células por grama de solo), a estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sobreviveu após os 2 meses de incubação e formou nódulos efetivos.

Solos de diferentes regiões da Europa, sob aplicação de lodo de esgoto há mais de 10 anos foram coletados e inoculados com a estirpe tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (10^8 células por grama de solo) e incubados por até 6 meses. Por meio da avaliação do número mais provável, pode-se observar que no solo não contaminado durante a incubação houve uma diminuição de 1 a 2 unidades na escala logarítmica, enquanto que no solo com altas concentrações de Zn e Cd houve uma redução drástica no número de células durante o período de incubação variando de 5,8 a 7,4 unidades na escala logarítmica (BROOS; BEYENS; SMOLDERS, 2005).

Chen et al. (2003a), estudando o efeito de teores crescentes de Cd sobre o desenvolvimento de plantas de soja, verificaram redução drástica no número de nódulos, na atividade da nitrogenase, sendo que a ausência da fixação biológica de nitrogênio causou uma redução da aérea foliar e o amarelecimento das plantas. Essa clorose foi causada devido um retardamento na biossíntese de clorofila pela presença do cádmio (SINGH; TEWARI, 2003).

Diferentes concentrações de Cd (0, 50, 100, 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram avaliadas por Hasan et al., 2008, em plantas de grão de bico inoculadas com uma estirpe de *Rhizobium*. Eles observaram que com aumento das concentrações de Cd no meio houve, uma redução da matéria seca da parte aérea, no número de nódulos, na leghemoglobina, no teor de clorofila e da atividade da nitrato redutase (HASAN et al., 2008).

Apesar destes efeitos adversos causados por metais pesados, deve-se ressaltar que algumas simbioses entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas apresentam uma alternativa promissora para programas de revegetação de solos contaminados (VÁZQUEZ et al., 2006) uma vez que as

bactérias, quando tolerantes a metais, estimulam o crescimento da planta em ambientes contaminados. Estudos relacionados com a tolerância de rizóbios a metais pesados têm sido realizados para diferentes gêneros (BROSS et al., 2004; CARRASCO et al., 2005; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; PURCHASE; MILES; YOUNG, 1997; TRANNIN et al., 2001), para aplicação direta em processos de biorremediação (SRIPRANG et al., 2002, 2003; VALLS et al., 2000; WU et al., 2006).

Dentre as bactérias capazes de fixar nitrogênio em associação com leguminosas, foi recentemente descrito uma espécie, denominada de *Cupriavidus taiwanensis* (syn. *Ralstonia taiwanensis*), que além de nodular eficientemente a espécie hospedeira *Mimosa pudica* (CHEN et al., 2001, 2003a, 2003b, 2003c), possui uma elevada habilidade de acumular Pb, Cd e Cu (CHEN et al., 2008). Em trabalhos recentes também foi constatado que espécies de *Cupriavidus necator* são capazes de formar nódulos efetivos em leguminosas da subfamília Papilionoideae e Mimosoideae (FLORENTINO et al., 2009; SILVA 2009). Foi verificado que as estirpes de *Cupriavidus necator*, foram capazes de formar nódulos efetivos em *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Sesbania virgata*, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum* (SILVA, 2009), e apresentam elevada capacidade de crescer em meios de cultura contendo altas concentrações de Zn, Cd, Cu e Pb (dados não publicados).

Assim, torna-se necessário a realização de estudos com plantas e solos degradados por contaminação de metais pesados, dando destaque especial para estirpes de *Cupriavidus necator* que toleram altas concentrações de diferentes metais.

2.5 REFERÊNCIAS

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

ACCIOLY, A. M. A.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Calcium silicate to reduce heavy metal toxicity in eucalyptus seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 180-188, fev. 2009.

BLINDAUER, C. A. et al. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 17, p. 9593-9598, Aug. 2001.

BROOS, K.; BEYENS, H.; SMOLDERS, E. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 3, p. 573-579, Mar. 2005.

BROOS, K. et al. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 4, p. 633-640, Apr. 2004.

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 219-252, Oct. 1992.

CACCAVO JUNIOR, F. et al. *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. **Archives of Microbiology**, New York, v. 165, n. 6, p. 370-376, June 1996.

CAMERON, R. E. **Guide to site and soil description for hazardous waste site characterization**. Washington: Metals, Environmental Protection Agency, 1992. 288 p.

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

CARRASCO, J. A. et al. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Azanalcollar pyrite mine. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 6, p. 1131-1140, June 2005.

CAVET, J. S.; BORRELLY, G. M.; ROBINSON, N. J. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 27, n. 2/3, p. 165-181, June 2003.

CHAUDRI, A. M. et al. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with meal-contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 301-309, Mar. 1993.

_____. Study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. **Plant and Soil**, The Hague, v. 22, n. 2, p. 167-179, Jan. 2000.

CHEN, H. M. et al. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. **Chemosphere**, Oxford, v. 41, n. 1/2, p. 229-234, July 2000.

_____. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, Dec. 2003a.

_____. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 2/3, p. 364-371, Mar. 2008.

_____. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 12, p. 1051-1061, Dec. 2003b.

_____. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

_____. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 781-787, Feb. 2003c.

CHENG, S. F.; HSEU, Z. Y. In-situ immobilization of cadmium and lead by different amendments in two contaminated soils. **Water, Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 140, n. 1, p. 73-84, Feb. 2002.

COATES, J. D. et al. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1615-1622, Oct. 1999.

COLLARD, J. et al. Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 405-414, Aug. 1994.

COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 185-193, Feb. 2008.

COSTA, G. S. et al. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, p. 919-927, ago. 2004.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**, Madison, v. 56, n. 1, p. 55-114, Jan. 1996.

DÍAZ-MARRERO, A. R. et al. Coprecipitation of Th⁴⁺ and the purified extracellular polysaccharide produced by bacterium *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) BGA-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 356-362, Apr. 2004.

FARIA, J. M. R. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG, 1995. 43 p.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, Sept./Oct. 2009.

FOSTER, L. J. R.; MOY, Y. P.; ROGERS, P. L. Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 22, p. 1757-1760, Sept. 2000.

GADD, M. G. Metals and microorganisms: a problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 197-204, Dec. 1992.

GADD, M. G.; WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution: a working biotechnology? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 353-359, Aug. 1993.

GILLER, K. E.; MCGRATH, S. P.; HIRSCH, P. H. Absence of nitrogen-fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metal is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 21, n. 6, p. 841-848, Jan. 1989.

GUILHERME, L. R. G. et al. **Metais pesados em solos e sistemas aquáticos: tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 345-390.

HASAN, S. A. et al. 28-homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 151, n. 1, p. 60-66, Feb. 2008.

HASSEN, A. et al. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, n. 1, p. 7-15, Jan. 1998.

IBEKWE, A. M. et al. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 24, n. 6, p. 1199-1204, 1995.

JUNG, M. C. Heavy metal contamination of soils and wasters in and around the Imcheon Au-Ag mine, Korea. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 16, n. 11/12, p. 1369-1375, Aug./Sept. 2001.

KAZY, S. K. et al. Extracellularpolysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 583-588, Apr. 2002.

LEDIN, M.; KRANTZ-ROLCKER, C.; ALLARD, B. Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 28, n. 6, p. 791-799, June 1996.

- LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.
- LIU, T. et al. A methallothionein and Cpx-ATPase handle metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 542, n. 1, p. 159-163, 2003.
- LOVLEY, D. R. et al. Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 11, p. 3572-3576, Nov. 1993.
- MA, J. F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 11-18, Jan. 2004.
- MACY, J. M. et al. *Chrysiogenes arsenatis*, gen. sp. nov., a new arsenate respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1153-1157, Oct. 1996.
- MARTENSSON, A. M.; WITTER, E. The influence of various soil amendments on nitrogen fixing soil microorganisms in a long-term field experiment, with special reference to sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, n. 7, p. 977-982, Apr. 1990.
- MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 343-355, fev. 2002.
- MCGRATH, S. P. Phytoextraction for soil remediation. In: BROOKS, R. R. (Ed.). **Plants that hyperaccumulate heavy metals**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 261-270.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, Amsterdam, v. 60, n. 1/4, p. 193-207, June 2001.
- NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. A.; BIONDI, C. M. Fitoextração de metais pesados em solos contaminados: avanços e perspectivas. In: RIBEIRO, M. R. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 461-497.

NIU, H. et al. Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 42, n. 6, p. 785-787, Sept. 1993.

OREMLAND, R. S. et al. Isolation, growth and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 3011-3019, Aug. 1994.

PRIETO, G. Geochemistry of heavy metals derived from goldbearing sulphide minerals in the Marmato District, Colombia. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 64, n. 1/3, p. 215-222, Nov. 1998.

PURCHASE, D.; MILES, R. J.; YOUNG, T. W. K. Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 85-93, Feb. 1997.

RENSING, C.; GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 197-213, Feb. 2003.

RIBEIRO FILHO, M. R. et al. Inorganic materials as ameliorants for soil remediation of metal toxicity to wild mustard (*Sinapis arvensis* L.). **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p. 498-512, Mar. 2011.

SALOMONS, W. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 5-23, Mar. 1995.

SHI, X. et al. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. **Plant and Soil**, The Hague, v. 272, n. 1, p. 53-60, Jan. 2005.

SILVA, K. **Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian Soils**. 2009. 124 p. Thesis (Doctor in Microbiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 753-789, Oct. 1996.

SINGH, P. K.; TEWARI, R. K. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 24, n. 1, p. 107-112, Jan. 2003.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A. et al. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e sub-tropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. v. 1, p. 495-524.

SMITH, S. R.; GILLER, K. E. Effective *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* present five soil contaminated with heavy metal from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 781-788, Aug. 1992.

SOARES, C. R. F. S. et al. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 302-315, out. 2001.

SRIPRANG, R. et al. Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1791-1796, Mar. 2003.

_____. Novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 279-293, Nov. 2002.

STOLZ, J. F. et al. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the epsilon Proteobacteria. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1177-1180, July 1999.

TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre in vitro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 305-316, jan./fev. 2001.

TREVORS, J. T.; STRATTON, G. W.; GADD, G. M. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 32, n. 6, p. 447-464, June 1986.

VALLS, M. et al. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. **Nature Biotechnology**, London, v. 18, n. 6, p. 661-665, June 2000.

VÁZQUEZ, S. et al. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 177, n. 1/4, p. 349-365, May 2006.

WANG, C. L. et al. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium to the cell surface. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4497-4502, Oct. 2000.

WIEGLEB, G.; FELINKS, B. Predictability of early stages of primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia, Germany. **Applied Vegetation Science**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. 5-18, Apr. 2001.

WU, C. H. et al. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. **Applied Vegetation Science**, San Francisco, v. 72, n. 2, p. 1129-1134, Feb. 2006.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1: Tolerância e acumulação de Zn e Cd por estirpes de *Cupriavidus necator* isoladas de solo não contaminado.

Normas da Revista Journal of Hazardous Materials

RESUMO

Estudos têm demonstrado a influência dos metais pesados sobre microrganismos, afetando seu crescimento, morfologia e atividades bioquímicas. Entre os microrganismos do solo, as bactérias pertencentes ao gênero *Cupriavidus* têm recebido um elevado interesse científico, econômico e ecológico devido à sua capacidade de fixar nitrogênio e tolerar altas concentrações de metais. O objetivo deste trabalho foi estudar quatro estirpes de *Cupriavidus necator* quanto à capacidade de resistência e absorção de cádmio e zinco. Foi avaliada a tolerância destas estirpes em diferentes concentrações de Zn/Cd, solução do solo extraída de um rejeito de mineração e em solo multicontaminado com Zn, Cd, Cu e Pb. As quatro estirpes avaliadas apresentaram alta tolerância a Zn e Cd, tanto em meio de cultivo com as diferentes concentrações, ou quando inoculadas em solução de solo contaminado ou no rejeito multi-contaminado. A estirpe UFLA 02-71 absorveu 93,76 $\mu\text{mol g.célula}^{-1}$ de Zn e 16,03 $\mu\text{mol g.célula}^{-1}$ de Cd na concentração total de 9140

$\mu\text{mol L}^{-1}$ (9000 Zn + 140 Cd) e em solução do solo absorveu 16,98 $\mu\text{mol g.célula}^{-1}$ de Cd. O aumento do pH do meio de cultivo pelas estirpes durante o crescimento proporcionou a redução das espécies Zn^{2+} e Cd^{2+} e um aumento na concentração das espécies ZnHPO_4 e CdHPO_4 em solução. Estas estirpes apresentam um grande potencial para a utilização na recuperação de áreas contaminadas por metais pesados e novos estudos devem ser realizados para investigar quais mecanismos estão envolvidos na tolerância dessas estirpes.

Termos para indexação: Biorremediação, fixação biológica de nitrogênio, β -proteobactéria, poluição.

ABSTRACT

Studies have shown the influence of heavy metals on microorganisms, affecting their growth, morphology and biochemical activities. Among soil microorganisms, the bacteria belonging to the genus *Cupriavidus* have received a high scientific, economic and ecological importance because of its ability to fix nitrogen and tolerate high concentrations of metals. The aim of this work was to study four strains of *Cupriavidus necator* on the resistance and absorption of cadmium and zinc. We evaluated the tolerance of these strains in different concentrations of Zn / Cd, soil solution extracted from a mining waste and multicontaminated soil with Zn, Cd, Cu and Pb. The four strains tested showed high tolerance to Zn and Cd, in culture medium with different concentrations of these metals, when inoculated into contaminated soil or in multi-contaminated waste solution. The strain UFLA02-71 absorbed the greatest amounts of Zn and Cd in the concentration of 9140 mol L⁻¹ (9000 + 140 Zn Cd) and in soil solution. The increasing of pH in the medium by the strains during their growth reduced the species Zn²⁺ and Cd²⁺ and increased the concentration of the species ZnHPO₄ CdHPO₄ in the solution. These strains present a great potential for use in the recuperation of contaminated areas with heavy metals and further studies should be performed to investigate which mechanisms are involved in the tolerance of these strains.

Key words: Bioremediation, biological nitrogen fixation, β -proteobacteria, pollution.

INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por metais pesados em áreas de mineração é um sério problema que implica em consequências para a saúde humana e o meio ambiente. As atividades de mineração geram rejeitos e efluentes com concentrações extremamente elevadas de metais pesados (Zn, Pb, Cd, Cu) ou metaloides (As) que podem ter efeitos adversos sobre o crescimento das plantas, bem como sobre a densidade, diversidade e atividade da comunidade de microrganismos do solo (Trannin et al., 2001; Wiegleb & Felinks, 2001; Renella et al., 2005).

Vários microrganismos têm a capacidade de colonizar ambientes contaminados com metais pesados devido à ampla gama de mecanismos e de interações que asseguram a possibilidade de adaptação a esses ambientes (Bremer & Geasey, 1993). De modo geral, os principais mecanismos de tolerância dos microrganismos são conferidos por efluxo ativo de metais para fora da membrana, plasmídios de resistência, absorção e adsorção, metilação do DNA e biotransformação de metal diretamente por enzimas específicas ou indiretamente por metabólitos celulares (Gadd, 2004).

Dentre esses microrganismos capazes de colonizar ambientes contaminados, bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas apresentam também a capacidade de se desenvolver nesses solos (Vázquez et al., 2006). Além disso, estas bactérias, quando tolerantes a metais, estimulam o crescimento da planta nestes ambientes contaminados. Estudos relacionados com a tolerância de rizóbios a metais pesados têm sido realizados para diferentes gêneros (Trannin et al., 2001; Matsuda et al., 2002; Bross et al., 2004; Carrasco et al., 2005; Chaudri et al., 2008), para aplicação direta em processos de biorremediação (Valls et al., 2000; Sriprang et al., 2002, 2003; Wu et al., 2006).

Dentre as bactérias capazes de fixar nitrogênio em associação com leguminosas, uma com destaque é a nova espécie de *Cupriavidus taiwanensis* (syn. *Ralstonia taiwanensis*), que além de nodular eficientemente a espécie hospedeira *Mimosa pudica* (Chen et al., 2001; 2003a; 2003b), possui uma elevada habilidade de acumular Pb, Cd e Cu (Chen et al., 2008). Outras espécies do gênero, apesar de não fixarem nitrogênio, como *Cupriavidus metallidurans* (syn. *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* ou *Ralstonia metallidurans*), isolada de sedimentos de uma bacia de decantação de uma fábrica de zinco, também despertam um grande interesse biotecnológico. Essas espécies são bem conhecidas, pela elevada resistência que possuem em relação a Zn, Cd, Co, Ni, Cu, Cr, Hg e Pb (Mergeay et al., 1985; Taghavi et al., 1997; Goris et al., 2001;

Mergeay et al., 2003), além da capacidade de biodegradação de compostos recalcitrantes e xenobióticos (Louie et al., 2002; Trefault et al., 2004). É importante mencionar que a estirpe de *C. taiwanensis*, diferentemente da estirpe de *C. metallidurans*, foi isolada de nódulos de *Mimosa* sp. de ambientes não contaminados de Taiwan (Chen et al., 2008), sugerindo que não existe influência dos locais de origem nas concentrações de metais toleradas por este gênero. No entanto, são poucos os trabalhos sobre fixação biológica de nitrogênio entre leguminosas e espécies de *Cupriavidus* em áreas contaminadas com metais pesados, e estes ainda, relatam dados obtidos em áreas temperadas.

Devido à aplicação potencial que este gênero apresenta na biossorção de metais pesados e possível capacidade de nodular leguminosas, objetivou-se neste trabalho estudar em detalhes a capacidade de resistência e absorção de cádmio e zinco por estirpes de *Cupriavidus necator* e sua futura utilização em combinação com leguminosas na recuperação de áreas degradadas por mineração.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Determinação de metais pesados em amostras de solo.

Para a determinação de metais pesados, amostras de um solo multi-contaminado por Zn, Cd, Cu e Pb, classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico plíntico (LVAd), foram coletadas, em área industrial da

Votorantim Metais-VM, no município de Três Marias (MG). Em seguida, foi realizada a extração da solução do solo para determinação das concentrações dos íons que se encontram disponíveis. Para isso, foi feito um extrato de saturação de acordo com a metodologia estabelecida por Raij et al. (2001), sendo utilizadas três repetições, sendo as concentrações dos elementos determinados por espectrofotometria de absorção atômica, usando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800[®].

2.2. Estirpes bacterianas

As estirpes usadas no presente estudo foram previamente isoladas de solo rizosférico da leguminosa *Sesbania virgata*, utilizando *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala* como plantas iscas de bactérias que nodulam leguminosas em solo não contaminado. Estas estirpes apresentaram crescimento rápido, alcalinizam o meio de cultivo e produzem pouca goma em meio 79 (Fred & Waksman 1928). Essas foram identificadas como *Cupriavidus necator* com base na caracterização fenotípica e em seqüências parciais do gene 16S rDNA comparadas ao banco de dados do NCBI (Florentino et al., 2009; Silva 2009). As quatro estirpes (UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-73 e UFLA02-71) foram selecionadas com base em sua tolerância a altas concentrações de Zn e Cd em meio de cultivo sólido.

2.3. Avaliação do crescimento de estirpes de *Cupriavidus necator* em concentrações de metais pesados determinados na solução de solo

As estirpes foram previamente cultivadas em meio LB (5 g L⁻¹ de NaCl, 5,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de triptona) (Sambrook et al., 1989), com pH 6,0 e sob agitação orbital de 110 rpm, a 28°C, até atingir uma densidade óptica (D.O) de 1,0 em 560 nm, (1 x 10⁹ células por mL). Um mL do inóculo foi então transferido para 100 mL de meio LB, modificado por adição de tampões biológicos HEPES (1,3 mg L⁻¹ de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) e MES [1,1 mg L⁻¹ de 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid] (Cole e Elkan, 1973), com o pH ajustado para 6,0. Foram adicionadas ao meio diferentes concentrações de Zn e Cd [9,14 μmol L⁻¹ (9,0 Zn + 0,14 Cd); 91,4 μmol L⁻¹ (90 Zn + 1,4 Cd); 914 μmol L⁻¹ (900 Zn + 14 Cd) e 9140 μmol L⁻¹ (9000 Zn + 140 Cd)] referentes às concentrações encontradas na solução do solo, mantendo uma relação de Zn:Cd de 64,3. Estas culturas foram incubadas a 28°C, sob agitação de 110 rpm. A avaliação do número de células viáveis foi efetuada pelo método de diluições sucessivas para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com o descrito por Miles & Misra (1938), nos intervalos de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. O pH das soluções foi determinado ao final do experimento. A partir da avaliação do número de UFC destas estirpes nas diferentes concentrações de Zn

e Cd, foram obtidas as equações de regressão pelo programa Table Curve 2D for Windows v. 5.03. Jandel Corporation.

2.4. Crescimento de estirpes de *Cupriavidus necator* em solução de solo extraída de área contaminada por Zn e Cd.

A solução do solo foi extraída de amostras coletadas em áreas da Votorantim Metais, conforme descrito anteriormente. Foram adicionados a essa solução 5 g de NaCl, 5 g de extrato de levedura e 10 g de triptona por litro, simulando um meio com as reais concentrações dos metais disponíveis, suplementado com as fontes de nutrientes necessárias ao crescimento bacteriano. Este meio foi esterilizado por autoclavagem (20 minutos a 121 °C) e o mesmo foi caracterizado posteriormente por cromatografia iônica e por espectrofotometria de absorção atômica.

As estirpes foram previamente cultivadas em meio LB e um mL deste pré-inóculo foi então transferido para 100 mL da solução preparada. A avaliação do número de células viáveis foi efetuada pelo método de diluições sucessivas para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com o descrito por Miles & Misra (1938), nos intervalos de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação.

Foi feita uma especiação química da solução do solo, usando o programa Visual MINTEQ (Versão 3.0) em pH:6,0 e em pH:7,86 para avaliar a distribuição das espécies de Zn e Cd em solução.

2.5. Sobrevivência de estirpes de *Cupriavidus necator* em solo multi-contaminado

Para avaliar a sobrevivência das estirpes em solo multi-contaminado com metais pesados, esse foi coletado em áreas da Votorantim Metais e passado em peneira de malha de 2,0 mm, amostras de 200 g do solo foi transferido para erlenmeyers de 500 mL. Essas amostras foram autoclavados três vezes durante 1 h, a 121°C e deixado em repouso por 30 dias para a sua estabilização. O mesmo apresentava as seguintes características químicas após autoclavagem: pH= 6,2; P= 37,6 mg dm⁻³ (Mehlich I); K= 36 mg dm⁻³; Ca= 1,8 cmolc dm⁻³; Mg= 0,3 cmolc dm⁻³; H+Al= 1,5 cmolc dm⁻³; Zn= 12514 mg dm⁻³; Cd= 12,4 mg dm⁻³; Pb= 18,3 mg dm⁻³; Cu= 1144,9 mg dm⁻³; e MO= 1,8 dag kg⁻¹. Os teores semi-totais (USEPA 3051) de Zn, Cd, Pb e Cu foram de 47.910, 1.207, 6.488 e 738 mg kg⁻¹, respectivamente.

Culturas de estirpes de *C. necator* foram cultivadas em 20 mL de meio LB com D.O=1,0 (560 nm) foram transferidas para as amostras de 200 g de solo que foram em seguida revolvidas para garantir a distribuição uniforme das células, em um total de três repetições por estirpe. O solo inoculado foi mantido

com teor de umidade em torno de 70% do volume total de poros (VTP) por meio de pesagens e aplicação de água destilada autoclavada. A avaliação do número de células viáveis foi efetuada pelo método de diluições sucessivas para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com o descrito por Miles & Misra (1938), nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após inoculação.

2.6. Capacidade de acumular metais pesados pelas estirpes bacterianas

Para avaliar a capacidade das estirpes UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-73 e UFLA02-71 em absorver Zn e Cd, uma alíquota de 1 mL de pré-inóculo bacteriano foi transferida para 100 mL de meio LB com as diferentes concentrações dos metais Zn e Cd [9,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (9,0 Zn + 0,14 Cd); 91,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (90 Zn + 1,4 Cd); 914 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (900 Zn + 14 Cd) e 9140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (9000 Zn + 140 Cd)] e para 100 mL de solução de solo com concentração de 7140 e 222 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e Cd, respectivamente, extraída como descrito anteriormente (item 2.4). Após cultivo a 28°C por 120 horas sob agitação, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos, sendo o pellet bacteriano posteriormente lavado com uma solução de HCl 0,1mol L⁻¹. O pellet foi digerido em um tubo digestor usando HNO₃ segundo a metodologia de USEPA 3050B. A concentração dos metais foi determinada por um Espectrofotômetro de Absorção Atômica, Perker Elmer Analyst 300.

As habilidades de absorção de Cd e Zn pelas estirpes foram mensuradas por meio dos fatores de bioacumulação (FB), que é definido como a concentração do elemento na biomassa da célula em relação à concentração do elemento no meio de cultivo.

$$FB = [\text{Metal}]_{\text{biomassa das células}} / [\text{Metal}]_{\text{meio de cultivo}}$$

2.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Células bacterianas da estirpe UFLA02-71 foram incubadas sob agitação por 120 horas em meio LB com $9140\mu\text{mol L}^{-1}$ ($9000\text{ Zn} + 140\text{ Cd}$) e em meio sem a presença de Zn e Cd, e foram recuperadas através de centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm. O pellet formado foi homogeneizado com ágar fundente, obtendo-se após alguns minutos sua solidificação e consequente formação de pequenos blocos de células, facilitando o manuseio do material. Esse material foi então pré fixado em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato $0,05\text{ mol L}^{-1}$, pH 7.0 + $\text{CaCl}_2\ 0.001\text{mol L}^{-1}$. Após 24 horas, foram lavados em tampão cacodilato $0,05\text{ mol L}^{-1}$ (3 x 10 min) e pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato $0,05\text{ mol L}^{-1}$ por duas horas. Posteriormente, foram lavados em água destilada (3 x 10 min) e desidratados em uma série gradual de acetona, sendo embebidos em resina epoxy Spurr e acetona 100% (1:1) por 5 horas e transferidos para resina pura por uma noite. Em seguida foram transferidos para formas moldes contendo resina e incubados em

estufa a 70° C por 48 horas. Os blocos com resina foram trimados e preparados para ultramicrotomia. Seções ultrafinas (aproximadamente 70 nm) coletadas em telas de níquel cobertas por Formvar foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de crescimento das estirpes de *Cupriavidus necator* UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-71 e UFLA02-73 em meio LB sem a presença de Zn/Cd encontram-se na Figura 1. O máximo crescimento, para as estirpes foi determinado por meio das equações da Figura 1, para as estirpes UFLA01-663 e UFLA01-659 foi de 9,84 e 9,77, e de 9,44 e 9,48 para as estirpes UFLA02-73 e UFLA02-71, respectivamente.

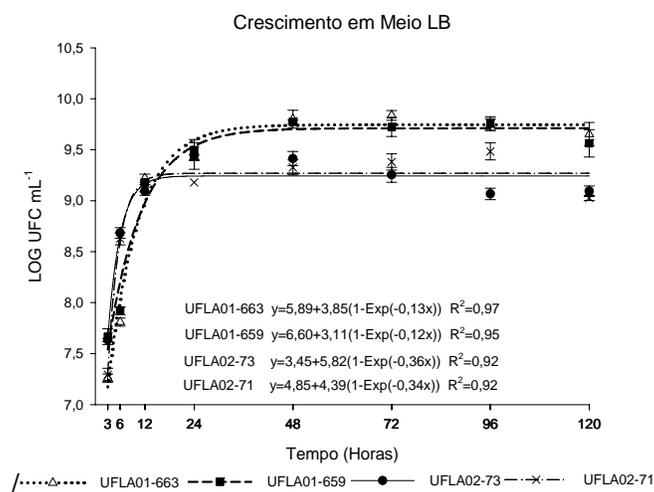


Figura 1. Crescimento das estirpes de *Cupriavidus necator* em meio LB sem a presença de Zn e Cd.

As quatro estirpes apresentaram crescimento diferenciado somente na concentração de $9140 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($9000 \text{ Zn} + 140 \text{ Cd}$) (Figura 2) que foram previamente determinadas de acordo com a extração da solução do solo, mantendo uma relação de Zn:Cd de 64,3. As demais concentrações avaliadas seguiram uma mesma escala logarítmica a partir da concentração encontrada no rejeito da VM, mantendo a mesma relação de Zn:Cd.

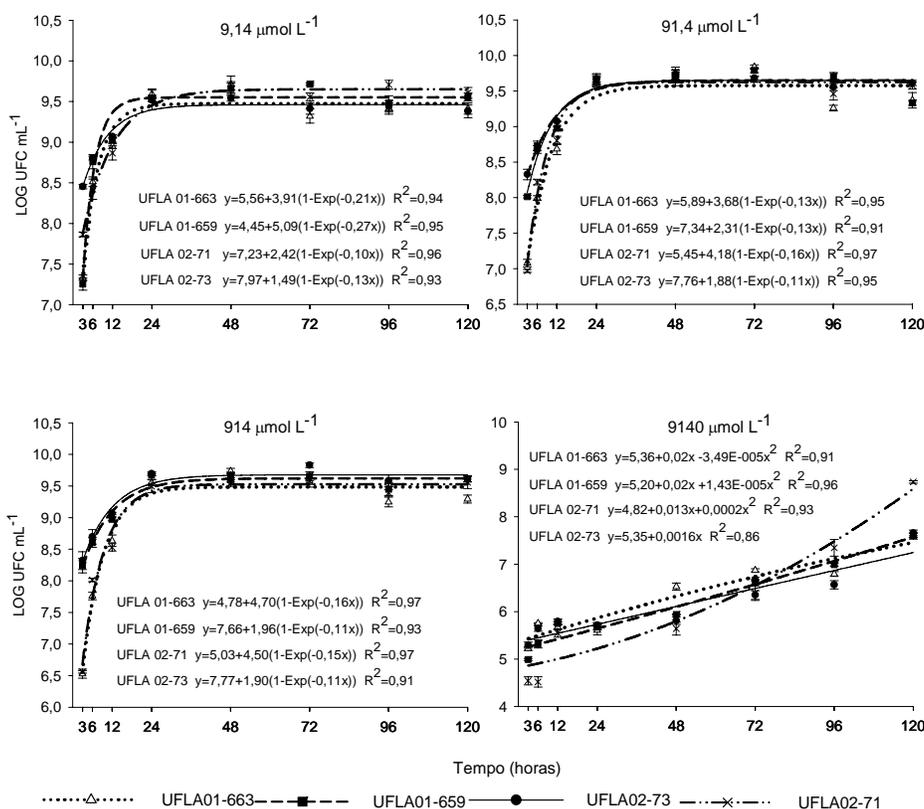


Figura 2. Células viáveis das estirpes UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-71 e UFLA02-73 em meio líquido em função do tempo e das diferentes concentrações de Zn/Cd.

O crescimento das estirpes nas concentrações de 9,14; 91,4 e 914 µmol L⁻¹ de Zn/Cd (Figura 2) seguiu o mesmo padrão de crescimento do meio sem metal (Figura 1). Nessas concentrações as estirpes apresentaram uma fase log até 24 horas, entrando após esse período na fase estacionária. O máximo

crescimento encontrado na fase estacionária na concentração de $914 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd para as estirpes UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-73 e UFLA02-71 foi de 9,73; 9,67; 9,83 e 9,59 UFC mL^{-1} respectivamente. O crescimento das estirpes na concentração de $9140 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd foi significativamente reduzido logo após a inoculação, apresentando um efeito tóxico da alta concentração de Zn e Cd em solução. As estirpes apresentaram um período prolongado de crescimento exponencial que foi observado até as 120 horas de avaliação, não sendo possível distinguir as diferentes fases típicas de uma curva de crescimento bacteriano. Nessa concentração, a estirpe UFLA02-71 apresentou o maior número de LOG UFC mL^{-1} (8,74) depois de 120 horas.

A capacidade de alguns microrganismos crescerem em condições com elevadas concentrações de metais pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos, bem como de outros fatores ambientais do meio (pH, potencial redox, etc.) que também podem reduzir a toxicidade desses metais (Zouboulis et al, 2004; Leedjäv et al, 2008; Xiao et al. , 2010). Sabe-se que os mecanismos de resistência a metais em bactérias são vários, e que esses variam muito pouco entre isolados de ambientes não contaminados para aqueles de ambientes contaminados (Barkay and Schaefer, 2001; Matsuda et al., 2002; Zouboulis et al., 2004), o que explica a capacidade das estirpes analisadas neste estudo em resistir a altas concentrações de metais, mesmo tendo sido isoladas de ambientes não contaminados.

Para avaliar o crescimento destas bactérias em solução de solo, novamente foi necessário realizar o processo de extração dessa solução, uma vez que este experimento demandava um maior volume de solução. As concentrações dos íons encontrados na solução do solo foram (mg L^{-1}): F^- :30,67; Cl^- :3733,53; NO_2^- :16,09; NO_3^- :310,71; PO_4^{2-} :254,44; SO_4^{2-} :1433,62; Na^+ :2960,83; NH_4^+ :378,01; K^+ :448,03; Mg^{2+} :107,32; Ca^{2+} :496,86; Cu^{2+} :0,50; Zn^{2+} :467,00; Cd^{2+} :25,00; Pb^{2+} :0,007; Mn^{2+} :4,40; Fe^{2+} :0,020, carbono dissolvido total:5850,00 e condutividade eletrolítica (mS cm^{-1}):2,907.

No experimento em solução de solo, as estirpes tiveram seu crescimento inicial reduzido devido às altas concentrações de zinco ($7140 \mu\text{mol L}^{-1}$) e cádmio ($222 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 3). O comportamento das estirpes não foi similar ao crescimento típico de uma curva microbiana, até as 120 horas de avaliação. Nesse tempo, as estirpes apresentaram número de UFC mL^{-1} semelhante ao encontrado na fase estacionária no experimento utilizando meio LB suplementado com Zn/Cd nas concentrações de 9,14; 91,4 e 914 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2).

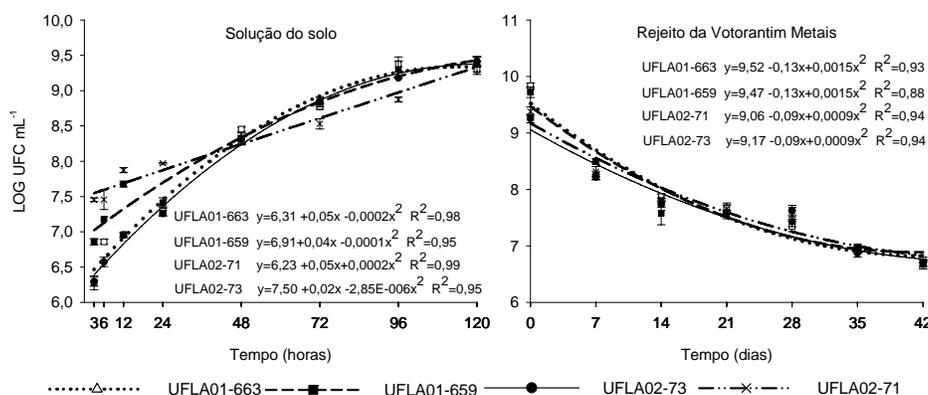


Figura 3. Células viáveis das estirpes UFLA01-663; UFLA01-659; UFLA02-71 e UFLA02-73 em solução do solo e no rejeito puro.

Quando as estirpes foram inoculadas no rejeito puro, houve uma redução no crescimento devido ao alto nível de contaminação do solo. Depois de 42 dias de avaliação, o crescimento das estirpes foi reduzido em 30% do log de células da população original, demonstrando uma alta tolerância dessas estirpes a metais pesados (Figura 3). Matsuda et al. (2002) trabalhando com o mesmo rejeito, porém utilizando diferentes proporções desse solo contaminado, avaliou a sobrevivência de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, e observou o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* em até 45% (1250, 206, 67,5 e 192,5 mg dm⁻³ de Zn, Cu, Cd e Pb, respectivamente) de contaminação. Com relação ao gênero *Azorhizobium*, as estirpes avaliadas toleram apenas 15% (750, 111, 22,1 e 65,1 mg dm⁻³ de Zn, Cu, Cd e Pb, respectivamente) de contaminação. Em outro trabalho, uma estirpe de *Mesorhizobium metallidurans*

inoculada em rejeito de mineração com teores de Zn e Cd de 35000 e 16,5 mg kg⁻¹ respectivamente, manteve um crescimento constante de 10⁴ UFC por grama de solo nos 45 dias de condução do experimento (Mahieu et al., 2011).

No presente trabalho, foi possível estabelecer uma relação entre a tolerância das estirpes de *C. necator* em meio LB suplementado com zinco e cádmio, na solução do solo e no solo contaminado, já que em todas as condições, as estirpes apresentaram alto número de células viáveis. Apesar da redução no número de células das estirpes quando inoculadas no rejeito puro, houve uma boa tolerância das mesmas, visto que as concentrações de metais existentes nesse rejeito (mg dm⁻³ extraídos por Mehlich 1: Pb = 32; Cd = 565; Cu = 343; e Zn = 13694) foram bastante elevadas. Essa baixa redução no número de células pode permitir o estabelecimento da simbiose dessas estirpes com leguminosas em áreas contaminadas com metais pesados, quando um número mais elevados de células forem inoculadas.

Em relação à absorção dos íons Cd e Zn pelas estirpes de *C. necator*, notou-se um aumento da capacidade de acúmulo pelas quatro estirpes à medida que as doses desses metais aumentaram (Figura 4). A quantidade de Zn absorvida por estas estirpes na dose de 9,14 e 9140 µmol de Zn/Cd foram em média 0,16 e 81,49 µmol g célula⁻¹. A quantidade média de Cd absorvida pelas estirpes foi 0,012 e 13,84 µmol g célula⁻¹ nas doses de 9,14 e 9140µmol de Zn/Cd, respectivamente.

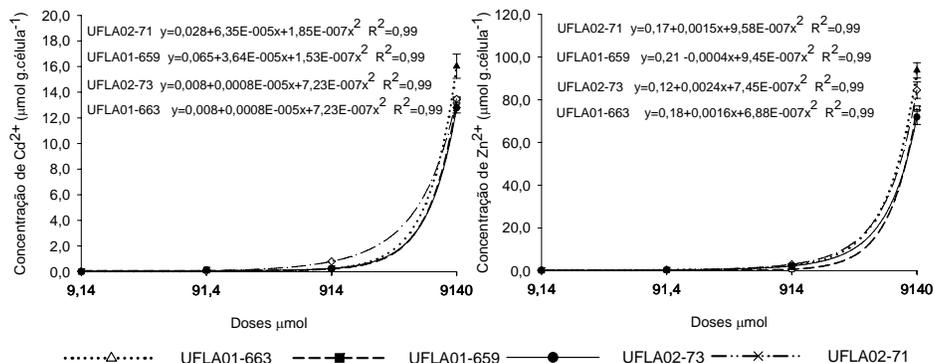


Figura 4. Concentrações de Zn (a) e Cd (b) por estirpes de *Cupriavidus necator* cultivadas sob diferentes doses de Zn/Cd, após 120 horas.

Na dose de 9140 μmol a estirpe UFLA02-71 apresentou maior capacidade de absorção de Zn e Cd em relação às demais estirpes. Essa estirpe absorveu 93,76 μmol g célula⁻¹ de Zn e 16,03 μmol g célula⁻¹ de Cd. A estirpe UFLA02-73 também apresentou alta capacidade de absorção de zinco que foi de 84,48 μmol g célula⁻¹.

Na solução do solo extraída do rejeito puro, a estirpe UFLA02-71 absorveu as maiores quantidades de Cd correspondente a 16,98 μmol g célula⁻¹ enquanto a estirpe UFLA02-73 se destacou na absorção de zinco que foi de 54,53 μmol g célula⁻¹ (Figura 5). Houve um aumento na absorção de Cd pelas estirpes na solução do solo comparado ao meio suplementado com 9140 μmol de Zn e Cd, devido à maior quantidade desse cátion presente e disponível nessa

solução, uma vez que a relação de Zn: Cd foi de 32,16 nessa solução do solo, contribuindo portanto, para a maior absorção de cádmio.

Outros estudos relacionados com a tolerância de espécies bacterianas e a capacidade de absorção a metais pesados têm sido publicados nos últimos anos. Entretanto, estudos com um enfoque prático onde se considera o crescimento de bactérias em soluções de solo extraídas de rejeitos contaminados não é encontrado na literatura atual. Além disso, a investigação de bactérias do gênero *Cupriavidus* como tolerantes a metais tem sido pouco explorada até o momento. No caso de um estudo realizado com a estirpe de *C. taiwanensis* M2 isolada de solos contaminados com metais na Argentina, esta apresentou uma biossorção máxima de 46 e 25% de 0,5 mmol L⁻¹ de Cd e Zn adicionados ao meio de cultivo, o que corresponde a 230 e 125 μmol L⁻¹, respectivamente (Vullo et al., 2008).

Em relação a estirpe de *C. taiwanensis* TJ208 isolada de nódulos de *M. pudica*, foi avaliado diferentemente do nosso trabalho a capacidade de adsorção de íons metálicos por esta estirpe, que apresentou uma capacidade máxima de adsorção estimada em 19,6 mg g⁻¹ de célula para Cd em concentrações de 100 mg L⁻¹ desse metal (Chen et al., 2008), ou seja, 893 μmol L⁻¹.

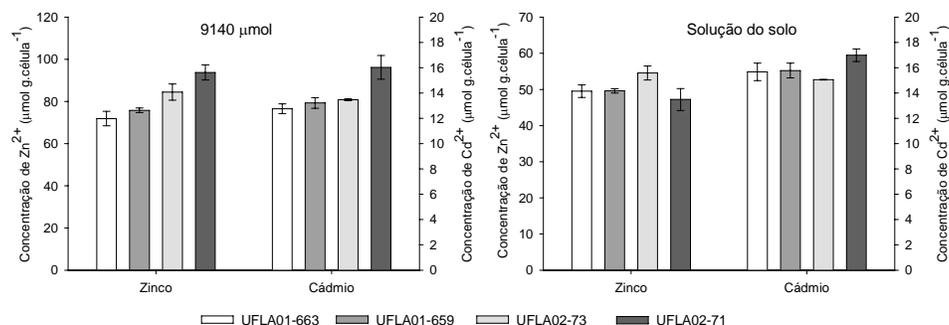


Figura 5. Concentrações de Zn e Cd absorvida pelas estirpes de *Cupriavidus necator* na dose de 9140µmol L⁻¹ de Zn/Cd e na solução do solo extraída do rejeito puro.

Os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os metais pesados englobam aqueles independentes e os dependentes do metabolismo celular. Os independentes ocorrem através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros materiais associados à face externa da membrana. Esta independência ocorre pelo fato de não ser necessário o gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja absorção dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (Gadd, 2004).

O transporte de íons metálicos através da membrana celular e seu acúmulo intracelular são dependentes do metabolismo, ocorrendo somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção desses íons por este tipo de

mecanismo é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-químico. Em contrapartida maiores quantidades de metais podem ser acumuladas (Gadd, 2004), como relatado para as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus metallidurans* e *Bacillus sphaericus* (Ramírez et al., 2008; Velásquez & Dussan, 2009).

A relação da concentração Zn/Cd na biomassa microbiana quando avaliada em meio LB suplementado com as diferentes doses de Zn/Cd variou entre as diferentes estirpes, à medida que houve aumento das concentrações dos metais analisados (Tabela 1). Foi observada uma relação inferior de Zn/Cd na biomassa quando comparada à relação disponível na solução do meio (37,5 expressa em mg Zn/Cd, que corresponde à relação molar Zn/Cd igual a 64,3) em todas as doses estudadas. O menor valor encontrado na relação Zn/Cd na biomassa bacteriana foi de 1,70 para a estirpe UFLA01-659 na concentração 91,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para a estirpe UFLA01-663, a relação Zn/Cd foi menor na dose de 9140 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o que demonstra uma maior absorção por estas estirpes de Cd em relação ao Zn.

Tabela 1. Relação entre os teores (mg kg^{-1}) de Zn/Cd na matéria seca das células das estirpes nas 4 doses avaliadas

Relação Zn/Cd na matéria seca das células				
Estirpes	Doses (mg Zn/ mg Cd)			
	9,14 (9,0 + 0,14)	91,4 (90,0 + 1,4)	914 (900 + 14)	9140 (9000 + 140)
UFLA02-73	11,01	8,56	3,72	6,27
UFLA02-71	12,10	6,23	10,45	5,86
UFLA01-659	28,24	1,70	2,98	5,74
UFLA01-663	24,42	2,67	9,24	5,65

Após 120 horas de incubação em meio LB suplementado com os metais, foi calculado o fator de bioacumulação (FB) para todas as estirpes nas doses avaliadas (Tabela 2). Esse fator foi maior para o Cd quando comparado com o Zn para todas as estirpes, variou de 65,72 a 787,71 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Cd e de 3,04 a 133,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Zn, o que indica que o Cd foi absorvido em maior quantidade que o Zn, demonstrando uma alta capacidade dessas estirpes em acumularem Cd no interior das células.

Tabela 2. Fatores de acumulação para as estirpes de *Cupriavidus necator* expostas a concentrações crescentes de Cd e Zn em meio de cultivo

		Doses de Zn/Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
Estirpes		9,14	91,4	914	9140
		(9,0 + 0,14)	(90,0 + 1,4)	(900 + 14)	(9000 + 140)
		Fator de acumulação			
Zn	UFLA02-73	73,39±1,86	23,88±0,40	19,19±1,70	30,10±2,31
	UFLA02-71	101,47±1,74	22,47±3,64	20,69±1,59	41,90±0,53
	UFLA01-659	63,37±2,77	10,02±0,22	3,04±0,01	34,37±1,89
	UFLA01-663	133,49±13,05	28,10±2,35	15,85±0,57	30,86±2,38
Cd	UFLA02-73	787,71±15,32	180,69±17,53	333,94±21,02	370,17±2,84
	UFLA02-71	539,63±14,31	230,21±2,49	137,16±31,77	459,92±19,28
	UFLA01-659	171,27±6,37	378,48±5,51	65,72±4,14	385,60±30,71
	UFLA01-663	378,71±11,8	678,71±7,78	115,70±22,99	352,07±11,64

O pH da solução desempenha um papel muito importante na absorção e adsorção de metais pelos microrganismos por influenciar na especiação química dos metais em solução, bem como nas propriedades de superfície das células bacterianas (Lopes, et al., 2000; Pardo et al., 2003). Após as 120 horas de crescimento das estirpes em meio LB com metal, foi realizada a leitura do pH final, verificando-se um aumento em relação ao pH inicial ajustado para 6,0 para todos os tratamentos. Nas concentrações de 9,14; 91,4 e 914 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd as estirpes aumentaram o pH em média 2,2 unidades, enquanto que no meio com

9140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd houve um aumento médio de 1,9 unidade no pH. Desse modo, as estirpes por serem capazes de causar uma reação de alcalinização no meio, podem reduzir a solubilidade e atividade dos metais (Alexander, 1977), uma vez que o aumento do pH pode promover a dissociação de grupos hidroxila (OH) dos componentes do meio com predomínio de cargas negativas, as quais se ligam aos metais, diminuindo a disponibilidade e, portanto, a toxidez dos mesmos.

No experimento em solução do solo, as espécies de zinco e cádmio foram determinadas em pH:6,0 e pH:7,86 para verificar as formas disponíveis em solução (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das espécies químicas (%) de Zn e Cd na solução do solo extraída do rejeito da Votorantim Metais antes do crescimento das estirpes (pH:6.0) e depois do crescimento (pH:7.86).

Zinco	pH		Cádmio	pH	
	6.0	7.86		6.0	7.86
Zn ²⁺	8.412	7.877	Cd ²⁺	8.337	7.675
Zn DOM1	83.422	81.423	Cd DOM1	52.163	50.057
ZnF ⁺	0.072	0.070	CdF ⁺	0.057	0.053
ZnCl ⁺	0.747	0.710	CdCl ⁺	24.499	22.61
ZnCl ₂ (aq)	0.039	0.041	CdCl ₂ (aq)	5.420	5.043
ZnSO ₄ (aq)	5.175	4.920	CdSO ₄ (aq)	5.495	5.189
Zn(SO ₄) ₂ ²⁻	1.517	1.414	Cd(SO ₄) ₂ ²⁻	2.496	2.286
ZnNH ₃ ²⁺	0.011	0.836	CdNH ₃ ²⁺	0.024	1.768
ZnNO ₂ ⁺	0.018	0.016	CdNO ₂ ⁺	0.259	0.229
ZnNO ₃ ⁺	0.139	0.127	CdNO ₃ ⁺	0.174	0.146
ZnHPO ₄ (aq)	0.440	2.007	CdHPO ₄ (aq)	1.070	4.801
ZnOH ⁺	-----	0.286	CdOH ⁺	-----	0.022
Zn(OH) ₂ (aq)	-----	0.145	Cd(NH ₃) ₂ ²⁺	-----	0.113
Zn(NH ₃) ₃ ²⁺	-----	0.015	-----	-----	-----
Zn(NH ₃) ₂ ²⁺	-----	0.103	-----	-----	-----

Os íons livres Zn²⁺, Cd²⁺, Zn-DOM1 e Cd-DOM1 diminuíram com o aumento do pH após o crescimento das estirpes, o que pode ter reduzido o efeito tóxico dos mesmos, enquanto que as espécies ZnHPO₄(aq) e CdHPO₄(aq) mostraram aumentos significativos com o aumento do pH de 6 para 7,84. A presença de ZnOH⁺, Zn(OH)₂(aq), Zn(NH₃)₃²⁺, Zn(NH₃)₂²⁺, CdOH⁺ e Cd(NH₃)₂²⁺ foram observadas apenas com o aumento do pH para 7,84.

A toxicidade de zinco e cádmio para *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. tem sido comumente associada com espécies mais biodisponíveis que tem sido consideradas como Cd²⁺ e Zn²⁺ (Worden et al., 2009; Moberly et al., 2010), no

entanto, outras espécies como CdOH^+ e $\text{ZnHPO}_4(\text{aq})$ na solução, também podem apresentar um efeito tóxico sobre os microrganismos. Moberly et al. (2010) verificaram que o aumento da concentração de $\text{ZnHPO}_4(\text{aq})$ com a elevação do pH favoreceu uma maior absorção dessa espécie devido a transportadores específicos para moléculas de fosfatos inorgânicos em *Arthrobacter* sp. No presente trabalho, o aumento nas concentrações de $\text{ZnHPO}_4(\text{aq})$ e $\text{CdHPO}_4(\text{aq})$ com a elevação do pH, também pode ter contribuído para o aumento na absorção desses metais pelas estirpes de *Cupriavidus necator* (Figura 4), como descrito para espécie bacteriana acima citada (Moberly et al., 2010).

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada como tentativa de se investigar a localização celular do acúmulo dos metais para a estirpe UFLA02-71 (Figura 6).

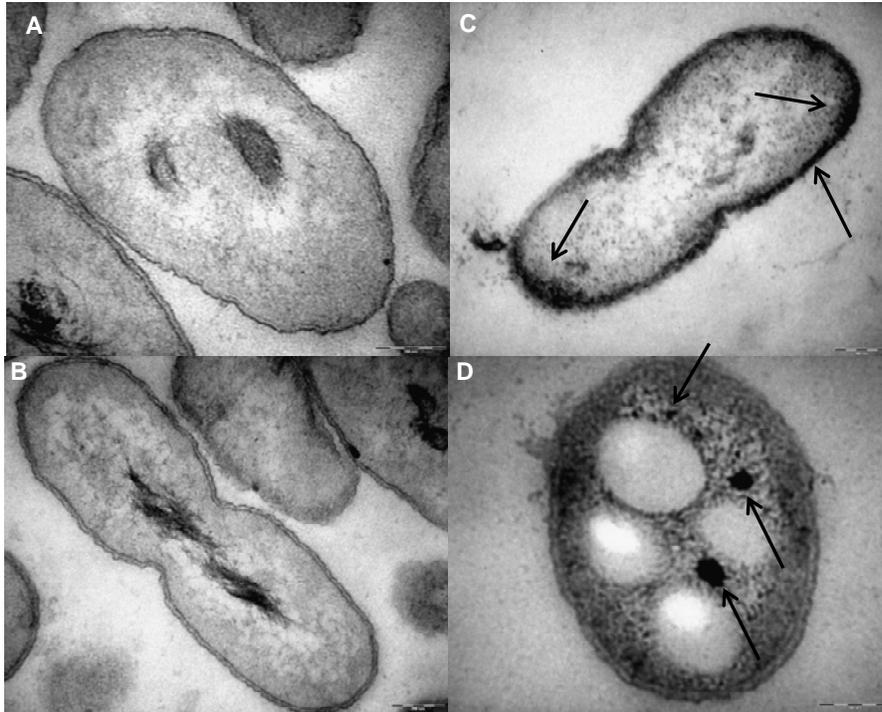


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de secções de células controle (A e B) e cultivadas em 9140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd (C e D) de *Cupriavidus necator* UFLA02-71.

Comparando-se as células controle (sem metal), essas apresentaram um citoplasma homogêneo sem a presença de grânulos eletrodensos e de grânulos de polihidroxibutirato (PHB), enquanto que as células cultivadas no meio com metal apresentaram tanto o acúmulo de PHB quanto a presença de depósitos granulares no citoplasma. Nenhum sinal de lise ou destruição celular foi aparente após as 120 horas de cultivo corroborando com as observações de que

esta bactéria é capaz de acumular elementos tóxicos como Cd e Zn em seu interior. Essa capacidade de acumular intracelularmente metais tóxicos tem sido relatado para vários outros gêneros de bactérias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Acidithiobacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* entre outros (Kazy et al., 1999; Sar et al., 2001; Suzuki et al., 2004; Nedelkova et al., 2007; Merroun & Selenka-Pobell, 2008), na quais o sequestro desses metais está relacionado com as mais diversas estratégias de sobrevivência desenvolvidas por estes microrganismos.

O gênero *Cupriavidus* é conhecido por possuir habilidade de biodegradação e resistência a poluentes orgânicos e inorgânicos, e desta maneira desperta um grande interesse nos campos da biotecnologia ambiental. De acordo com os parâmetros avaliados no presente trabalho, as estirpes de *Cupriavidus necator* analisadas podem apresentam-se como possíveis ferramentas futuras para a recuperação de áreas degradadas por atividades de mineração. Esta tolerância a metais pesados combinada com a capacidade destas estirpes em absorverem esses metais demonstram que algumas estirpes de *Cupriavidus necator* podem ser melhor estudadas para a limpeza de ambientes multi-contaminados.

REFERÊNCIAS

Alexander, M. *Introduction to soil microbiology*. 1977. 2nd edition, John Wiley. 467 p.

Barkay, T., Schaefer, J., 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 318–323.

Bremer, P.J., Geasey, G.G., 1993. Interactions of bacteria with metals in the aquatic environment. In: Rao, S.S. (Ed.), *Particulate Matter and Aquatic Contaminants*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 41–65.

Broos, K., Uyttbroeck, M., Mertens, J., Smolders E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils *Soil Biology & Biochemistry.* 36, 633–640.

Carrasco, J. A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M. A., Lopez, R., Chamber, M. A., and Palomares, A. J. 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Azanalcollar pyrite mine. *Soil Biol. Biochem.*, 37, 1131-1140.

Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Gibbs, P., Chambers, B.J., Carlton-Smith, C., Bacon, J., Campbell, C., Aitken M. 2008. Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biology & Biochemistry*. 40, 1670–1680

Chen, W. M., James, E. K., Prescott, A. R., Kierans, M., Sprent, J. I. 2003a. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact*. 16, 1051-1061.

Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *J Syst Evol Microbiol*. 51, 1729-1735.

Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., Boivin-Masson, C. 2003b. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol*. 185, 7266-7272.

Chen, W. M., Wu, C. H., James E. K., Chang, J. S. 2008. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials*. 151, 364-371.

Cole, M. A., Elkan, G. H. 1973. Transmissible resistance to penicillim G, Neomycin, and cloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 248-253.

Florentino, L. A., Guimarães, A. P., Rufini, M., Silva, K., Moreira, F. M. S. 2009. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci. Agric.*, 66, 667-676.

Fred, E.B., Waksman S.A. 1928. *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book 143.

Gadd, G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*. 122, 109-119.

Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., Vandamme, P. 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia*

metallidurans sp. nov., *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1773–1782.

Kazy, S.K., Sar, P., Asthana, R.K., Singh, S.P., 1999. Copper uptake and its compartmentalization in *Pseudomonas aeruginosa* strains: chemical nature of cellular metal. World J. Microbiol. Biotechnol. 15, 599–605.

Leedjävrv, A., Ivask, A., Virta, M., 2008. The interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bacteriol. 190, 2680–2689.

Lopez, A., Lazaro, N., Priego, J.M., Marques, A.M. 2000. Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24,146–151.

Louie, T. M., Webster, C. M., Xun, L. 2002. Genetic and Biochemical Characterization of a 2,4,6-Trichlorophenol Degradation Pathway in *Ralstonia eutropha* JMP134. J Bacteriol. 184, 3492-3500.

Nedelkova, M., Merroun, M.L., Rossberg, A., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. 2007. *Microbacterium* isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium, FEMS Microbiol. Ecol. 59, 694–705.

Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. 2008. Bacterial interactions with uranium: an environmental perspective, J. Contam. Hydrol. 102, 285–295.

Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. 2011. *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant Soil. 342, 405–417

Matsuda, A., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2002. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. Pesq. agropec. bras. 37, 343–355.

Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., van Gijsegem, F. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J Bacteriol 162, 328–334.

Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Van der Lelie, D., Wattiez, R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev. 27, 385–410.

Miles, A.A., Misra, S.S. 1938. The estimations of the bacteriocidal Power of the blood. Journal Hygiene, 38, 732-749.

Moberly, J.G., Staven, A., Sani, R.K., Peyton, B.M. 2010. Influence of pH and Inorganic Phosphate on Toxicity of Zinc to *Arthrobacter* sp. Isolated from Heavy-Metal-Contaminated Sediments. Environ. Sci. Technol. 44, 7302–7308.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M. 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass *Pseudomonas putida*, Anal. Bioanal. Chem. 37, 26–32.

Raij, B. van., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas Instituto Agrônômico, 2001. 285p.

Ramírez, M., Díaz, C., Vargas, E., Riveros, H., Campos, J., Cervantes, C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21, 321– 332.

Renella, G., Mench, M., Gelsomino, A., Landi, L., Nannipieri, P., 2005. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1498–1506.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2 ed. New York, Cold Spring, Harbor laboratory.

Sar, P., D'Souza, S.F. 2001. Biosorptive uranium uptake by a *Pseudomonas* strain: characterization and equilibrium studies, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 1286–1294.

Silva, K. 2009. Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian Soils. Thesis (Doctor of Microbiology), University of Lavras, MG. 124p.

Sriprang, R., Hayashi, M., Ono, H., Takagi, K., Hirata, K., Murooka, Y. 2003. Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. Appl Environ Microbiol. 69, 1791-1796.

Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K., Murooka, Y. 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. J Biotechnol. 99, 279-293

Suzuki, S.Y., Banfield, J.F. 2004. Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated, Geomicrobiol. J. 21,113–121.

Taghavi, S., Mergeay, M., Nies, D., Van der Lelie, D. 1997. *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. Res. Microbiol. 148, 536–551.

Trannin, I. C.B., Moreira, F.M.S., Siqueira J.O., Lima, A.S. 2001. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre in vitro. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 25, 305-316.

Trefault, N., la Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., Sánchez, M.A., Stuardo, M., González, B. 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environmental Microbiology*. 6, 655–668.

Valls, M., Atrian, S., Lorenzo, V., Fernández, L. A. 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnol.* 18, 661-665.

Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., Peñalosa, J.M., Carpena, R.O. 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut.* 177, 349–365.

Velásquez, L., Dussan, J. 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials* 167, 713–716.

Vullo, DL., Ceretti, H.M., Daniel, M.A., Ramírez, S.A.M., Zalts, A. 2008. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresour Technol* 99, 5574–5581.

Wiegleb, G., Felinks, B. 2001. Predictability of early stages of primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia, Germany. *Applied Vegetation Science*. 4, 5–18.

Worden, C.R., Kovac, W.K., Dorn, L.A., Sandrin, T.R. 2009. Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12 (MG1655). *FEMS Microbiol Lett.* 293, 58–64.

Wu, C.H., Wood, T.K., Mulchandani, A., Chen, W. 2006. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol.* 72, 1129-1134.

Xiao, X., Luo, S.L., Zeng, G.M., Wei, W.Z., Wan, Y., Chen, L., Guo, H.J., Cao, Z., Yang, L.X., Chen, J.L., Xi, Q. 2010. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.* 101, 1668–1674.

Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X., Matis, K.A., 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem.* 39, 909–916.

ARTIGO 2: Eficiência de estirpes de *Cupriavidus necator* em fixar nitrogênio atmosférico simbioticamente com diferentes espécies de leguminosas

Normas da Revista Pesquisa Agropecuaria Brasileira

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de *Cupriavidus necator* em associação com diferentes espécies de leguminosas com potencial para recuperação de áreas degradadas. Em um primeiro experimento, foi avaliada a eficiência em vaso Leonard de quatro estirpes de *Cupriavidus necator* em sete espécies de leguminosas. Em uma segunda etapa três espécies (*Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia*) e duas estirpes (UFLA01-659 e UFLA02-71) foram selecionadas do primeiro experimento e avaliadas em vaso com solo. Em vaso Leonard a inoculação com as estirpes bacterianas proporcionou incrementos de matéria seca da parte aérea de 870% para *M. caesalpiniaefolia* inoculada com a estirpe UFLA02-71, 885% para *M. pudica* e 924% para *L. leucocephala* quando inoculadas com a estirpe UFLA01-659. Essas estirpes quando inoculadas em *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* em vaso com solo apresentaram alta eficiência em fixar nitrogênio, além de serem competitivas com as estirpes de rizóbios nativos do solo. O solo utilizado nesse experimento apresentou uma elevada comunidade

nativa de rizóbios, mas esses foram eficientes em promover o crescimento das espécies *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia*. As estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71 além de apresentarem alta capacidade em fixar nitrogênio, podem ser avaliadas quanto ao seu potencial de utilização em programas de recuperação de áreas degradadas.

Termos para indexação: Áreas degradadas, fixação biológica de nitrogênio, β -proteobactéria.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of *Cupriavidus necator* strains associated with different legume species with potential for recovery of degraded areas. In a first experiment, we evaluated the efficiency in Leonard jar of four strains of *C. necator* in seven species of legumes. In a second step, three species (*Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* and *Mimosa caesalpiniaefolia*) and two strains (UFLA02-71 and UFLA01-659) were selected from the first experiment and evaluated in pots with soil. The inoculation in Leonard jar with the bacterial strains provided increments of shoot dry matter of 870% for *M. caesalpiniaefolia* inoculated with the strain UFLA02-71, 885% for *M. pudica* and 924% for *L. leucocephala* inoculated with the strain UFLA01-659. These strains when inoculated in *L. leucocephala*, *M. pudica* and *M. caesalpiniaefolia* in pots with soil showed high efficiency in nitrogen fixation, and are competitive with indigenous rhizobia strains from the soil. The soil used in this experiment had a high native community of rhizobia, but these were effective in promoting the growth of the species *L. leucocephala*, *M. pudica* and *M. caesalpiniaefolia*. Strains UFLA02-71 and UFLA01-659 presented high ability to fix nitrogen, and can be assessed for potential use in programs to restore degraded areas.

Key words: Degraded areas, biological nitrogen fixation, β -proteobacteria

Introdução

Os processos de exploração do solo por atividades de mineração estão entre os principais responsáveis pela sua degradação, além de causar uma inevitável alteração na paisagem. Nessas áreas, a retirada da vegetação natural, a intensa movimentação do solo e o acréscimo de considerável volume de rejeitos elevam a concentração de elementos potencialmente tóxicos e causam grande impacto sobre os microrganismos, a vegetação e os processos funcionais do ecossistema (Wiegand e Felinks, 2001; Renella et al., 2005).

Assim, a recuperação das áreas degradadas pela atividade de mineração deve ser eficaz e realizada visando acelerar a sucessão natural. Com este propósito, a revegetação tem sido a principal prática para recompor e proteger o solo, evitar a poluição das águas e promover o retorno da biota edáfica. Para garantir o sucesso da recuperação de áreas degradadas, é necessário selecionar espécies vegetais tolerantes a metais pesados e capazes de produzirem grande quantidade de matéria orgânica (Marques et al., 2000). Espécies de leguminosas como as pertencentes aos gêneros *Acacia*, *Mimosa*, *Leucena* e *Enterolobium* têm sido descritas como promissoras para revegetação de solos degradados e a aceleração do processo de sucessão ecológica (Marques et al., 2000, Trannin et al., 2001; Costa et al., 2004; Freire et al., 2010; Chaer et al., 2011).

Neste contexto, a revegetação com leguminosas arbóreas associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂) tem-se mostrado uma técnica

viável para recuperação destes solos. Tais associações favorecem o estabelecimento da cobertura vegetal, funcionando como catalisadoras de importantes funções ecológicas (Costa et al., 2004).

Um sistema de biossorção de metal consistindo na combinação simbiótica entre uma estirpe de rizóbio tolerante a Pb, Cd e Cu, *Cupriavidus taiwanensis*, e sua planta hospedeira *Mimosa pudica* (Chen et al., 2001; Chen et al., 2003a; Chen et al., 2005a) foi recentemente avaliado para a remoção de metais poluentes. As plantas de *M. pudica* inoculadas com a estirpe *C. taiwanensis* TJ208 aumentaram consideravelmente sua capacidade de absorção de Cu, Cd e Pb em 12, 70 e 86% respectivamente, quando comparadas com as plantas não inoculadas (Chen et al., 2008).

Estudos anteriores realizados pelo laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras revelaram que estirpes de *Cupriavidus necator* isoladas de nódulos das plantas iscas *Leucaena leucocephala* e *Phaseolus vulgaris* (Florentino et al., 2009; Silva 2009) apresentam elevada capacidade de crescer em meios de cultura contendo altas concentrações de Zn, Cd, Cu e Pb (dados não publicados). Em trabalhos recentes também foi constatado que a espécie de *Cupriavidus necator* são capazes de formar nódulos efetivos em leguminosas da subfamília Papilionoideae e Mimosoideae (Florentino et al., 2009; Silva 2009). Algumas estirpes de *Cupriavidus necator*, foram capazes de formar nódulos efetivos em *Leucaena leucocephala*,

Phaseolus vulgaris, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Sesbania virgata*, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum* (Silva 2009). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* em associação com diferentes espécies de leguminosas com potencial para recuperação de áreas degradadas.

Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos para avaliar de eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* em associação com diferentes leguminosas. O primeiro experimento foi conduzido de junho a setembro de 2009 em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 7 x 6, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de 7 espécies de leguminosas (*Leucaena leucocephala*, *Enterolobium contorsiliquum*, *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Mimosa pudica*, *Mimosa pigra* e *Mimosa acutistipula*), 4 estirpes de *Cupriavidus necator* (UFLA02-71, UFLA02-73, UFLA01-659 e UFLA01-663) isoladas de nódulos de *L. leucocephala* e *Phaseolus vulgaris* em estudos prévios deste laboratório (Florentino et al., 2009; Silva 2009) e dois controles não inoculados; um com nitrogênio mineral contendo 210 mg de N L⁻¹ de solução e outro com baixa concentração de nitrogênio mineral 21 mg de N L⁻¹ de solução.

As plantas foram crescidas em vasos de Leonard, com a parte superior do vaso contendo uma mistura 1:2 de areia (150 cm³) e vermiculita (300 cm³), e a inferior com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com a seguinte composição por litro de solução: NH₄H₂PO₄ 0,1 mL L⁻¹; KNO₃ 0,6 mL L⁻¹; Ca(NO₃)₂.4H₂O 0,4 mL L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 2 mL L⁻¹; K₂SO₄ 3 mL L⁻¹; Ca(H₂PO₄)₂.H₂O 10 mL L⁻¹; CaSO₄.2H₂O 200 mL L⁻¹; H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnCl₂.4H₂O 1,81 mg L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄.5H₂O 0,08 mg L⁻¹ e Na₂MoO₄.H₂O 0,09 mg L⁻¹, sendo esta diluída quatro vezes. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva, estes foram autoclavados por uma hora, a 121°C.

As sementes foram submetidas a tratamento químico para quebra de dormência seguindo procedimentos adequados para cada espécie e em seguida, foram lavadas com água destilada esterilizada e semeadas num total de quatro sementes por vaso. Posteriormente, foi realizada a inoculação com as estirpes de *Cupriavidus necator* previamente crescidas em meio LB líquido (5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ extrato de levedura, 10 g L⁻¹ triptona), num período de dois dias sob agitação constante a 28°C. Um mililitro de inóculo contendo cerca de 1x10⁹ células bacterianas foi inoculado em cada semente. Sobre a superfície do vaso adicionou-se, uma fina camada de mistura esterilizada de areia:benzeno:parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações. A solução nutritiva dos vasos foi repostada de 15 em 15 dias com solução autoclavada, sendo seu volume completado durante esse período com

água destilada estéril. Dez dias após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se somente duas plantas por vaso.

O segundo experimento para avaliação da capacidade competitiva por sítios de infecção com rizóbios nativos do solo foi conduzido de outubro a dezembro de 2010. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 2 dm³ com solo arenoso (Neossolo Quartzarênico) devido ao baixo teor de matéria orgânica, coletado em Itutinga-MG de uma área com plantio de braquiária. O solo foi coletado na camada arável (0 a 20 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado na peneira de 4 mm de abertura, apresentando as seguintes características químicas: pH_{H2O}= 5,5; P= 1,0 mg dm⁻³ (Mehlich I); K= 44 mg dm⁻³; Ca= 0,2 cmol_c dm⁻³; Mg= 0,1 cmol_c dm⁻³; Al= 0,3 cmol_c dm⁻³; H+Al= 2,1 cmol_c dm⁻³; S.B= 0,4 cmol_c dm⁻³; T= 2,5 cmol_c dm⁻³; V= 16,6% e MO= 1,6 dag kg⁻¹. Para correção deste solo, foi realizada a calagem segundo o método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 40%. Em todas as parcelas foi efetuada uma adubação básica com solução nutritiva contendo 200; 100; 40; 0,8; 1,5; 3,6; 5,0 e 0,15 mg dm⁻³ de K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo respectivamente, sendo a adubação potássica parcelada em duas vezes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de 3 espécies de leguminosas (*Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Mimosa pudica*), 2 estirpes de *Cupriavidus necator* (UFLA01-659 e UFLA02-71

selecionadas do experimento de vaso Leonard) e dois controles não inoculados, um sem nitrogênio e outro com nitrogênio mineral, com duas adubações de 100 mg dm⁻³ de N aplicado na forma de solução, sendo a primeira no plantio e a segunda 30 dias após a emergência.

As sementes foram submetidas a tratamento químico conforme descrito anteriormente para quebra de dormência e em seguida, foram lavadas com água destilada esterilizada e semeadas num total de quatro sementes por vaso. Posteriormente, foi realizada a inoculação com as estirpes de *Cupriavidus necator* como descrito previamente. Após dez dias de germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se somente duas plantas por vaso.

O experimento para determinação do número mais provável (NMP) e para a avaliação da comunidade da população nativa de rizóbios foi realizado, em tubetes de 375 mL contendo uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1, no Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, nos meses de outubro a dezembro de 2010. Foram utilizadas três amostras do solo de Itutinga-MG (utilizado no experimento anterior), as quais foram encaminhadas ao laboratório, para posteriores diluições seriadas decimais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 9, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de 3 espécies de leguminosas (*Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Mimosa pudica*), 7 diluições decimais seriadas em solução salina (8,5 g L⁻¹ de NaCl) de 10⁻¹ a 10⁻⁷ e

dois controles não inoculados. Os controles constaram de um tratamento com nitrogênio mineral contendo 210 mg de N L⁻¹ e outro com baixa concentração de nitrogênio (21 mg de N L⁻¹) em soluções diluídas quatro vezes.

As sementes foram submetidas a quebra de dormência como relatado anteriormente e após dez dias de germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se somente uma planta por tubete. Os tratamentos inoculados receberam 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas obtidas. A solução nutritiva foi aplicada periodicamente depois de autoclavada.

As plantas do experimento em vaso Leonard foram colhidas depois de 90 dias, e os experimentos em vaso com solo e tubetes foram colhidos 60 dias após a semeadura. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos (NN); matéria seca de nódulos (MSN); matéria seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

Para estimar o número mais provável (NMP) de células de rizóbio nas três amostras coletadas, considerou-se positivo, para presença, e negativo, para ausência de nódulos, em cada diluição, usando o programa “Most Propable Number Estimate” (MPNES) (Woomer et al., 1990).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 4.0 (Ferreira, 2003). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de

probabilidade. Os valores das variáveis número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) foram previamente transformados pela fórmula $(X+0,5)^{0,5}$.

Resultados e Discussão

No experimento em vaso Leonard, as estirpes avaliadas de *C. necator* exerceram efeitos significativos e diferenciados na produção de matéria seca da parte aérea das espécies vegetais aos 90 dias após o plantio (Figura 1). Para as espécies *L. leucocephala* e *M. pudica*, a estirpe UFLA01-659 proporcionou efeito positivo na produção de matéria seca da parte aérea, com incrementos relativos que atingiram 924 e 885%, em relação ao tratamento sem nitrogênio, respectivamente. A espécie *M. acutistipula* respondeu positivamente à inoculação com a estirpe UFLA02-73, sendo a produção de matéria seca da parte aérea superior àquela do tratamento que recebeu nitrogênio mineral. As espécies *M. caesalpiniaefolia* e *M. pigra* beneficiaram-se da inoculação com a estirpe UFLA02-71, apresentando produção de matéria seca de 2,23 e 4,17 g vaso⁻¹, enquanto que no tratamento não inoculado esta foi de apenas 0,23 e 1,21 g vaso⁻¹. *E. contorsiliquum* mostrou resposta similar quando inoculado com as quatro estirpes avaliadas em comparação ao tratamento que não recebeu nitrogênio mineral. Para a espécie *A. mangium*, foi verificado um efeito positivo da estirpe UFLA01-663 quando comparado ao tratamento sem nitrogênio.

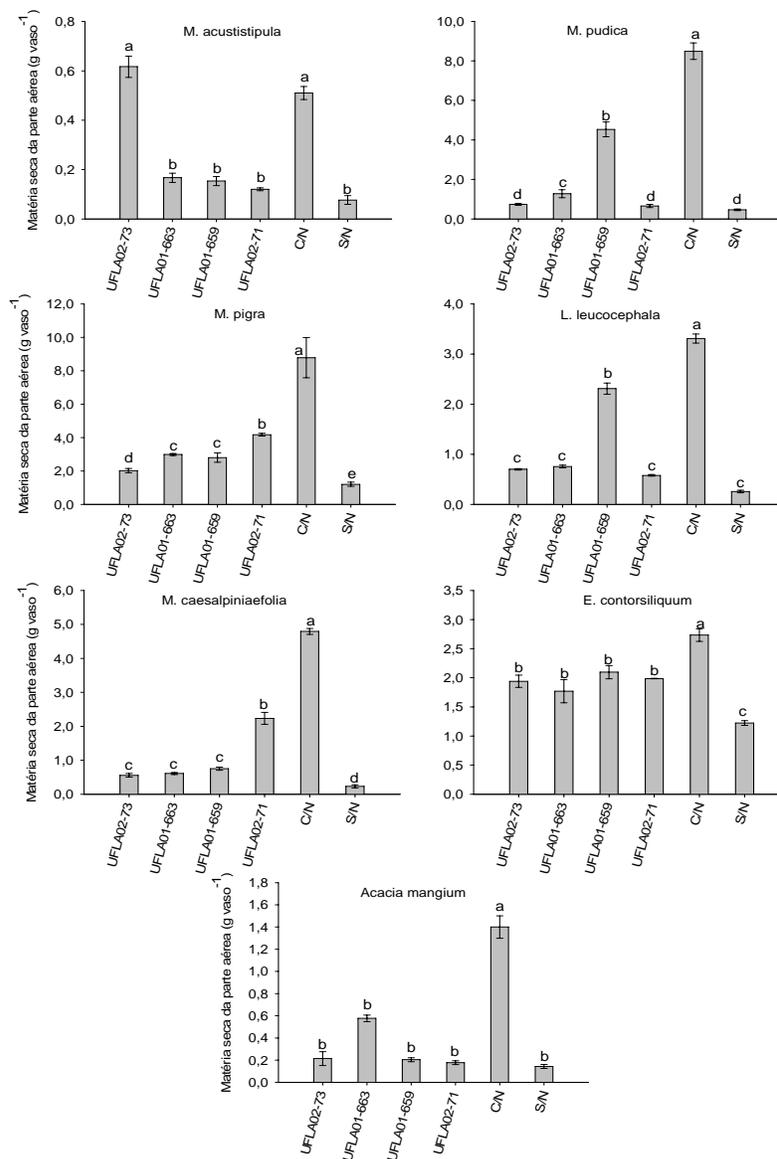


Figura 1. Matéria seca da parte aérea das espécies estudadas, aos 90 dias após a semeadura e inoculada com diferentes estirpes de *Cupriavidus necator*.

Os resultados evidenciam que a inoculação com *C. necator* proporcionou benefícios para as leguminosas avaliadas, principalmente quando foram usadas as estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71 nas leguminosas *M. pudica*, *L. leucocephala* e *M. caesalpiniaefolia*, indicando alta eficiência destas estirpes em fixarem nitrogênio atmosférico. As demais leguminosas apresentaram menores incrementos de matéria seca de parte aérea quando comparadas com as espécies de leguminosas acima citadas.

No trabalho de Freire et al. (2010), a produção de matéria seca em *L. leucocephala* foi avaliada quando inoculada com as estirpes de *Sinorhizobium fredii* SEMIA 6070 e SEMIA 6153, recomendadas como inoculante para essa espécie. Porém, diferentemente do nosso trabalho, o experimento realizado foi conduzido em vaso de Leonard por 30 dias e o mesmo não utilizou testemunha sem nitrogênio, dificultando a comparação dos resultados.

No caso de *M. pudica*, plantas inoculadas com as estirpes LMG19424 de *C. taiwanensis* e STM815 de *Burkholderia phymatum*, em solução nutritiva de Jensen após 3 semanas de cultivo, apresentaram um incremento na produção de matéria seca em comparação com o tratamento sem nitrogênio de 530% e 461% respectivamente (Elliot et al., 2007).

Em relação ao teor de nitrogênio (TN) na parte aérea, os valores variaram de 10 a 34 g kg⁻¹ para *L. leucocephala*, de 11 a 36,5 g kg⁻¹ para *M. caesalpiniaefolia* e de 10 a 30 g kg⁻¹ para *M. pudica*. A estirpe UFLA01-659

aumentou os teores de N para *M. pudica* em 20 g kg⁻¹ e para *L. leucocephala* em 24 g kg⁻¹ e a estirpe UFLA02-71 proporcionou aumentos para *M. caesalpiniaefolia* de 26,5 g kg⁻¹ em relação à testemunha sem nitrogênio mineral.

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea das sete espécies de leguminosas também sofreu influência da inoculação com as estirpes testadas (Figura 2). Para *M. caesalpiniaefolia* e *M. pigra*, a estirpe UFLA02-71 proporcionou maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea em relação às demais. O acúmulo de nitrogênio em *M. pudica* e *L. leucocephala* foi maior quando essas foram inoculadas com a estirpe UFLA01-659. *M. acutistipula* e *A. mangium* apresentaram os menores valores de acúmulo de nitrogênio na parte aérea durante a condução do experimento. Não houve diferença significativa, com relação ao acúmulo de nitrogênio proporcionado pela inoculação com as estirpes avaliadas, nessa última espécie de leguminosa. A estirpe UFLA01-659, quando inoculada em *E. contorsiliquum*, proporcionou um aumento significativo no acúmulo de nitrogênio, estatisticamente superior às demais estirpes e à testemunha sem nitrogênio.

No geral, os resultados analisados para avaliar a fixação de nitrogênio com as estirpes de rizóbio levam em consideração a atividade da nitrogenase pelo método da redução do acetileno. Foi encontrado na literatura o emprego deste teste para as espécies *M. pudica* (Chen et al., 2003b; Chen et al., 2005a;

Barrett & Parker, 2006; Elliot et al., 2007); *M. pigra* (Chen et al., 2005b; Barrett & Parker, 2006; Elliot et al., 2007) *M. acutistipula* e *M. caesalpiniaefolia* (Elliot et al., 2007) não podendo esse método ser comparado com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Para *A. mangium* e *L. leucocephala*, de modo similar ao realizado em nosso trabalho, os autores analisaram o acúmulo de nitrogênio, que foi de 4,65 mg planta⁻¹ para *A. mangium* inoculada com uma estirpe de *Rhizobium* sp. e 5,88 e 4,24 mg planta⁻¹ para as estirpes de *S. fredii* SEMIA 6070 e SEMIA 6153, respectivamente (Freire et al., 2010).

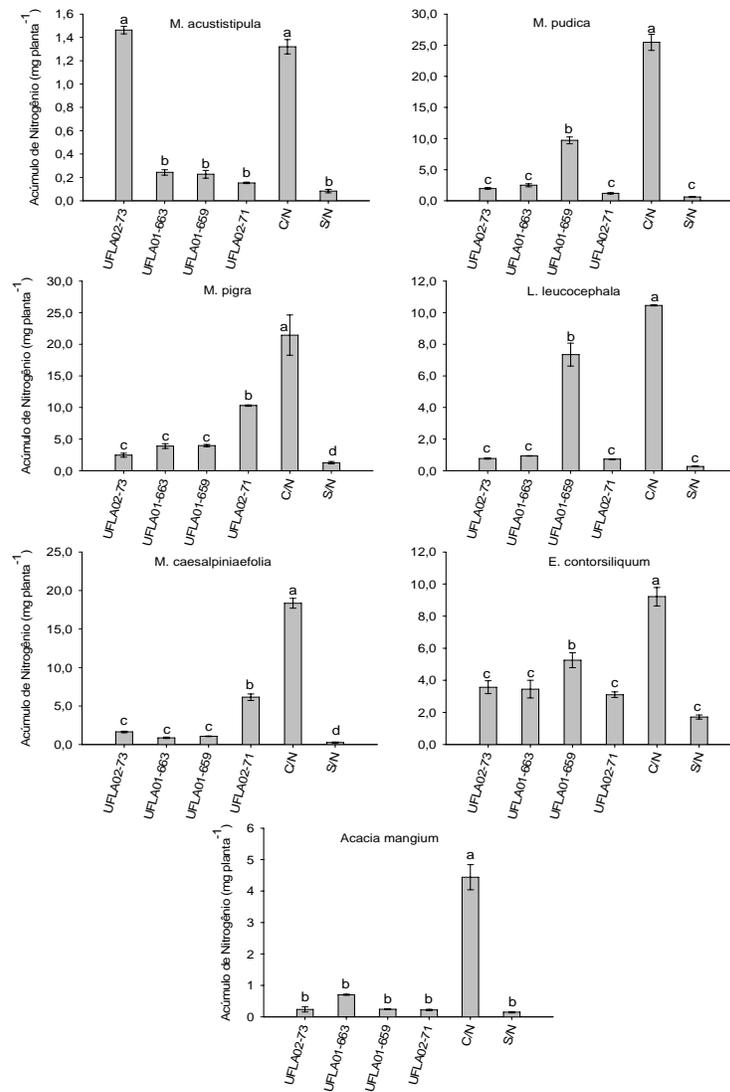


Figura 2. Acúmulo de nitrogênio na parte aérea das espécies estudadas 90 dias após a semeadura e inoculada com diferentes estirpes de *Cupriavidus necator*.

Em relação ao número de nódulos, o tratamento sem nitrogênio não apresentou nódulos no sistema radicular, comprovando a não contaminação desse experimento. As espécies *A. mangium* e *E. contorsiliquum* não nodularam com nenhuma estirpe analisada. Apesar destas duas espécies não nodularem com as estirpes de *C. necator*, todas as estirpes avaliadas para *E. contorsiliquum* e a estirpe UFLA01-663 para *A. mangium* foram capazes de induzir algum crescimento das plantas comparado com o controle com baixo nitrogênio mineral. Uma provável explicação seria a possibilidade dessas estirpes estarem atuando como promotoras de crescimento dessas leguminosas, uma vez que o gênero *Cupriavidus* foi segregado do antigo gênero *Burkholderia* (Sprent, 2008) e existem alguns artigos que comprovam a eficiência de espécies bacterianas deste gênero (*Burkholderia*) como promotoras do crescimento em leguminosas (Peix et al., 2001; Garau et al., 2009; Linu et al., 2009).

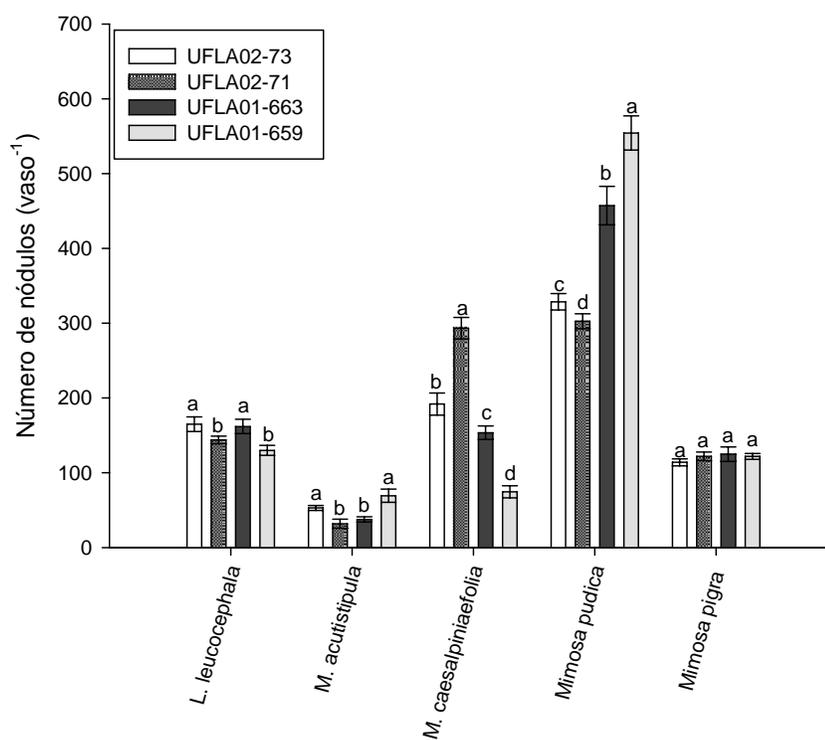


Figura 3. Número de nódulos das espécies estudadas, aos 90 dias após a semeadura e inoculada com diferentes estirpes de *Cupriavidus necator*.

Para a espécie *M. pigra*, não houve diferença significativa entre as estirpes quanto ao número de nódulos (Figura 3). As espécies *M. caesalpiniaefolia*, quando inoculada com a estirpe UFLA02-71, *M. acutistipula* e *M. pudica*, quando inoculadas com a estirpe UFLA01-659, proporcionaram a formação de maiores números de nódulos em relação aos demais tratamentos. Já

a espécie *L. leucocephala* desenvolveu maior número de nódulos quando inoculada com as estirpes UFLA02-73 e UFLA01-663.

A quantificação do número de nódulos avaliados para diferentes leguminosas sofre uma grande variação nos trabalhos encontrados, até mesmo quando se avalia uma mesma estirpe. Isto ocorre principalmente devido ao método utilizado para o cultivo das plantas, e também de acordo com as condições ambientais nas quais os experimentos foram conduzidos, bem como o tempo experimental empregado. Um exemplo é a estirpe de *C. taiwanensis* LMG19424, que quando inoculada em *M. pudica* e *M. pigra*, apresenta uma variação de número de nódulos por planta que vai de 12 a 235 e de 5 a 40, respectivamente (Chen et al., 2005a; Eliot et al., 2007).

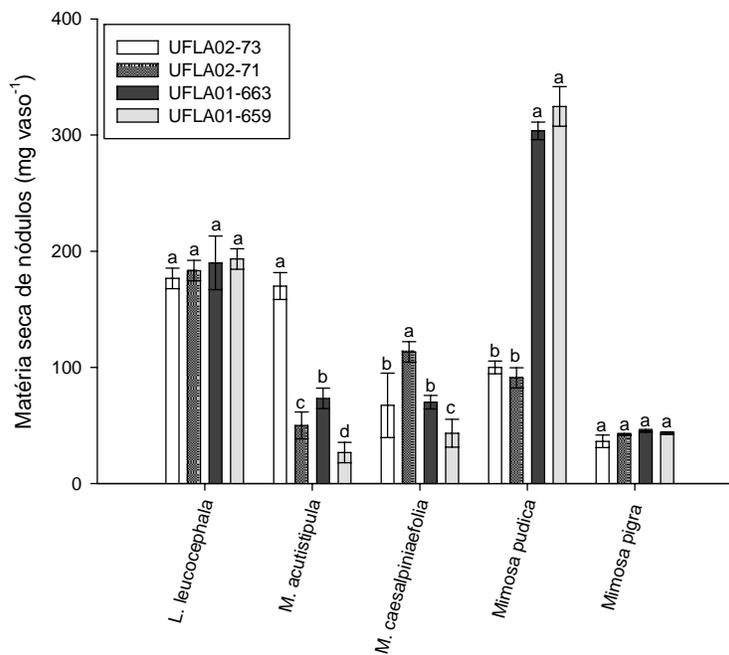


Figura 4. Matéria seca de nódulos das espécies estudadas, aos 90 dias após a semeadura e inoculada com diferentes estirpes de *Cupriavidus necator*.

Para produção de matéria seca de nódulos, não houve diferença significativa para as espécies *L. leucocephala* e *M. pigra* quando inoculadas com as quatro estirpes avaliadas (Figura 4). *M. caesalpiniaefolia*, *M. acutistipula* e *M. pudica*, quando foram inoculadas com as estirpes UFLA02-71, UFLA02-73 e UFLA01-659, apresentaram maior produção de matéria seca de nódulos, respectivamente.

Nem sempre as estirpes que induziram a formação de um maior número de nódulos contribuíram para uma maior produção de matéria seca desses. No entanto, a maior produção de matéria seca de nódulos proporcionou o aumento na produção de matéria seca da parte aérea. Para as cinco espécies de plantas que nodularam com *C. necator*, a matéria seca de nódulos correlacionou-se positivamente com a produção de matéria seca da parte aérea ($r:0,72$; $P\leq 0,05$), porém o número de nódulos correlacionou-se negativamente com a matéria seca da parte aérea ($r:-0,32$ a $P\leq 0,05$). Sendo assim, a matéria seca de nódulos no presente experimento demonstrou-se como um melhor parâmetro para seleção de estirpes em relação ao número de nódulos. Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N fixado biologicamente foram relatadas também por Döbereiner et al. (1966).

Para o experimento em vaso com solo foram selecionadas as espécies *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia*, uma vez que estas apresentaram os maiores incrementos de matéria seca da parte aérea no experimento de vaso de Leonard, inoculadas com as estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71 de *C. necator* que favoreceram estes incrementos. Além disso, *L. leucocephala* é uma das leguminosas arbóreas mais cultivadas do mundo, pois se adapta a diversos tipos de solos, sendo tolerante à seca e à temperatura variável (16 a 32°C). Além de ser utilizada para melhoria dos solos, é aproveitada com diferentes propósitos, incluindo a produção de forragem e adubo orgânico (Parrota, 1992).

O gênero *Mimosa*, além de ocupar os mais diferentes habitats, do seco ao úmido, também tem sido relatado como sendo capaz de crescer nos mais diferentes tipos de solo, sendo ainda uma vegetação predominante da caatinga e do cerrado brasileiro (Mendonça et al., 1998).

Neste experimento, *L. leucocephala* e *M. pudica*, quando inoculadas com a estirpe UFLA01-659 apresentaram incrementos na matéria seca da parte aérea de 119% e 277%, respectivamente, quando comparadas com a testemunha sem nitrogênio (Figura 5). Para *M. caesalpiniaefolia*, quando inoculada com a estirpe UFLA02-71, o aumento na produção de matéria seca foi de 245% em relação à testemunha sem nitrogênio mineral. O incremento na matéria seca da parte aérea de *M. pudica* obtido em nosso trabalho (277%) é superior aos encontrados por outros autores que avaliaram sua simbiose com *Burkholderia* sp (100%), *Cupriavidus* sp (164%) e *Rhizobium* (9%) após 41 dias de cultivos em vaso com solo (Barret e Parker, 2006). *M. caesalpiniaefolia* cultivada em vasos com Latossolo Vermelho-Amarelo e inoculadas com a estirpe SEMIA 6167 (*Burkholderia*) apresentou um aumento de matéria seca de parte aérea de 20% em relação ao tratamento sem inoculação (Burity et al., 2000).

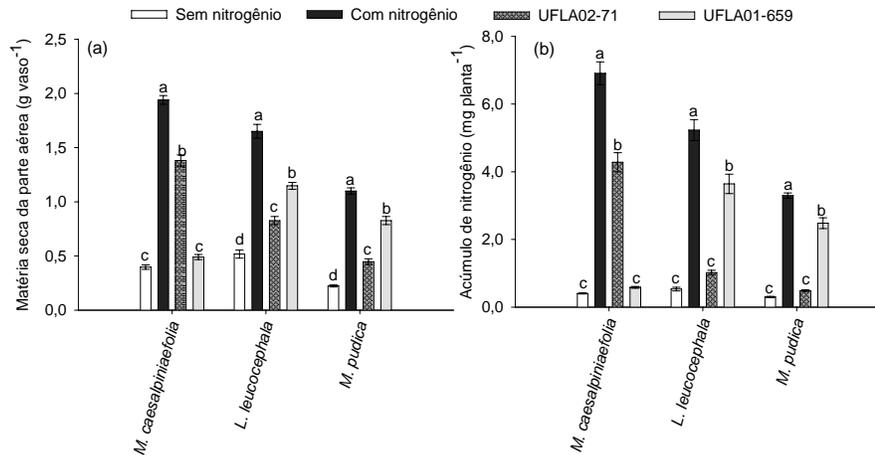


Figura 5. Matéria seca da parte aérea (a) e acúmulo de nitrogênio (b) de três espécies vegetais, submetidas aos diferentes tratamentos, aos 60 dias após a semeadura.

Assim como observado para a produção de matéria seca, os maiores valores de acúmulo de nitrogênio para as espécies *L. leucocephala* e *M. pudica* foram obtidos quando essas foram inoculadas com a estirpe UFLA01-659. Já a estirpe UFLA02-71 quando inoculada em *M. caesalpiniaefolia* proporcionou maior incremento no acúmulo de nitrogênio na parte aérea em comparação com a estirpe UFLA01-659 e a testemunha sem nitrogênio.

Com relação à matéria seca de nódulos, os tratamentos com nitrogênio e sem nitrogênio mineral apresentaram baixos valores em relação aos tratamentos inoculados (Figura 6). Para *M. caesalpiniaefolia*, a inoculação com as estirpes

UFLA02-71 e UFLA01-659 não influenciou a produção de massa de nódulos. Já para as espécies *L. leucocephala* e *M. pudica*, a inoculação com a estirpe UFLA01-659 foi a que proporcionou maior produção de matéria seca de nódulos em relação aos demais tratamentos.

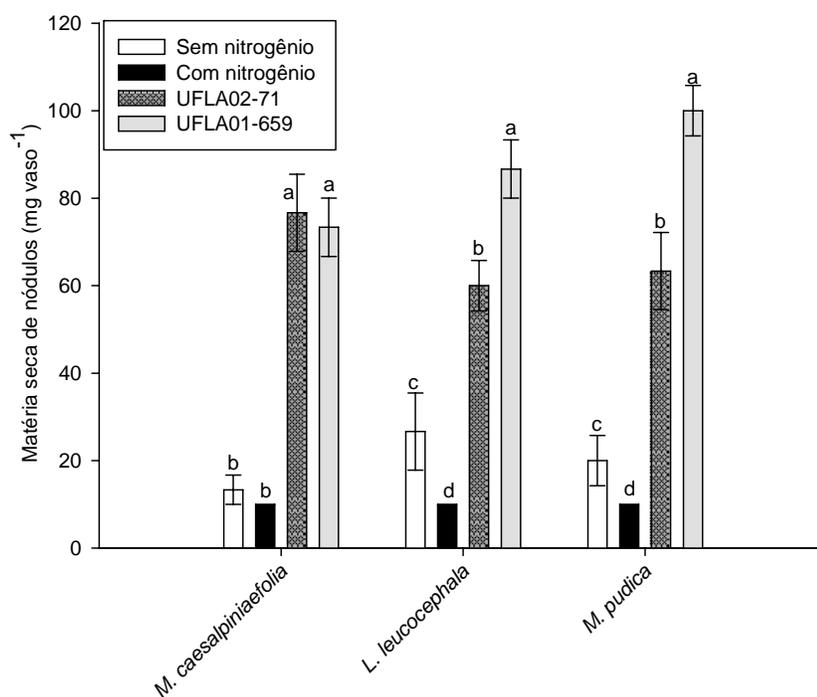


Figura 6. Matéria seca de nódulos de três espécies vegetais, submetidas aos diferentes tratamentos, aos 60 dias após a semeadura.

No ensaio em casa de vegetação com tubetes para avaliação da eficiência simbiótica da população nativa de rizóbio, somente as plantas

inoculadas com suspensão de solo até à diluição 10^3 apresentaram nódulos em seu sistema radicular (Tabela 1).

Tabela 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA)(mg tubete⁻¹) e número de nódulos (NN) de *Leucaena leucocephala*, *M. pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, inoculadas com diferentes diluições do Neossolo Quartzarênico, utilizado no experimento para conferir o efeito da simbiose no experimento anterior.

Tratamentos	<i>Leucaena leucocephala</i>		<i>Mimosa pudica</i>		<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	
	MSPA	NN	MSPA	NN	MSPA	NN
10^{-1}	130 b	22,67 a	105 b	30,67 a	170 b	27,33 a
10^{-2}	127 b	12,00 b	98 b	16,67 b	130 c	21,00 a
10^{-3}	118 b	4,33 c	70 c	6,33 c	110 c	9,33 b
10^{-4}	80 c	0,00 d	40 c	0,00 d	61 d	0,00 c
10^{-5}	70 c	0,00 d	33 c	0,00 d	53 d	0,00 c
10^{-6}	60 c	0,00 d	30 c	0,00 d	50 d	0,00 c
S/N	60 c	0,00 d	30 c	0,00 d	40 d	0,00 c
C/N	630 a	0,00 d	540 a	0,00 d	620 a	0,00 c

Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. S/N= sem nitrogênio; C/N= com nitrogênio.

As inoculações de suspensão de solo até a diluição de 10^{-3} foram capazes de promover o aumento na produção de matéria seca da parte aérea das três espécies estudadas, quando comparadas com as testemunhas que não receberam nitrogênio. A população de rizóbio calculada pelo método das diluições sucessivas variou de $9,1 \times 10^1$ a $1,90 \times 10^3$ rizóbios g solo⁻¹ para *L. leucocephala*; $1,96 \times 10^2$ a $4,3 \times 10^3$ rizóbios g solo⁻¹ para *M. pudica* e $1,58 \times 10^2$ a $3,5 \times 10^3$ rizóbios por g solo⁻¹ para *M. caesalpiniaefolia*, podendo ser esta população considerada alta. A população nativa apresentou um alto número de células, tendo sido eficiente em fixar nitrogênio atmosférico para aumentar a produção de matéria seca da parte aérea, nas três espécies vegetais. Além disso, as estirpes nativas podem competir com as estirpes introduzidas por sítios de infecção nas plantas hospedeira, podendo ser formados nódulos por ambas as estirpes. Se parcela significativa dos nódulos forem formados pela estirpe introduzida (eficientes), a contribuição da fixação biológica de nitrogênio não será afetada.

A habilidade de interação simbiótica com legumes no processo de fixação biológica de nitrogênio era, até 2001, descrita como pertencente apenas aos gêneros bacterianos da classe das α -proteobactérias. No entanto, com a descrição de duas estirpes nodulíferas do gênero *Burkholderia* pertencentes a classe β -proteobactéria, os rizóbios passaram a ser incluídos em duas linhagens filogenéticas distintas (Moulin et al., 2001). Outra espécie, *Cupriavidus*

taiwanensis, também pertencente ao grupo das β -proteobactérias, foi descrita como simbiote dominante dos legumes *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha* em Taiwan (Chen et al., 2003a), demonstrando a necessidade de outros estudos para caracterização da diversidade de rizóbios em diferentes populações de legumes hospedeiros.

De acordo com a necessidade de demais estudos com espécies de β -rizóbios, nosso trabalho focou na capacidade de fixação de nitrogênio da espécie *C. necator*, em leguminosas com potencial de aplicação em áreas degradadas. Nossos resultados fornecem uma forte evidência de que *C. necator* funciona como um simbiote eficiente na fixação de nitrogênio para as leguminosas *L. leucocephala*, *M. caesalpiniaefolia* e *M. pudica*.

Conclusões

A estirpe UFLA01-659 proporcionou maiores aumentos na produção de matéria seca da parte aérea em *Mimosa pudica* e *Leucaena leucocephala* e nas espécies *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Mimosa pigra* a estirpe UFLA01-71 foi mais eficiente em vaso Leonard;

A estirpe UFLA02-71 foi eficiente no processo de fixação biológica de nitrogênio em *Mimosa caesalpiniaefolia* e a estirpe UFLA01-659 foi eficiente em *Mimosa pudica* e *Leucaena leucocephala* em vaso com solo;

As estirpes UFLA02-71 e UFLA01659 foram altamente competitivas com os rizóbios nativos do solo, favorecendo o crescimento das espécies *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Mimosa pudica* e *Leucaena leucocephala*.

Referências

BARRETT, C.F., AND PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol*, v.72, p.1198–1206, 2006.

BURITY, H. A.; LYRA, M. C. C. P.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; SOUZA, E. S.; SILVA, M. L. R. B. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.35, p.801-807, 2000.

CHAER, G. M.; RESENDE, A.S.; CAMPELLO, E.F.C.; FARIA, S.M. & BODDEY, R.M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. *Tree Physiology*, v.31, p.139-149, 2011.

CHEN W-M, JAMES EK, PRESCOTT AR, KIERANS M, SPRENT JI. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.16, p.1051–1061, 2003b.

CHEN W-M, LAEVENS S, LEE TM, COENYE T, DE VOS P, MERGEAY M, VANDAMME P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.1729–1735. 2001.

CHEN W-M, MOULIN L, BONTEMPS C, VANDAMME P, BÉNA G, BOIVIN-MASSON C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*, v.185, p.7266–7272, 2003a.

CHEN, W. M., E. K. JAMES, J. H. CHOU, S. Y. SHEU, S. Z. YANG, AND J. I. SPRENT. Beta-rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly-discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol*, v.168, p.661–675, 2005b.

CHEN, W. M., S. M. DE FARIA, R. STRALIOTTO, R. M. PITARD, J. L. SIMOES-ARAÚJO, J. H. CHOU, Y. J. CHOU, E. BARRIOS, A. R. PRESCOTT, G. N. ELLIOT, J. I. SPRENT, J. P. W. YOUNG, AND E. K. JAMES. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol*, v.71, p.7461–7471, 2005a.

CHEN, W. M.; WU, C. H.; JAMES E. K.; CHANG, J. S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials*, v.151 p.364–371, 2008

COSTA, G. S; FRANCO, A. A; DAMASCENO, R. N; FARIA, S. M. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com Leguminosas arbóreas. *R. Bras. Ci. Solo*, v.28, p.919-927, 2004.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.1, p. 233-237, 1966.

ELLIOTT, G.N., CHEN, W.-M., CHOU, J.-H., WANG, H.-C., SHEU, S.-Y., PERIN, L. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytol*, v.173, p.168–180, 2007

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA, 2003.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci. Agric.*, v.66, p.667-676, 2009.

FREIRE, A. L. O.; RODRIGUES, T. J. D.; MIRANDA, J. R. P. Fixação biológica do nitrogênio e crescimento de plantas de leucena (*Leucaena leucocephala* (lam.) De Wit.) Sob salinidade. *Revista Caatinga*, v.23, p.90-96, 2010.

GARAU, G; YATES, R; DEIANA, P; HOWIESON, J. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.41, p.125–134, 2009.

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

LINU, M. S.; STEPHEN, J; JISHA, M. S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Int. J. Agric. Res.*, v.4, p.79-87, 2009.

MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA F.M.S. & SIQUEIRA J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.35, p.121-132, 2000

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA, M.C.; REZENDE, A.R.; FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p. 286-556.

MOULIN, L; MUNIVE, A; DREYFUS, B; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation fo legume by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, v.411, p.948-950, 2001.

PEIX, A; MATEOS, P. F; RODRIGUEZ-BARRUECO, C; MARTINEZ-MOLINA, E; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p.1927-1935, 2001.

PARROTA, J. A. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Leucaena*, tantan. New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.1992. 8p.

RENELLA, G., MENCH, M., GELSOMINO, A., LANDI, L., NANNIPIERI, P. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biol. Biochem.*, v.37, p.1498–1506, 2005.

SILVA, K. 2009. Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian Soils. Thesis (Doctor of Microbiology), University of Lavras, MG. 124p.

SPRENT, J. I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *Journal of Experimental Botany*, v.59, p.1081–1084, 2008.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.25, p.743-753, 2001

WIEGLEB, G., & FELINKS, B. Predictability of early stages of primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia, Germany. *Applied Vegetation Science*, v.4, p.5–18. 2001.

WOOMER, P.; BENNET, J. & YOST. R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. *Agron. J.*, v.82, p.349-353, 1990.

ARTIGO 3: Efeito de amenizantes em solo contaminado com zinco e cádmio sobre a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas inoculadas com estirpes de *Cupriavidus necator*.

Normas da Revista Journal of Hazardous Materials

Resumo - A preocupação com a contaminação do meio ambiente por metais pesados em áreas de mineração vem crescendo a cada dia, e nesse contexto, a fitorremediação dessas áreas tem sido tema de relevância atual para pesquisa. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de *Cupriavidus necator*, em simbiose com diferentes leguminosas em solo contaminado com Zn, Pb, Cd e Cu, após a aplicação de materiais inorgânicos com características amenizantes. Os amenizantes calcário e silicato de cálcio quando utilizados, proporcionaram aumentos significativos no pH e redução na disponibilidade de Zn e Cd na solução do solo. Essa redução de Zn e Cd proporcionou uma melhor nodulação das três espécies nos diferentes níveis de contaminação (5, 10, 15 e 20%). O aumento da nodulação no sistema radicular pela estirpe UFLA01-659 em *Leucaena leucocephala* e *Mimosa pudica*, e pela estirpe UFLA02-71 em *Mimosa caesalpiniaefolia* aumentaram efetivamente os teores de nitrogênio em 26, 30 e 29 g kg⁻¹, respectivamente na parte aérea das plantas. Os resultados deste trabalho demonstram que a combinação entre

rizóbios-leguminosas-silicato pode representar um fator chave para a recuperação de áreas contaminadas por metais pesados.

Termos para indexação: Áreas degradadas, fixação biológica de nitrogênio, β -proteobactéria, silicato.

ABSTRACT

The worrying about environmental contamination by heavy metals in mining areas is growing every day, and in this context, the phytoremediation of these areas has been a topic of current relevance for research. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of strains of *Cupriavidus necator*, in symbiosis with various legumes in soil contaminated with Zn, Pb, Cd and Cu, after application of inorganic materials with ameliorating effects. The amendments lime and calcium silicate when used, provided significant increases in pH and a reduction in the availability of Zn and Cd in the soil solution. This reduction in Zn and Cd provided better nodulation of the three species at different levels of contamination (5, 10, 15 and 20%). The increase in root nodulation by strain UFLA01-659 in *Leucaena leucocephala* and *Mimosa pudica*, and in *Mimosa caesalpiniaefolia* by the strain UFLA02-71 effectively increased the nitrogen at 26, 30 and 29 g kg⁻¹ respectively in the shoots of these legumes. The results of this study demonstrate that the combination of rhizobia-legume-silicate can be a key factor for the recovery of contaminated areas by heavy metals.

Key words: Degradated areas, biological nitrogen fixation, β -proteobacteria, silicate

Introdução

A contaminação por metais pesados como cádmio, cobre, chumbo e zinco no solo, provenientes de atividades de mineração, causa sérias consequências ambientais e impactos à saúde pública devido a sua toxicidade e capacidade de bioacumulação (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007). Nesses solos, para que ocorra o crescimento de plantas, torna-se necessário, portanto, a redução da disponibilidade desses metais (Kumpiene et al., 2008).

Nesse contexto, a aplicação de amenizantes atua de maneira benéfica por mitigar a fitotoxidez desses elementos, a fim de reduzir o risco de contaminação das águas subterrâneas, a absorção pelas plantas, e a exposição a organismos vivos, propiciando condições para o desenvolvimento da vegetação (Castaldi et al., 2005; Tandy et al., 2009). Vários materiais amenizantes têm sido estudados nas mais diversas condições, a exemplo de fosfatos, calcário, óxidos de Fe e Mn, aluminossilicatos, argilas e escórias e materiais orgânicos, como lodos (Walker et al., 2003; Li et al., 2008; Accioly et al., 2009; Ribeiro Filho et al., 2011). Em geral, materiais com alta capacidade de retenção superficial fornecem efeitos mais duradouros e estáveis (Ribeiro Filho et al., 2011). A aplicação de calcário é considerada a técnica mais antiga e mais utilizada para imobilizar metais no solo, mas seu efeito tem uma baixa longevidade e esta prática precisa ser repetida, com altas taxas de aplicação para permanecer efetiva (Ribeiro-Fillho et al., 2011). Silicatos de cálcio e magnésio também podem ser

compostos efetivos na redução da fitotoxicidade de metais no solo, uma vez que o silício é mediador de efeitos na nutrição de plantas e na tolerância a metais (Chen et al., 2000; Cheng & Hseu, 2002; Ma, 2004; Shi et al., 2005; Accioly et al., 2009; Ribeiro-Filho et al., 2011).

Além da utilização de compostos amenizantes, as interações mutualísticas entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas nestes solos contaminados podem desempenhar papel de grande importância na restauração desses ecossistemas (Van der Heijden et al., 2006). Apesar de altas concentrações de Zn e Cd poderem limitar a nodulação (Trannin et al., 2001; Chaudhary et al., 2004) ou inativar a fixação biológica de nitrogênio devido a formação de nodulos ineficientes (McGrath et al., 1988), alguns trabalhos têm revelado que certas associações simbióticas podem ser eficientes na fixação de nitrogênio em solos contaminados (Giller et al., 2009). Assim, a seleção de associações simbióticas entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas tolerantes a metais pesados se reveste de grande importância para o acúmulo de nitrogênio e aumento de matéria orgânica no solo, uma vez que os solos contaminados tendem a apresentar baixos teores de matéria orgânica. Em trabalhos realizados com a simbiose entre *Mesorhizobium metallidurans* e a leguminosa *Anthyllis vulneraria* em solo contaminado com Zn, Cd e Pb, foi possível observar um aumento significativo dos níveis de nitrogênio total na planta e no solo (Frérot et al., 2006; Mahieu et al., 2011). Outra bactéria isolada

de áreas de mineração capaz de tolerar altas concentrações de metais pesados é a espécie *Cupriavidus metallidurans*, que tem sido considerada como espécie modelo na tolerância a metais (Mergeay et al. 2003; Vaneechoutte et al. 2004), nodulando eficientemente a espécie hospedeira *Mimosa pudica* (Chen et al., 2008).

Diante do exposto, pode-se notar que a combinação de amenizantes, bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas tolerantes ao acúmulo de metais compõe-se de uma alternativa promissora para reabilitação de solos degradados por atividade de mineração. Além do mais, são poucos os trabalhos que têm explorado até o momento a capacidade benéfica dessas interações. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de *Cupriavidus necator*, em simbiose com diferentes leguminosas em solo contaminado com Zn, Pb, Cd e Cu, após a aplicação de materiais inorgânicos com característica amenizante.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, no período de Fevereiro a Abril de 2011. As leguminosas estudadas foram *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, sendo que cada espécie constituiu um experimento.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (5 x 3) em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições, onde foram analisados cinco níveis de contaminação combinados com dois amenizantes e um controle sem amenizante. Os níveis de contaminação foram obtidos pela mistura de solo multi-contaminado por Zn, Cu, Pb e Cd, coletado em área de rejeito da Votorantim Metais-VM, com um solo não contaminado, coletado em cerrado nativo na região de Paracatu-MG, de modo a se obter entre eles proporções de 0; 5; 10; 15 e 20% (v/v). As misturas de solos foram colocadas em vasos de polietileno de 1,5 dm³ e procedeu-se à calagem com calcário dolomítico (PRNT 100%, 14% de MgO e 35% de CaO) para elevar o pH do solo a valores próximos de 6,0.

As doses dos amenizantes calcário (60 g vaso⁻¹) e silicato de cálcio (6,4 g vaso⁻¹) empregadas neste estudo foram definidas a partir de trabalhos de Accioly et al. (2004) e Accioly et al. (2009), cujas doses proporcionaram benefícios para o crescimento do eucalipto no mesmo solo empregado no presente estudo. Após a aplicação do silicato de cálcio e do calcário dolomítico, o solo foi homogeneizado e incubado por 30 dias, com umidade em torno de 60% do VTP; sendo posteriormente retiradas amostras de cada vaso para determinação dos metais pesados, pelo extrator Mehlich-1 (Tabela 1) e por solução de solo.

Tabela 1. pH do solo, teores de Ca e Mg ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$), P, Zn, Cu, Cd e Pb (mg dm^{-3}) extraídos por Mehlich-1, e silício extraído em CaCl_2 $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$, após aplicação de calcário dolomítico e silicato de cálcio, antes do transplântio das mudas para os solos com diferentes níveis de contaminação.

Sem amenizantes									
Doses*	pH	Ca	Mg	P	Zn	Cu	Cd	Pb	Si
0	6.3	3.0	1.1	30,7	2.9	2.0	0.8	0.9	2,9
5	5.1	1.2	0.8	3,7	985.3	91.4	7.5	15.7	4,4
10	5.5	1.7	1.0	5,2	2222.8	199.3	16.9	39.9	5,4
15	5.5	1.8	0.8	8,9	3336.0	359.2	27.3	45.5	5,9
20	5.7	1.6	0.8	9,6	3920.7	415.9	30.4	62.6	6,4
Calcário dolomítico									
	pH	Ca	Mg	P	Zn	Cu	Cd	Pb	Si
0	7.9	8.7	1.3	5,2	0.7	1.4	0.3	0.6	3,7
5	7.9	8.6	1.1	4,6	821.2	78.9	6.3	10.4	3,9
10	7.3	8.3	1.0	5,9	1391.9	150.2	14.1	27.8	4,8
15	7.6	7.9	1.1	7,5	2153.8	246.5	22.9	30.2	5,5
20	7.8	8.2	0.9	7,2	2284.1	252.3	25.8	35.1	4,8
Silicato de cálcio									
	pH	Ca	Mg	P	Zn	Cu	Cd	Pb	Si
0	7.1	5.4	2.0	4,6	0.9	2.0	0.4	0.5	10,6
5	7.9	8.7	1.2	4,6	747.5	62.9	5.8	8.4	11,3
10	7.3	5.8	2.0	10,0	2045.0	189.0	16.6	32.6	13,7
15	7.2	6.0	2.0	11,5	2620.0	306.1	24.7	41.6	10,7
20	7.9	5.7	1.9	10,5	3329.5	352.5	28.6	51.6	12,4

*percentagem de solo contaminado na mistura.

As sementes foram submetidas a tratamento químico para quebra de dormência seguindo procedimentos adequados para cada espécie e em seguida, foram lavadas com água destilada esterilizada e semeadas. As mudas foram formadas em bandejas com areia e vermiculita esterilizadas, sendo transplantadas duas mudas por vaso, 20 dias após a germinação das sementes. Foi feita adubação de plantio de 200 mg kg^{-1} de P, 200 mg kg^{-1} de K e $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ de B, e a adubação nitrogenada foi realizada com a inoculação da estirpe de *Cupriavidus necator* UFLA01-659 (Florentino et al.,2009; Silva 2009) para

Leucaena leucocephala e *Mimosa pudica*, e com a estirpe UFLA02-71 (Florentino et al.,2009; Silva 2010) para *Mimosa caesalpiniaefolia*, devido a alta eficiência simbiótica e tolerância a Zn e Cd como discutido no capítulo anterior. Durante o transplântio das mudas, foi realizada a inoculação com as estirpes de *C. necator* previamente crescidas em meio LB (5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ extrato de levedura, 10 g L⁻¹ triptona), num período de dois dias sob agitação constante a 28 °C. Um mililitro de inóculo contendo cerca de 1x10⁹ células bacterianas foi inoculado no sistema radicular das mudas.

Ao final de 60 dias após o transplântio, determinou-se o diâmetro do colo e a altura das plantas que, em seguida, foram colhidas, cortando-se a parte aérea rente ao solo, sendo o material colhido lavado com água destilada. As raízes foram separadas do solo, lavadas em água corrente até a completa remoção do mesmo e posteriormente lavadas com uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e, finalmente, lavadas em água destilada. Foi determinado o número de nódulos e a matéria seca de nódulos. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60–70°C, até atingir peso constante.

O material foi digerido em um tubo digestor usando HNO₃ segundo a metodologia de USEPA 3050B. A concentração dos metais foi determinada por um espectrofotômetro de absorção atômica, Perker Elmer Analyst 300. O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR Lichen proveniente do

Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 78% para Cd e de 84% para Zn.

As habilidades de absorção e translocação de Cd e Zn pelas plantas foram mensuradas por meio dos fatores de bioacumulação (FB) e do índice de translocação (IT), que são definidos como a concentração do elemento na planta em relação à concentração do elemento no solo e a quantidade do elemento na parte aérea em relação à quantidade total do elemento na planta, respectivamente. Para os cálculos dos fatores de bioacumulação, foram utilizadas as concentrações dos elementos presentes na solução do solo.

$$FB = [\text{Metal}]_{\text{parte aérea}} / [\text{Metal}]_{\text{solução do solo}}$$

$$IT = [\text{Metal}]_{\text{parte aérea}} / [\text{Metal}]_{\text{raízes}}$$

Os dados foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003), e as equações de regressão foram determinadas pelo melhor ajuste, por meio do programa Table Curve 2D for Windows v. 5.01 (SYSTAT Software Inc). Posteriormente, os atributos analisados foram submetidos à análise de componentes principais (ACP), com o auxílio do programa CANOCO versão 4.5 (Ter Braak & Smilauer, 1998).

Resultados e Discussão

Efeito dos amenizantes no pH e na disponibilidade de Zn e Cd.

Nos diferentes níveis de contaminação, quando não houve a aplicação de silicato ou calcário, o pH do solo variou de 5,0 a 6,0 (Tabela 1). Entretanto, quando foi aplicado calcário e silicato, o pH do solo atingiu valores superiores a 7. A aplicação de calcário proporcionou maiores reduções de Zn e Cd no solo extraídos pela solução de Mehlich-1 em relação ao silicato. Apesar do calcário e do silicato terem apresentado capacidade de reduzir os teores de Zn e Cd no solo, a utilização do extrator Mehlich-1 pode disponibilizar esses metais ligados a hidróxidos e carbonatos que não estariam disponíveis às plantas, podendo superestimar os teores destes metais pesados em solos contaminados que receberam elevadas doses de calcário e silicato.

Os valores de pH determinados na solução do solo em função dos diferentes níveis de contaminação para as amostras não tratadas e contendo os amenizantes calcário e silicato encontram-se na figura 1.

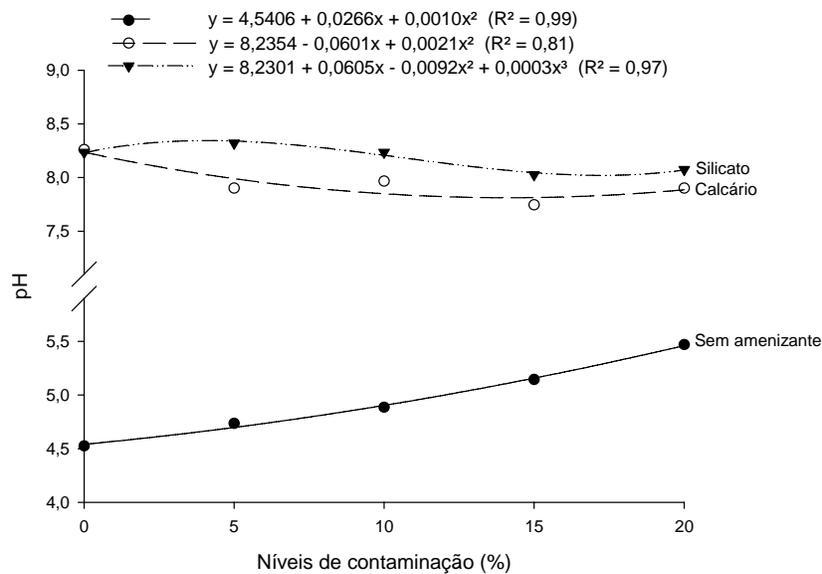


Figura 1: Valores de pH determinados na solução do solo extraída após a incubação com os amenizantes silicato e calcário.

Foi possível notar o elevado poder neutralizante do calcário e do silicato, visto que as curvas que representam esses tratamentos estão com valores de pH bem superiores àqueles da curva do tratamento sem amenizante. Estudos realizados por Accioly et al. (2004, 2009) demonstraram que a aplicação de diferentes doses de calcário e silicato em solo contaminado com níveis distintos de Zn e Cd também acarretaram em aumentos significativos dos valores de pH. Tendo em vista a influência do pH sobre a disponibilidade dos elementos químicos, inclusive o Cd e o Zn, ressalta-se que esses resultados de aumento de pH atuaram de maneira expressiva na disponibilidade ou concentração desses elementos catiônicos em solução (Figura 2).

Através da figura 2 verificou-se inicialmente, que a concentração de Zn determinada na solução dos solos foi superior a de Cd, mais especificamente, 100 vezes maior, o que resultou em uma relação Zn/Cd de 100/1.

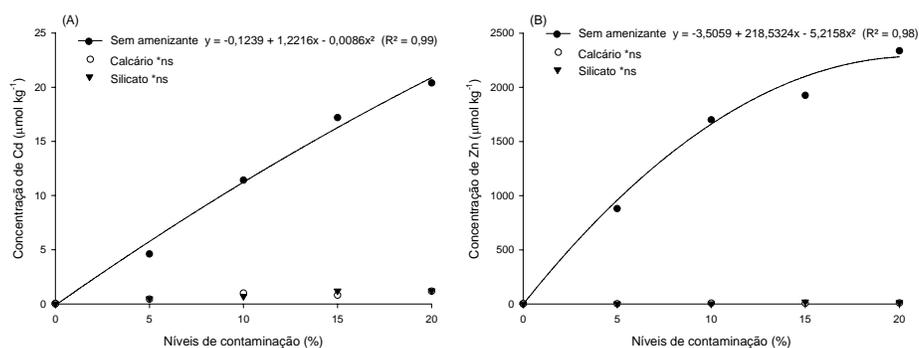


Figura 2. Concentração de Cd (A) e Zn (B) determinada na solução do solo extraída após a incubação dos amenizantes com os solos. * não significativo

Foi possível notar para os tratamentos sem amenizante, que à medida em que se aumentaram os níveis de contaminação, os teores, tanto de Cd quanto de Zn, foram progressivamente aumentados. Entretanto, observou-se que, quando foram aplicados os amenizantes (calcário ou silicato), a disponibilidade de Zn e Cd foi reduzida significativamente, obtendo-se concentrações próximas de zero para os dois cátions, independentemente do nível de contaminação existente. Tais resultados corroboram com os encontrados por Ribeiro Filho et al. (2011) quando aplicaram silicato em solo contaminado por Zn e Cd.

Além de processos como o de adsorção, que pode estar ocorrendo quando se aplicam os amenizantes, essa elevada eficiência em reduzir a disponibilidade dos cátions foi alcançada devido ao grande poder neutralizante do calcário e do silicato (Figura 1), pois, como já ressaltado, o aumento do pH diminui consideravelmente a disponibilidade de elementos catiônicos, a exemplo do Zn e Cd.

Nodulação

O número de nódulos nas raízes das três espécies foi significativamente ($P < 0,05$) influenciado pelos amenizantes e níveis de contaminação e pela interação desses fatores.

O número de nódulos nos tratamentos que não receberam amenizantes, com o aumento dos níveis de contaminação apresentaram uma redução significativa para as três espécies testadas (Figura 3). O número de nódulos após aplicação de calcário nos diferentes níveis de contaminação, não apresentou um ajuste matemático adequado para *Leucaena leucocephala* e *Mimosa caesalpiniaefolia*. Entretanto, após a aplicação de calcário e silicato nos diferentes níveis de contaminação, houve um aumento no número de nódulos nas três espécies. As espécies *M. caesalpiniaefolia* e *M. pudica* apresentaram melhor formação de nódulos em seu sistema radicular quando foi aplicado silicato no solo. No nível de 20% de contaminação a aplicação de silicato proporcionou aumento no

número de nódulos de 1250, 1100 e 1000% para *Leucaena leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* respectivamente. A aplicação de silicato, além de reduzir a disponibilidade de Zn e Cd em solução (Figura 1), aumentou a disponibilidade de fósforo (Tabela 1) quando comparado ao calcário nos diferentes níveis de contaminação, o que pode ter contribuído para uma melhor nodulação. Como a fixação biológica de nitrogênio é um processo que demanda grande quantidade energética, a maior disponibilidade de fósforo contribui para uma melhor formação e desenvolvimento dos nódulos, aumentando sua atividade e causando simultâneos aumentos nesse processo (Sa & Israel, 1991).

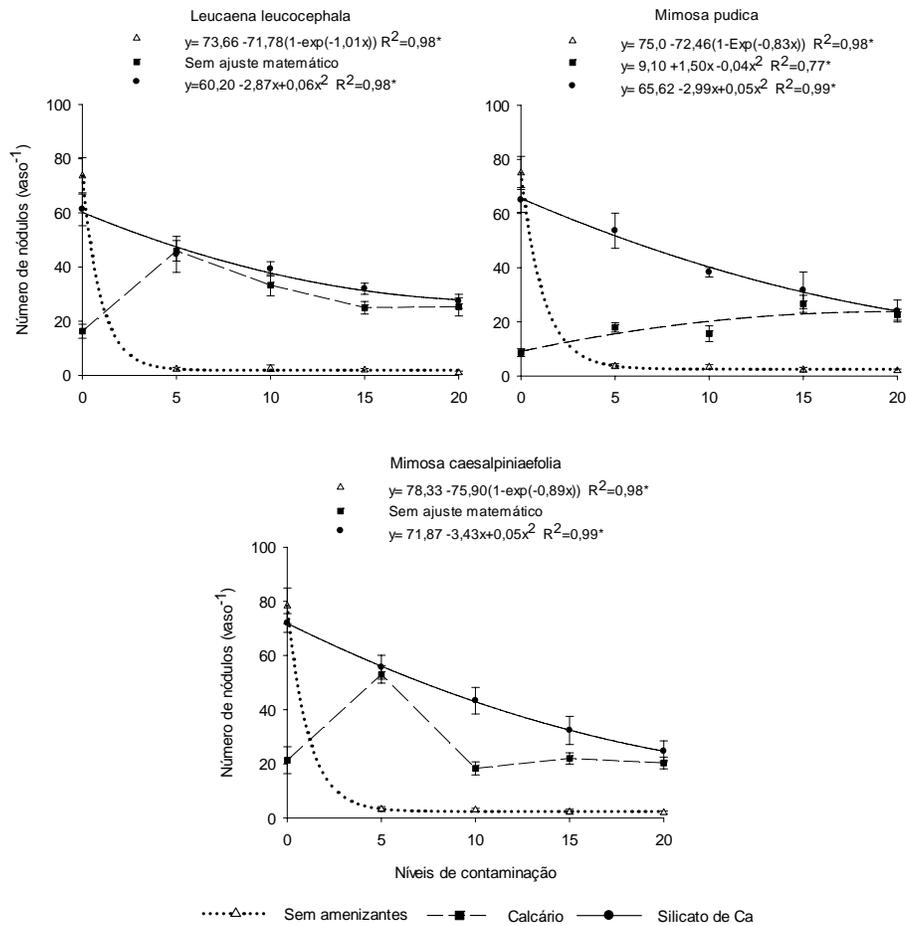


Figura 3. Número de nódulos em *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em diferentes níveis de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante. * Significativo a 5% de probabilidade.

Matéria seca da parte aérea e sintomas de toxidez

Quanto à produção de matéria seca da parte aérea, nos solos sem aplicação de amenizantes, *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* tiveram sua produção de matéria seca reduzida com o aumento dos níveis de contaminação (Figura 5). Ambas as espécies cultivadas em solo sem a aplicação de amenizantes apresentaram alguns sintomas de fitoxidez como: redução do crescimento, clorose foliar seguida de necrose e morte apical induzindo brotamento lateral, que evoluíram até os 60 dias de condução do experimento (Figura 4). O fato das plantas estarem absorvendo Zn e Cd continuamente resulta em surgimento de efeitos fitotóxicos provocados por esses metais além de distúrbios fisiológicos (Cunha et al., 2008; Accioly et al., 2009).

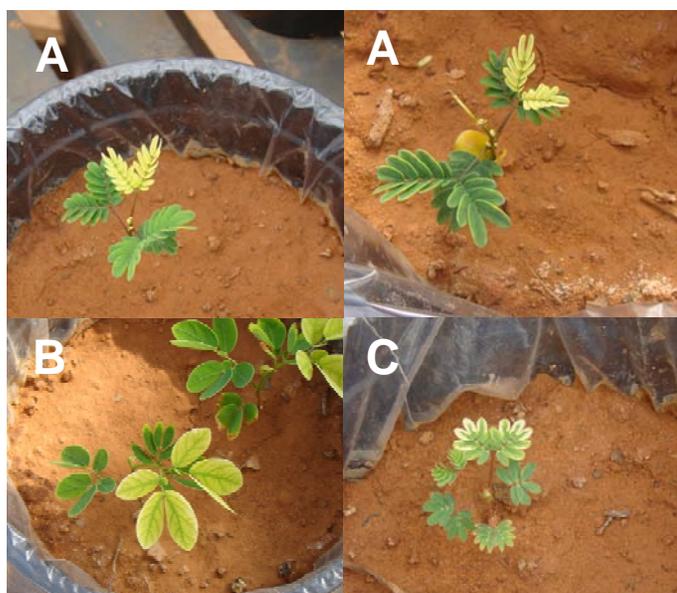


Figura 4. Sintomas de toxidez associados a Zn e Cd na parte aérea de *Leucaena leucocephala* (A), *Mimosa caesalpiniaefolia* (B) e *Mimosa pudica* (C) aos 15 dias de cultivo no nível de 20% de contaminação.

O melhor desenvolvimento das plantas nos diferentes níveis de contaminação foi verificado quando houve a aplicação de silicato no solo. A aplicação de silicato proporcionou aumentos na produção de matéria seca da parte aérea em 850, 1229 e 410% para *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* respectivamente, no nível de 20% de contaminação em comparação ao tratamento sem amenizante. A adição de calcário proporcionou um aumento na produção de matéria seca da parte aérea à medida que os níveis de contaminação foram aumentados. A baixa produção de matéria seca da parte

aérea no nível de 0% de contaminação pode estar relacionada ao aumento do pH após a aplicação dos amenizantes, causando assim uma baixa disponibilidade de micronutrientes catiônicos. No nível de 20% de contaminação a aplicação de silicato aumentou a produção de matéria seca da parte aérea em 76% para *L. leucocephala* e em 182% para *M. pudica* em relação ao mesmo nível de contaminação quando foi feita a aplicação de calcário. Já para *M. caesalpiniaefolia* a aplicação de calcário proporcionou um aumento de 28% na matéria seca da parte aérea em relação ao silicato.

Estudo semelhante a este foi conduzido em um experimento no qual utilizaram-se diferentes doses de carbonato, gesso, vermicomposto, serragem e silicato, em solo contaminado com Zn, Cd, Cu e Pb. Foi possível verificar alterações na disponibilidade dos metais no solo devido aos efeitos diferenciados dos tratamentos e também que o carbonato e o silicato estão entre os materiais mais eficazes em reduzir a disponibilidade dos metais, especialmente de Cd e Zn, para *Mimosa caesalpiniaefolia* e Mostarda (*Sinapis arvensis* L.) (Ribeiro-Filho et al., 2001; 2011).

A toxidez de metais pesados em solos contaminados pode reduzir o desenvolvimento de plantas. No entanto, a utilização de amenizantes, como o calcário, silicato e outros, pode possibilitar o desenvolvimento de plantas por meio da redução da toxicidade desses elementos. Accioly et al. (2004; 2009) e Ribeiro-Filho et al. (2011) constataram os efeitos da aplicação de calcário e de

silicato sobre a disponibilidade de Zn e Cd, e sobre os seus teores na parte aérea e crescimento das plantas, indicando o potencial desses corretivos como agentes amenizantes da toxidez de Cd e Zn em solos contaminados.

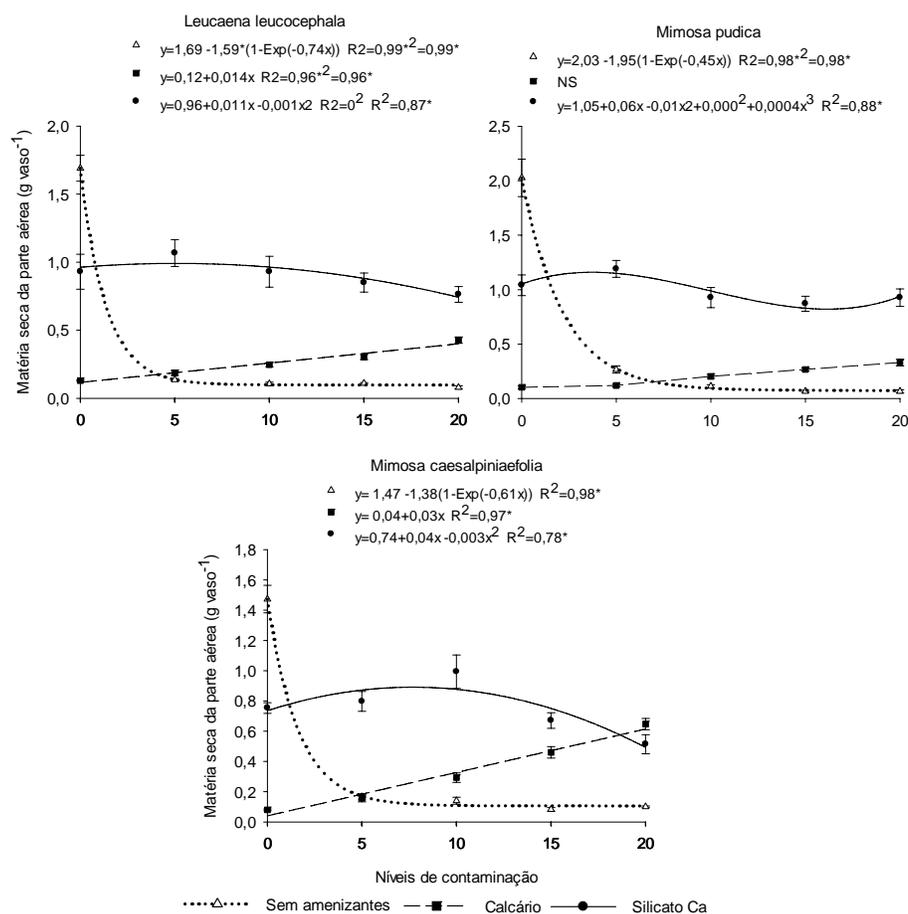


Figura 5. Matéria seca da parte aérea em *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em diferentes níveis de contaminação em solos tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

Fixação de nitrogênio

Em relação ao teor de nitrogênio (TN) na parte aérea, os valores variaram de 29 a 36 g kg⁻¹ para *L. leucocephala*, de 32 a 39 g kg⁻¹ para *M. caesalpiniaefolia* e de 26 a 40 g kg⁻¹ para *M. pudica* nos diferentes níveis de contaminação. Quando houve a aplicação de silicato no nível de 20% de contaminação, o teor de nitrogênio para *M. pudica* foi de 29 g kg⁻¹, para *L. leucocephala* foi de 26 g kg⁻¹ e para *M. caesalpiniaefolia* foi de 25,5 g kg⁻¹.

Quanto ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea, as três espécies não apresentaram sintomas de deficiências de nitrogênio nos diferentes níveis de contaminação com ou sem a aplicação de amenizantes. Em alguns tratamentos, a baixa produção de matéria seca da parte aérea impossibilitou a análise dos teores de nitrogênio, o que não permitiu a interpretação dos dados relativos aos seus acúmulos (Tabela 2). No tratamento sem amenizantes e no nível de 0% de contaminação, devido às melhores condições químicas do solo para o estabelecimento das simbioses, houve um maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das três espécies. A aplicação de silicato nos diferentes níveis de contaminação proporcionou melhores condições para formação de nódulos nas três espécies, refletindo assim em maiores acúmulos de nitrogênio na parte aérea, em relação aos tratamentos que receberam calcário.

Tabela 2. Acúmulo de nitrogênio (mg planta^{-1}) na parte aérea das espécies *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em solos com diferentes níveis de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

	0	5	10	15	20
<i>Leucaena leucocephala</i>					
S/amenizantes	5,71	0,41	ND	ND	ND
Calcário	0,48	0,62	0,77	1,04	1,37
Silicato Ca	3,09	3,43	3,32	2,83	2,76
<i>Mimosa pudica</i>					
S/amenizantes	6,57	0,8	ND	ND	ND
Calcário	ND	ND	0,73	0,96	1,15
Silicato Ca	3,67	3,9	3,19	2,97	3,42
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>					
S/amenizantes	4,92	0,57	0,46	ND	ND
Calcário	ND	0,47	1,12	1,62	2,21
Silicato Ca	2,53	2,58	3,45	2,37	1,86

ND- não determinado pela falta de material vegetal para análise de N

A presença de altas concentrações de Cd e Zn nos solos reduz significativamente o número de células viáveis de rizóbios, comprometendo o processo de nodulação e a taxa de nitrogênio fixado (Broos et al. 2004; 2005; Mahieu et al., 2011). Em ervilha e fava, quando inoculadas com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicea*, em solos com teores variando de 336 a 614 mg kg^{-1} de Zn, o processo de nodulação e conseqüentemente a quantidade de nitrogênio fixado foram afetados (Obbard & Jones 2001). No presente trabalho, os teores totais de Zn e Cd no solo variaram de 22 a 5180 mg kg^{-1} de Zn e de 0,32 a 29 mg kg^{-1} de Cd, teores esses que afetaram o processo de nodulação e

fixação biológica de nitrogênio quando não foi aplicado calcário ou silicato nos diferentes níveis de contaminação.

Efeito dos amenizantes na absorção de Zn e Cd

O teor de Zn e Cd na parte aérea de *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* foi reduzido significativamente após a aplicação do calcário e de silicato nos diferentes níveis de contaminação (Tabela 3). O teor de Zn e Cd na parte aérea das três espécies aumentaram com a elevação dos níveis de contaminação, mesmo quando houve a aplicação desses amenizantes. Em todos os níveis de contaminação, quando foi aplicado silicato e calcário, os teores de Cd estiveram abaixo da faixa crítica de toxidez que varia de 5 a 30 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Apesar da redução dos teores de Zn na parte aérea das três leguminosas, quando foi aplicado silicato, os teores de Zn em alguns tratamentos permaneceram entre 100 e 400 mg kg⁻¹, teores considerados tóxicos para o crescimento de várias espécies (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Nos tratamentos aonde foram aplicados calcário e silicato, o teor de Zn e Cd nas três espécies foram menores na presença do calcário. O calcário, no nível de 20% de contaminação, proporcionou uma redução no teor de Cd na parte aérea de 76, 87 e 71% para *L. leucocephala*, *M.*

pubida e *M. caesalpiniaefolia*, respectivamente, em relação ao tratamento sem amenizante. Considerando que as três espécies apresentam comportamento diferente quanto ao crescimento, a espécie *M. pudica* mostrou-se mais eficiente na absorção de Zn e as espécies *L. leucocephala* e *M. caesalpiniaefolia* foram mais eficientes na absorção de Cd, quando houve aplicação de silicato.

Tabela 3. Teor de Zn e Cd na parte aérea de *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em diferentes níveis de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

Tratamentos	Níveis de contaminação					Regressão	R ²
	0	5	10	15	20		
<i>Leucaena leucocephala</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	18,75	841,67	1444,50	1620,9	2122,80	Y=59,62+160,8x-3,05x ²	0,98*
Calcário	14,26	30,55	41,21	53,70	37,81	Y=12,52+4,98x-0,18x ²	0,92*
Silicato Ca	9,29	53,53	67,74	65,31	102,06	Y=15,61+5,75x-0,09x ²	0,89*
<i>Leucaena leucocephala</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,00	10,07	10,78	13,22	17,58	Y=1,28+1,32x-0,03x ²	0,91*
Calcário	0,00	0,48	0,74	1,03	0,82	Y=-0,02+0,12x-0,004x ²	0,97*
Silicato Ca	0,00	0,67	1,34	1,70	0,22	Y=-0,17+0,29x-0,013x ²	0,83*
<i>Mimosa pudica</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	27,56	957,23	1658,12	1985,3	2312,2	Y=43,01+202,2x-4,51x ²	0,99*
Calcário	16,34	56,98	78,25	96,63	65,47	Y=14,23+11,13x-0,42x ²	0,96*
Silicato Ca	21,77	101,81	194,33	270,68	89,46	Y=-2,20+36,87x-1,54x ²	0,80*
<i>Mimosa pudica</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,00	8,23	13,21	17,75	19,32	Y=0,10+1,75x-0,04x ²	0,99*
Calcário	0,00	0,87	1,72	2,42	0,53	Y=-0,22+0,38x-0,02x ²	0,80*
Silicato Ca	0,00	0,57	0,91	0,88	0,47	Y=-0,02+0,16x-0,01x ²	0,99*
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	20,27	954,34	1996,4	2068,7	2234,1	Y=-11,80+254,1x-7,16x ²	0,98*
Calcário	13,11	43,34	66,68	96,70	62,75	Y=8,61+10,01x-0,35x ²	0,89*
Silicato Ca	9,01	82,66	91,55	136,78	240,53	Y=22,47+4,83x+0,28x ²	0,95*
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,00	12,24	15,17	17,65	19,65	Y=1,01+2,09x-0,06x ²	0,96*
Calcário	0,00	0,98	1,61	2,34	0,88	Y=-0,15+0,34x-0,014x ²	0,85*
Silicato Ca	0,00	0,25	1,79	2,37	0,81	Y=-0,36+0,34x-0,013x ²	0,71*

* Significativos a 5% pelo teste de F, (P≤0,05).

Os efeitos da aplicação dos amenizantes nos diferentes níveis de contaminação sobre o teor de Zn e Cd nas raízes de *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia* estão reportados na Tabela 4. Verificou-se que os teores de Zn e Cd nas raízes das três espécies foram superiores aos verificados na parte aérea das plantas. Os teores de Zn e Cd nas raízes das espécies avaliadas aumentaram quando houve a aplicação de silicato nos diferentes níveis de contaminação em relação ao calcário. Existem várias estratégias pelas quais o silicato afeta a resistência a metais pesados em diferentes espécies de plantas. Em algumas plantas, o silicato pode reduzir a toxicidade através da precipitação do Si e metais como o Zn (Neumann et al., 1997; Neumann & zur Nieden, 2001), ou por aumentar o acúmulo de Cd nas raízes, restringindo o transporte de Cd para a parte aérea da planta (Shi et al., 2005), uma vez que a deposição física do silício reduz a porosidade da parede celular dos tecidos internos da raiz oferecendo mecanismos que dificultam o transporte de Cd (Shi et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Tabela 4. Teor de Zn e Cd nas raízes de *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em solos com diferentes níveis de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

Tratamentos	Níveis de contaminação					Regressão	R ²
	0	5	10	15	20		
<i>Leucaena leucocephala</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	33,16	1553,5	3531,8	4353,4	5632,8	Y=-12,9+373,6x-4,68x ²	0,99*
Calcário	20,16	75,9	177,31	558,4	391,2	Y=-24,1+33,99x-0,48x ²	0,75*
Silicato Ca	12,34	149,47	212,8	445,1	728,9	Y=30,02+8,16x+1,32x ²	0,98*
<i>Leucaena leucocephala</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,00	16,25	40,62	76,08	92,27	Y=-2,26+4,26x-0,03x ²	0,98*
Calcário	0,00	8,15	16,55	45,90	27,04	Y=-3,56+3,73x-0,09x ²	0,73*
Silicato Ca	0,00	16,70	25,23	31,23	44,34	Y=1,47+2,62x-0,03x ²	0,98*
<i>Mimosa pudica</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	36,8	1754,3	3831,8	5153,4	6326,8	Y=-38,6+424,96x-5,3x ²	0,99*
Calcário	23,45	86,43	721,69	954,45	416,3	Y=-119,5+124,8x-4,6x ²	0,71*
Silicato Ca	32,22	624,5	897,7	1180,2	1628,7	Y=83,18+90,87x-0,80x ²	0,98*
<i>Mimosa pudica</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,0	14,3	42,3	59,9	80,3	Y=-1,62+4,02x+0,005x ²	0,99*
Calcário	0,0	7,4	18,3	32,5	27,34	Y=-1,97+2,84x-0,06x ²	0,92*
Silicato Ca	0,0	19,2	27,5	39,4	51,2	Y=1,34+3,09x-0,03x ²	0,98*
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>							
Zn mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	26,6	1894,2	3324,8	4684,6	5982,3	Y=69,2+363,2x-3,46x ²	0,99*
Calcário	18,6	84,1	231,4	364,4	516,1	Y=10,45+16,47x+0,45x ²	0,99*
Silicato Ca	23,7	473,7	686,4	993,7	1088,5	Y=35,31+88,18x-1,76x ²	0,99*
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>							
Cd mg kg ⁻¹							
S/amenizantes	0,0	41,44	63,1	89,7	145,6	Y=4,91+4,85x+0,10x ²	0,97*
Calcário	0,0	7,2	16,4	26,2	41,7	Y=0,28+1,07x+0,05x ²	0,99*
Silicato Ca	0,0	38,0	53,4	91,5	79,8	Y=-1,04+8,65x-0,22x ²	0,95*

* Significativos a 5 % pelo teste de F, (P≤0,05).

Para as plantas estudadas, no nível de 20% de contaminação, os valores dos fatores de bioacumulação variaram de 1,5 a 301 para o Zn e de 1,9 a 8,5 para o Cd (Tabela 5). No nível de 20% de contaminação, quando não houve a

aplicação de silicato, ocorreu um aumento no fator de bioacumulação para Zn e uma redução para o Cd nas três leguminosas. A aplicação de silicato aumentou o fator de bioacumulação em 802, 635 e 1954% para *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia*, respectivamente.

Tabela 5. Fator de bioacumulação da parte aérea e índice de transferência para *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* no nível de 20% de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

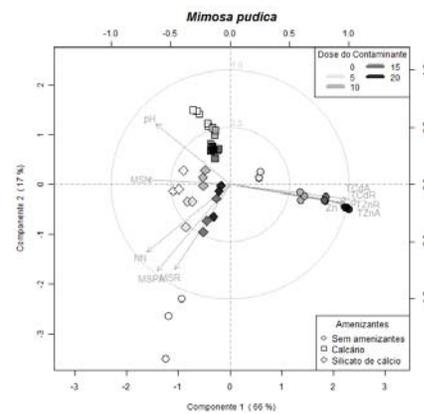
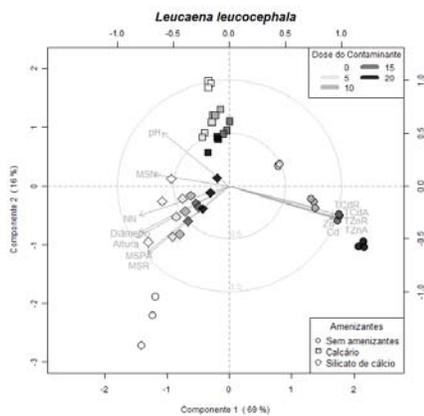
	<i>Leucaena leucocephala</i>		<i>Mimosa pudica</i>		<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	
	Zn					
	FB	IT	FB	IT	FB	IT
S/amenizantes	13,9	0,38	15,1	0,37	14,67	0,04
Calcário	67,9	0,10	117,5	0,16	112,4	0,12
Silicato Ca	125,4	0,14	111,0	0,05	301,6	0,22
	Cd					
	FB	IT	FB	IT	FB	IT
S/amenizantes	7,6	0,19	8,4	0,24	8,5	0,13
Calcário	6,2	0,04	4,1	0,02	6,6	0,02
Silicato Ca	1,9	0,04	3,4	0,01	5,9	0,01

Os índices de translocação de Zn variaram de 0,04 a 0,22 para *M. caesalpiniaefolia* de 0,05 a 0,37 para *M. pudica* e variaram de 0,1 a 0,38 para *L. leucocephala* quando foi aplicado silicato (Tabela 5). Com relação ao Cd o índice de translocação foi maior nos tratamentos sem a aplicação de amenizante seguido pelo calcário e pelo silicato. Esse comportamento mostra certa restrição na translocação de Cd para a parte aérea, nas três plantas estudadas. Os resultados encontrados por meio desses fatores revelam que as espécies

Leucaena leucocephala, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* tem alguns mecanismos que evitam a translocação de Cd e Zn absorvido para a parte aérea.

Análise de componentes principais

Considerando as variáveis doses do contaminante e amenizantes, a análise de componentes principais (APC) explicou 85, 83 e 84% da variabilidade dos dados para *L. leucocephala*, *M. pudica* e *M. caesalpiniaefolia*, respectivamente. Desse total 69, 66 e 63% é explicado pelo eixo 1 e 16, 17 e 21 pelo eixo 2.



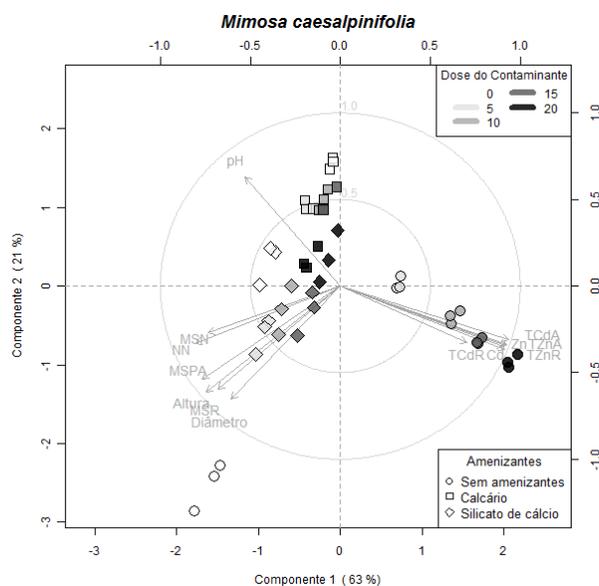


Figura 6. Análise dos componentes principais (ACP) para teores de zinco (Zn) e cádmio (Cd) em solução do solo, pH, matéria seca de raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN), teor de zinco e cádmio na parte aérea (TZnA, TCdA) e teor de zinco e cádmio na raiz (TZnR, TCdR) para *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em solos com diferentes níveis de contaminação tratados com calcário, silicato de cálcio e sem amenizante.

Entre as espécies estudadas, verificou-se uma correlação negativa entre as concentrações de Zn e Cd em solução do solo, teores de Zn e Cd nas raízes e teores de Zn e Cd na parte aérea com o pH e a matéria seca de nódulos (Figura 6). Os teores de Zn e Cd na parte aérea e nas raízes tiveram alta correlação

positiva com os teores na solução do solo. Há uma tendência dos dados onde houve a aplicação de calcário e silicato no nível de 20% de contaminação de se localizarem mais no centro dos gráficos, mostrando uma baixa influência dos teores de Zn e Cd em solução sobre as variáveis MSN, MSPA, MSR, altura e diâmetro.

A adição de silicato mostrou-se eficiente em reduzir a fitotoxicidade de Zn e Cd, além de melhorar a produção de matéria seca das plantas, número de nódulos, matéria seca de nódulos e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Os resultados deste trabalho demonstram que a combinação entre rizóbios-leguminosas-silicato podem representar um fator chave para a recuperação de áreas contaminadas por metais pesados.

REFERÊNCIAS

Accioly, A.M.A., Siqueira, J.O., Curi, N., Moreira, F.M.S. 2004. Lime amelioration of zinc and cadmium toxicities for *Eucalyptus camaldulensis* seedlings cultivated in contaminated soil. *Rev Bras Cienc Solo* 28:775–783.

Accioly, A.M.A., Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O. 2009. Calcium silicate to reduce heavy metal toxicity in eucalyptus seedlings. *Pesq Agropec Bras* 44:180–188.

Broos, K., Beyens, H., Smolders, E. 2005. Survival of rhizobia in soils is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biol Biochem* 37:573–579.

Broos, K., Uyttbroek, M., Mertens, J., Smolders, E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biol Biochem* 36:633–640.

Castaldi, P., Santona, L., Melis, P., 2005. Heavy metals immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere* 60:365–371.

Chaudhary, P., Dudeja, S.S., Kapoor, K.K. 2004. Effectivity of host-Rhizobium leguminosarum symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiol Res* 159:121–127.

Chen, H.M., Zheng, C.R., Tu, C., Shen, Z.G. 2000. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 41:229–234.

Chen, W. M., Wu, C. H., James, E. K., Chang, J. S. 2008. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials*. 151:364-371.

Cheng, S.F., Hseu, Z.Y. 2002. In-situ immobilization of cadmium and lead by different amendments in two contaminated soils. *Water Air Soil Poll* 140:73–84.

Cunha, K.P.V., Nascimento, C.W.A., Pimentel, R.M.M., Ferreira, C.P. 2008. Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a Cd contaminated soil with and without liming. *J. Hazard. Mater*, 160:228-234.

Ferreira, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA, 2003.

Florentino, L. A.; Guimarães, A. P.; Rufini, M.; Silva, K.; Moreira, F. M. S. 2009. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci. Agric.*, 66:667-676.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., Escarré, J. 2006. Specific interactions between local metallic plants improve the phytostabilisation of mine soils. *Plant Soil* 282:53–65.

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol Biochem* 41:2031–2037.

Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B. Trace elements from soil to human. New York: Springer, 2007. 450p.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.

Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments-a review. *Waste Manage* 28: 215–225.

Li, P., Wang, X.X., Zhang, T.L., Zhou, D., He, Y.Q. 2008. Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. *J. Environ. Sci.*, 20:449-455.

Ma, J.F. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci Plant Nutr* 50:11–18.

Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. 2011. *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant Soil*. 342:405–417.

McGrath, S.P., Brookes, P.C., Giller, K.E. 1988. Effect of potentially toxic metals in soil derived from post applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biol Biochem* 20:415–425.

Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Van der Lelie, D., Wattiez, R. 2003. *Ralstonia*

metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal- responsive genes. FEMS Microbiol Rev 27:385–410.

Neumann, D., zur Nieden, U., 2001. Silicon and heavy metal tolerance of higher plants. Phytochemistry 56:685–692.

Neumann, D., zur Nieden, U., Schwieger, W., Leopold, I., Lichtenberger, O., 1997. Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. J. Plant Physiol. 151:101–108.

Obbard, J.P., Jones, K.C. 2001. Measurements of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. Environ Pollut 111:311–320.

Ribeiro Filho M. R., Siqueira, J.O., Vangronsveld, J., Soares, C. R. F. S., Curi, N. 2011. Inorganic Materials as Ameliorants for Soil Remediation of Metal Toxicity to Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.). International Journal of Phytoremediation, 13:498–512.

Ribeiro-Filho, M.R., Siqueira, J.O., Curi, N., Simão, J.B.P. 2001. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. R. Bras. Ci. Solo, 25:495-507.

Sa, T.M., Israel, D.W. 1991. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant Physiology*. 97:928-935.

Shi, X., Zhang, C., Wang, H., Zhang, F. 2005. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant Soil* 272:53–60.

Silva, K. 2009. Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian Soils. Thesis (Doctor of Microbiology), University of Lavras, MG. 124p.

Tandy, S., Healey, J.R., Nason, M.A., Williamson, J.C., Jones, D.L., 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. *Environ. Pollut.* 157:690–697.

Ter Braak, C.J.F., Smilauer, P. CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: Software for canonical community ordination. New York, 1998. 352p. (version 4.5) 91390422.

Trannin, I.C.B., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2001. Crescimento e nodulação de *Enterolobium contortsiliquum*, *Acacia mangium* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. R. Bras. Ci. Solo, 25:743-753.

Van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R., Staehelin, C. 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. FEMS Microbiol Ecol 56:178–187.

Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., Verschraegen, G. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropoha* and related species, and proposal of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. Nov. Int J Syst Evol Microbiol 54:317–327.

Walker, D. J., Clemente, R., Roig, A., Bernal, M. P. 2003. The effects of soil amendments on heavy metal bioavailability in two contaminated Mediterranean soils. Environmental Pollution, 122:303–312.

Zhang, C., Wang, L., Nie, Q., Zhang, W., Zhang, F. 2008. Long-term effects of exogenous silicon on cadmium translocation and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany* 62:300–307.