



WESLEY DE MELO RANGEL

**SIMBIOSES DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E DE RIZÓBIO COM
LEGUMINOSAS EM SOLO CONTAMINADO
COM ARSÊNIO**

Lavras – MG

2011

WESLEY DE MELO RANGEL

**SIMBIOSES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DE
RIZÓBIO COM LEGUMINOSAS EM SOLO CONTAMINADO COM
ARSÊNIO**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora

PhD Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientador

Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares

LAVRAS - MG

2011

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

Rangel, Wesley de Melo.

Simbioses de fungos micorrízicos arbusculares e de rizóbio com leguminosas em solo contaminado com arsênio / Wesley de Melo Rangel. – Lavras : UFLA, 2011.

121 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Leguminosas tropicais. 2. Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. 3. Micorrizas arbusculares. 4. Fitorremediação. 5. Elementos-traço. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.41

WESLEY DE MELO RANGEL

**SIMBIOSES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DE
RIZÓBIO COM LEGUMINOSAS EM SOLOS CONTAMINADOS COM
ARSÊNIO**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 02 de agosto de 2011.

PhD Maria Rita Scotti Muzzi UFMG

Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares UFSC

PhD Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

LAVRAS – MG

2011

A Deus, onipotente e misericordioso.

Não perca a esperança.

Há milhões de pessoas aguardando os recursos de que você já dispõe.

Não perca o bom humor.

*Em qualquer acesso de irritação, há sempre um suicidinho no campo de suas
forças.*

Não perca a tolerância.

É muita gente a tolerar você naquilo que você ainda tem de indesejável.

Não perca a serenidade.

O problema pode não ser assim tão difícil quanto você pensa.

Não perca a humildade.

Além da planície, surge a montanha, aparece o horizonte infinito.

Não perca o estudo.

A própria morte é lição.

Não perca a oportunidade de servir ao semelhante.

Hoje ou amanhã, você precisará de concurso alheio.

Não perca tempo.

Os dias voltam, mas os minutos são outros.

Não perca a paciência.

Recorde a paciência inesgotável de Deus.

pelo espírito de ANDRÉ LUIZ, médium: Francisco Cândido Xavier

*Existem pessoas que fazem parte da vida da gente e sem elas nada seria
significativo.....*

*A **Sebastião**, meu pai, exemplo de simplicidade, caráter e respeito para com o
próximo.*

*A **Mariana**, minha mãe, pelo vínculo sublime na minha vida. Exemplo de
simplicidade, força, perseverança e amor incondicional. Esteve ao meu lado a
cada segundo desde o princípio.*

*A **William, Thaís e Ana Carolina**, meus irmãos, pelo apoio, amizade, carinho e
compreensão.*

*A **Giovanna**, minha sobrinha querida, pela continuidade, espírito alegre,
carinhoso, amoroso e repleto de esperança.*

DEDICO

*A todos os mestres e doutores desta vida que possuem simplicidade, sinceridade,
humildade, respeito e amor ao próximo.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e bênçãos recebidas.

Dizer que este trabalho não foi executado por apenas um ser humano é uma redundância que merece ser dita. Por isso agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para execução deste trabalho.

Ao meu querido pai, Sebastião, pelo incentivo e confiança.

À minha maravilhosa mãe, Mariana, pelo maior amor do mundo, pelo exemplo, carinho e todo apoio.

Aos melhores irmãos do mundo, William, Thaís e Ana Carolina, por todo amor e carinho.

À melhor sobrinha do mundo, Giovanna, pelas risadas, estórias inventadas e histórias vividas, pelo carinho e esperança, que torna nossas vidas mais felizes e cheias de luz.

A todos os demais familiares, pela torcida e orações.

Aos queridos amigos do laboratório municipal de análises clínicas de Formiga, Camilo, Cris, Daniel, Dê, Estelinha, Flavinha, Ismael, Dona Imaculada (Colorida), Dona Ivone, Jaina, Leila, Lorena, Mari, Paula, Paty, Rita, Rosália e Zê pelo apoio e incentivo.

A todos os demais amigos, pelas boas vibrações e orações.

Aos professores Anísio, Leyser e Pascoal Jr. pelas conversas, apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras-UFLA pela oportunidade e estrutura disponibilizadas.

À Professora Fatima pelo profissionalismo, oportunidade e orientação.

Ao Professor Cláudio “O Profeta” pelo profissionalismo, oportunidade concedida, ensinamentos práticos e pela co-orientação.

Ao Professor Luiz Roberto (Bebeto) pelo profissionalismo, oportunidade e colaboração.

À Professora Maria Rita pela disponibilidade em analisar este material e contribuições.

À toda a “comunidade microbiológica” do Laboratório de Microbiologia do Solo, Amanda, Analuiza, André, Andressa, Bruno, Cândido, Cássia, Cleide, Fernanda, Gláucia, Jack, Jerusa, Jessé, Jú, Karina, Kize, Krisle, Leandro, Ligiane, Maíra, Márcia, Marco, Mariana, Marina, Maryeimy, Michele Rocha, Michele Silva, Natana, Noelly, Patrícia Leal, Patrícia Fabian, Paula Jaramillo, Paula Rose, Paulo, Pedro Martins, Pedro Otávio, Plínio, Priscila, Rafael, Rafael Pereira, Rogério, Romildo, Sílvia, Teotônio e Thiago pela convivência, amizade e colaboração.

Ao Paulo e Sílvia, em especial, que foram imprescindíveis na reta final deste trabalho, aos 47 do segundo tempo vocês estavam ali presentes. Muito obrigado.

Aos técnicos, Manoel e Marlene do laboratório de Microbiologia do Solo pela convivência e auxílio sempre que necessário. Muito obrigado.

Ao Departamento de Ciência do Solo-DCS pela oportunidade e estrutura.

Aos excelentes Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos e exemplo de dedicação.

À “pequena grande” Dirce pela paciência e amizade.

Aos colegas do DCS pela convivência.

Aos demais técnicos de laboratório do DCS pelo auxílio nas análises.

Ao pessoal da limpeza, em especial a Fabiana “Feia” pela amizade, bom humor contagiante, risadas e momentos de descontração.

Aos colegas do Departamento de Biologia, Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial a Kamila, Melline e Helbert, e ao técnico Tanhan pelo auxílio nas análises das enzimas antioxidantes.

Aos Pós-doutorandos do DCS, Ênio Tarso e Geila Carvalho, pelo auxílio na execução e interpretação das análises de espectroscopia de fluorescência de raios-X, realizadas no PicoFox.

Aos alunos de iniciação científica do Professor Luiz Roberto (Bebeto), Evanise, Bruno, Olívia e Willian pelo auxílio nas digestões do material vegetal e solos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos para a compra de equipamentos utilizados na execução deste trabalho.

À Lud e Fabiana integrantes da república “Formigueiro” pela amizade, paciência e excelente convivência.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

RESUMO GERAL

A revegetação de solos brasileiros contaminados com arsênio, em associação com a microbiota edáfica, é dificultada pela falta de informações sobre espécies vegetais em associação com a microbiota edáfica tolerantes ao As. Sendo assim, a seleção de espécies vegetais e microbianas tolerantes ao As é o primeiro passo para um processo eficiente de revegetação de solos e substratos brasileiros contaminados com este metalóide. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a contribuição da simbiose de FMAs e o potencial fitorremediador de quatro espécies leguminosas, em associação com BFNNL, caracterizar e verificar a tolerância de BFNNL isoladas de nódulos de *Stizolobium aterrimum* e *Crotalaria spectabilis* crescidas em área de mineração de Au, contaminada com elevados teores de As. Avaliou-se a simbiose dos isolados de FMAs *Acaulospora morrowiae*, *Acaulospora* sp., *Glomus etunicatum* e *Gigaspora gigantea* em *Acacia magium*, *Crotalaria juncea*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Stizolobium aterrimum*, ambas espécies vegetais inoculadas com seus respectivos inoculantes bacterianos recomendados e aprovados pelo MAPA. Avaliou-se também a tolerância *in vitro* de bactérias fixadoras de N isoladas de nódulos de *Stizolobium aterrimum* e *Crotalaria spectabilis* crescidas em área de mineração, contaminada com As. Concluiu-se que a simbiose entre FMAs e leguminosas mostra-se como uma ferramenta a ser utilizada em projetos de recuperação de áreas contaminadas com As. A inoculação com FMAs melhorou a relação P:As e reduziu os teores de As na planta, reduzindo também a translocação do As para a parte aérea. A inoculação com FMAs reduziu a atividade da APX, principalmente para *Acacia mangium* e *Crotalaria juncea*, promovendo um efeito fitoprotetor. Quanto à tolerância dos isolados de nódulos de *Stizolobium aterrimum* e *Crotalaria spectabilis* verificou-se uma elevada tolerância, sendo encontrados isolados com tolerância a até 200 mmol L⁻¹ As. A tolerância mostrou estar relacionada com algumas características culturais tais como rápido crescimento, acidificação do meio de cultura e produção de exopolissacarídeo, havendo relação também com a resistência a vários antibióticos.

Palavras-chave: Leguminosas tropicais. Micorriza Arbuscular. Fixação Biológica de Nitrogênio. Fitorremediação.

GENERAL ABSTRACT

The revegetation of Brazilian soils contaminated with arsenic, in association with the edaphic microbiota, is hampered by lack of information of plant species in association with the As tolerant edaphic microbiota. Therefore, the selection of plant and As tolerant microbial species is the first step for an efficient process of revegetation of the Brazilian soils and for the contaminated substrates with this metalloid. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the contribution of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) symbioses and the phytoremediator potential of four leguminous species, associated with rhizobia and characterize and analyze the tolerance of rhizobia isolated from nodules of *Stizolobium aterrimum* and *Crotalaria spectabilis* grown in the Au mining area contaminated with high levels of As. *Acaulospora morrowiae*, *Acaulospora* sp., *Glomus etunicatum* and *Gigaspora gigantea* were inoculated in *Acacia mangium*, *Crotalaria juncea*, *Enterolobium contortisiliquum* and *Stizolobium aterrimum*. These plant species were inoculated with their respective recommended bacterial inoculants. We also evaluated the As tolerance of the N-fixing bacteria isolated from nodules of *Crotalaria spectabilis* and *Stizolobium aterrimum* grown in the mining area contaminated with As. The inoculation with AMF enhanced the P:As ratio and reduced the levels of As in the plants reducing the translocation to the shoot. Inoculation with AMF reduced the APX activity in *Acacia mangium* and *Crotalaria juncea*, specially, with a phytoprotector effect. The tolerance of bacteria isolated from nodules of *Crotalaria spectabilis* and *Stizolobium aterrimum* showed high tolerance to As concentrations ($\leq 200 \text{ mmol L}^{-1}$), this tolerance was related to some cultural characteristics such as, fast growth, acidification of the growth culture medium, exopolysaccharide production, and resistance to various antibiotics. We can conclude that the symbioses between legumes and AMF could be used in remediation projects of contaminated areas with As.

Keywords: Tropical leguminosae. Arbuscular mycorrhiza. Biological nitrogen fixation. Phytoremediation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA TOXICIDADE DE ARSÊNIO PARA LEGUMINOSAS EM SOLO CONTAMINADO PELA EXTRAÇÃO DE OURO	45
1 INTRODUÇÃO	48
2 PARTE EXPERIMENTAL	50
3 RESULTADOS	58
4 DISCUSSÃO	69
5 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 3 ISOLAMENTO E TOLERÂNCIA AO ARSÊNIO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS CRESCIDAS EM SOLO DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE OURO	84
1 INTRODUÇÃO	87
2 PARTE EXPERIMENTAL	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Grande parte do desenvolvimento econômico mundial é sustentada pela exploração mineral, a qual gera matéria-prima para diversas indústrias de bens de consumo e fertilizantes agrícolas. Tal atividade encontra-se fortemente ligada ao desenvolvimento social, gerando bens e riqueza, mas por outro lado, a exploração mineral, em especial a mineração, é uma das grandes causas de poluição ambiental (SALOMONS, 1995). A mineração, principalmente de metais não ferrosos, que ao extraí-los produz grandes quantidades de rejeitos, é uma das principais ações antrópicas que causam a poluição do solo com elementos-traço, dentre os quais se encontra o arsênio, afetando bruscamente a cobertura vegetal no local de exploração e em áreas adjacentes (BAKER et al., 1994). Em ambientes explorados pela mineração, não só a vegetação natural é retirada, uma intensa movimentação do solo é feita na abertura da lavra, havendo casos em que são gerados grandes volumes de rejeitos, agravando ainda mais o distúrbio ao ambiente (SOUZA; SILVA, 1996).

A retirada da cobertura vegetal em áreas contaminadas acelera a degradação do solo, pois o deixa desprotegido contra a erosão hídrica e eólica. Com a retirada da vegetação, a perda da matéria orgânica presente nas camadas do solo afetadas pela extração é um grave problema, pois, provoca alterações na estrutura, disponibilidade de água e atividade biológica do solo, e afeta o suprimento de nutrientes essenciais como Fósforo (P), Enxofre (S) e, principalmente, Nitrogênio (N), às plantas (SIQUEIRA; SOARES; SILVA, 2008). Áreas que sofreram estes tipos de interferência, provavelmente estão desprovidas de meios naturais de regeneração biótica, sendo necessário o auxílio de ação antrópica para a revegetação do ambiente.

Uma tecnologia recente e bastante promissora que vem sendo utilizada na reabilitação *in situ* dessas áreas é a Fitorremediação (BAKER et al., 1994; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; PRASAD et al., 2010), que consiste basicamente em utilizar plantas tolerantes aos contaminantes para a degradação, extração, contenção dos mesmos ou a ação simultânea dos três mecanismos. A fitorremediação vem apresentando resultados satisfatórios de reabilitação de ambientes que sofreram algum tipo de contaminação, seja por compostos orgânicos e/ou inorgânicos. Contudo, deve ser considerado também os microrganismos rizosféricos, que atuam beneficiando o desenvolvimento das plantas. Dentre estes microrganismos destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL), os quais estabelecem interações simbióticas mutualísticas com as plantas hospedeiras. A relação simbiótica planta-bactérias diazotróficas-fungos micorrízicos, estabelecida de forma mutualística, constitui um sistema tripartite, representando a união de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico com espécies vegetais (fixadoras de carbono) e fungos micorrízicos. Este sistema adquire propriedades que não estavam presentes nos níveis hierárquicos inferiores. As plantas noduladas (leguminosas) e micorrizadas adquirem a capacidade de incorporar C e N ao solo, e elevam sua capacidade de absorção de nutrientes, como o P, tornando-se mais tolerantes aos estresses ambientais (SOUZA; SILVA, 1996; CARNEIRO et al., 1999; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; SILVA; SOARES; SIQUEIRA, 2006). Assim, espécies vegetais como as leguminosas que estabelecem estas simbioses são indicadas para aumentar o teor de matéria orgânica do sistema em condições de baixa fertilidade e para a recuperação de áreas degradadas.

No entanto, são escassos os estudos envolvendo a inoculação de espécies leguminosas, com BFNNL e FMAs, em solo contaminado com arsênio.

Tal fato levou-nos a planejar e desenvolver nossos estudos, que serão descritos no decorrer desta dissertação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arsênio

De acordo com a classificação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o arsênio, cujo símbolo químico é As, encontra-se largamente difundido na crosta terrestre. O As está inserido na coluna 5A da Tabela Periódica, juntamente com o nitrogênio, fósforo, antimônio e bismuto, possuindo massa atômica igual a 74.92, número atômico 33, raio atômico 139 pm, densidade 5.78 g cm^{-3} , valência -3 (arsina), +3 (arsenito) e +5 (arsenato) nos principais estados de oxidação e ponto de fusão 817°C . Seu comportamento distinto dos metais em algumas situações o classifica como metalóide ou semi-metal, apresentando, portanto, propriedades de metais e não-metais. A toxicidade do arsênio é dependente da forma química em que ele se encontra. Das formas de arsênio inorgânico, a arsina é altamente tóxica, e o arsenito é mais tóxico que o arsenato (VENUGOPA; LUCKEY, 1978). Além da toxicidade, o arsenito apresenta mobilidade e solubilidade maiores que o arsenato. Essa maior mobilidade pode ser explicada pela natureza de sua interação com a superfície coloidal do solo, onde realiza complexação superficial, enquanto o arsenato realiza troca de ligante (LADEIRA; CIMINELLI, 2000). Em solos ácidos e solos redutores são mais comuns os oxianions de arsenato e os sulfetos de As, respectivamente.

A toxicidade dos compostos orgânicos que contêm arsênio também é variável, compostos de origem natural parecem ser menos tóxicos ou de baixa toxicidade, enquanto alguns compostos sintéticos, principalmente contendo arsênio III, possuem alta toxicidade.

O As concentra-se nos horizontes superficiais do solo, devido a deposição atmosférica e reciclagem da vegetação (ALLOWAY, 1990). Tal fato

pode ser atribuído também à presença de óxidos e da matéria orgânica na camada superficial dos solos. A adsorção de As em substâncias orgânicas no solo é dependente do pH do solo. O máximo de sorção é encontrado em pH 5,5 (THANABALASINGAM; PICKERING, 1986).

Vários fatores, como potencial redox, pH e presença de ligantes que competem pelos sítios de adsorção na superfície mineral, influenciam o potencial tóxico e a disponibilidade de As no ambiente (WALTHAM; EICK, 2002). Outro fator que afeta a disponibilidade de As no ambiente é a textura do solo (ADRIANO, 2001; CAMPOS et al., 2007). A superfície adsortiva de solos argilosos e siltosos é maior do que solos arenosos, o que reflete na retenção elevada de elementos-traço nos primeiros, comparados aos solos arenosos (CHEN; MA; HARRIS, 1999).

As reações que controlam a disponibilidade de As no solo compreendem adsorção/dessorção e precipitação/dissolução (SMITH; NAIDU; ALSTON, 1998). Tanto o arsenato quanto o fosfato são adsorvidos em óxidos de ferro e alumínio. O arsenato é ânion do ácido forte H_3AsO_4 , que possui valores de pK_A 2.24, 6.94 e 11.5, sendo adsorvido efetivamente em pH ácido (McBRIDE, 1994). Os ânions AsO_2^- , AsO_4^{3-} , HAsO_4^{2-} e H_2AsO_4^- são as formas móveis mais comuns de As, sendo adsorvida em pH neutro alcalino 7-9 (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

O arsênio elementar As^0 não ocorre naturalmente e não apresenta solubilidade em água. Este é produzido pela redução do trióxido de arsênio (As_2O_3) com carvão vegetal. O trióxido de arsênio (As_2O_3) é um sub-produto das operações de fundição de metais. Estima-se que 70% do arsênio produzido mundialmente são utilizados no tratamento da madeira como arsenato de cobre cromado (ACC), 22% em produtos químicos agrícolas e o restante em vidros, produtos farmacêuticos e ligas de metais não-ferrosos. O arsênio está presente em mais de 200 tipos de minerais. Possui grande afinidade por sulfetos

(ALLOWAY, 1990), os quais podem ser encontrados juntamente com cobre, níquel, chumbo, cobalto e outros metais (MANDAL; SUZUKI, 2002). Os principais minerais que possuem As em sua composição são arsenopirita (FeAsS), realgar (AsS) e ouropigmento (As₂S₃), destes o mais comum é a arsenopirita (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2001b; MANDAL; SUZUKI, 2002). Os sulfetos são bastante instáveis quando expostos ao ar atmosférico, o que geralmente ocorre em áreas de mineração. De acordo com O'Neill (1990), a concentração de As é variável entre os diversos tipos de rochas, tais como rochas ígneas (1-15 mg kg⁻¹), sedimentares (1-900 mg kg⁻¹), calcárias (1-20 mg kg⁻¹) e fosfatadas (1-200 mg kg⁻¹). Arsênio inorgânico de origem geológica é encontrado em algumas fontes de água subterrânea, as quais têm sido utilizadas para o consumo humano em várias partes do mundo. Compostos orgânicos contendo arsênio, tais como arsenobetaina, arsenocolina, sais de tetrametilarsênio, arsenoaçúcares e lipídios contendo arsênio são encontrados principalmente em organismos marinhos, embora alguns destes compostos tenham sido encontrados em espécies terrestres (WHO, 2001b).

O arsênio talvez seja o único elemento para o qual há provas suficientes de risco carcinogênico humano tanto por inalação quanto por ingestão (CENTENO et al., 2002; CHEN; AHSAN, 2004), com casos de câncer, relacionados à contaminação de água potável, diagnosticados em vários países, como Argentina, Bangladesh, Chile, Índia e Taiwan. Dados confiáveis sobre a exposição e efeitos do arsênio na saúde humana raramente estão disponíveis, mas em muitos países como Argentina, Austrália, Bangladesh, Chile, China, Hungria, Índia, México, Peru, Tailândia e Estados Unidos, os níveis de arsênio em água potável têm sido detectados em concentrações superiores ao valor de referência 0,01 mg L⁻¹ ou à norma nacional em vigor (WHO, 2001a).

Marques (2000) estudando latossolos brasileiros, sob vegetação de Cerrado, encontrou teores de As de até 38 mg kg⁻¹, sendo similar ao exposto por

Oliveira et al. (2002) ao verificarem 45 amostras de solo também sob vegetação de Cerrado, enquanto Campos et al. (2007) relataram que de 17 solos analisados, 16 apresentaram teor de As abaixo de 10 mg kg^{-1} , com valor médio de $5,2 \text{ mg kg}^{-1}$. Embora estes teores estejam no intervalo de valores para solo não contaminado ($1-40 \text{ mg kg}^{-1}$) de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001b), quando comparados aos valores orientadores para solo não contaminado segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) do estado de São Paulo, os teores verificados encontram-se superiores ao valor estabelecido ($3,5 \text{ mg kg}^{-1}$).

2.2 Arsênio em plantas

A absorção de elementos-traço pelas plantas se dá pelos mesmos mecanismos verificados para os nutrientes. Os metais e metalóides, como o As, podem exercer efeitos tóxicos sobre as plantas, interferindo na cadeia transportadora de elétrons da respiração e fotossíntese, além de inativar diversas enzimas vitais, diminuir a biossíntese de clorofila e causar a peroxidação dos lipídeos nas membranas fotossintéticas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; MEHARG; HARTLEY-WHITAKER, 2002).

Compostos de As são encontrados no ambiente muitas vezes em concentrações tóxicas para a maioria dos seres vivos. Em resposta, assim como outros organismos, as plantas, também evoluíram mecanismos de resistência para adaptarem-se a altas concentrações de As. Estes mecanismos podem ser por meio da redução do arsenato para arsenito, bem como pela restrição da absorção de As, aumentando a absorção específica de P (CERVANTES et al., 1994), ou ainda reações de peroxidação lipídica das nas membranas (ABDRASHITOVA et al., 1990).

Quando o As é absorvido pelas raízes das plantas na forma de arsenato, ele é rapidamente reduzido a arsenito. O arsenito é altamente tóxico para as plantas, pois este reage com grupos sulfidrilas de enzimas e proteínas dos tecidos, inibindo funções celulares, como a produção de adenosina trifosfato (ATP), causando a morte celular. Além disso, o As desencadeia a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MASCHEER et al., 2002), as quais provocam a peroxidação de lipídeos das membranas, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos (HEATH; PACKER, 1968). Em plantas a toxicidade provocada pelo As é evidenciada por várias características. Os sintomas característicos de toxicidade são: murchamento das folhas, crescimento lento das raízes e parte aérea, cor arroxeada e folhas com necrose (ADRIANO, 2001). O As inibe o metabolismo na maioria das plantas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). As plantas utilizam-se de vários mecanismos homeostáticos, como transporte e processos de sequestro e quelação, que minimizam os danos causados por elementos-traço (CLEMENS, 2001). Dentre estes mecanismos homeostáticos, as fitoquelatinas desempenham um papel importante na desintoxicação de metais e metalóides, como o As, formando complexos com os elementos-traço no citoplasma, reduzindo a toxicidade dentro da célula e atuam ainda como biomarcadores da toxicidade em plantas terrestres (STEFFENS, 1990; SNELLER et al., 1999; CLEMENS, 2001).

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

A enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), um dos mais efetivos processos enzimáticos antioxidantes, catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, na

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

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

As enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) degradam o H_2O_2 em água e em um composto oxidado, que depende do tipo de peroxidase atuante. São encontradas no citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular, no apoplasto, nas mitocôndrias e nos peroxissomos (MITTLER, 2002). A POX predominante é a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), que catalisa a oxidação do ascorbato em peróxido de hidrogênio gerando o desidroascorbato. A APX está presente no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no apoplasto e nos cloroplastos (MITTLER, 2002). A APX participa, juntamente com a redutase da glutathiona, do ciclo ascorbato-glutathiona.

A glutathiona redutase (GR, EC 1.8.1.7) reduz a glutathiona oxidada (GSSG) utilizando NADPH, que é utilizada para regenerar o ascorbato, substrato da APX (APEL; HIRT, 2004). Incremento na atividade da GR resulta em aumento na concentração de glutathiona reduzida (GSH) e decréscimo na concentração de GSSG no interior das células, aumentando assim, a razão GSH/GSSG (ISRAR et al., 2006). A GSH é um tripetídeo (γ -glu-cys-gly) que, além de participar do ciclo ascorbato-glutathiona, é capaz de consumir algumas EROs e participa também da síntese de fitoquelatinas (SCHMÖGER; OVEN; GRILL, 2000; PAWLIK-SKOWRONSKA et al., 2004).

Apesar de o As ser tóxico para a maioria das plantas, algumas espécies vegetais têm a capacidade de acumular este elemento em quantidades

consideráveis, principalmente as pteridófitas (MEHARG, 2003). Plantas hiperacumuladoras de As são aquelas capazes de concentrar, no mínimo, 0,1% do elemento em sua massa seca (BROOKS, 1998). Este é um fenômeno raro, além desta capacidade devem ainda ser levados em consideração o fator de translocação (FT), definido como a razão entre a concentração do elemento na biomassa aérea da planta em relação à concentração na raiz (FAYAIGA; MA, 2005; HUANG et al., 2006); e o fator de bioacumulação (FB), definido como a razão entre a concentração do elemento na planta em relação ao meio (MA et al., 2001; HUANG et al., 2006). Uma espécie acumuladora de arsênio deve ter FB e $FT > 1$ e a concentração total de As deve ser superior a 1.000 mg kg^{-1} na biomassa da planta. *Pteris vittata* foi a primeira espécie vegetal a ser descrita como hiperacumuladora, pois tem a capacidade de remover As do solo, podendo acumular cerca de $22.630 \text{ mg As kg}^{-1}$ (MA et al., 2001) e tem a capacidade de concentrar em sua biomassa 100 vezes mais As do que a concentração deste elemento no solo. Após a descrição desta espécie, outras também pertencentes ao gênero *Pteris* foram descritas como hiperacumuladoras (ZHAO; DUNHAM; MACGRATH, 2002; SRIVRIVASTAVA; MA; SANTOS, 2006), além da espécie *Pityrogramma calomelanos* (FRANCESCONI et al., 2002). Contudo, nem toda espécie de *Pteris* é acumuladora de As (MEHARG, 2003; WANG et al., 2007). Dos 450 táxons de plantas documentadas como hiperacumuladoras de metais ou metalóides, pouco menos de 0,2% são de angiospermas.

2.3 Fitorremediação na recuperação de áreas degradadas

Vários tipos de tecnologias aplicáveis a solos e resíduos contaminados por As, como solidificação/estabilização, vitrificação, lavagem de solos/extração ácida, a recuperação (cobertura) pirometalúrgica, nivelamento do solo *in situ*, eletrocínética, tratamento biológico, e fitorremediação são recomendadas pela

Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA, 2002). Para facilitar a comparação com os sistemas de recuperação física, Cunningham et al. (1995), redefiniram as plantas como “sistemas de bombeamento e filtragem impulsionados pela energia solar” que têm “capacidades mensuráveis de carregar, degradar e imobilizar”. As raízes são descritas como “extratores exploratórios de fase líquida que podem encontrar, alterar e/ou translocar elementos e compostos contra grandes gradientes químicos”. As plantas também podem ser uma alternativa econômica para sistemas de recuperação física, com custos bastante inferiores aos necessários para custear tecnologias de remediação físico-química.

A arte da remediação inicia com uma avaliação minuciosa do local, seguindo com uma contenção do problema identificado e culmina com a “limpeza” da área impactada. Métodos tradicionais de remediação de solos, sedimentos e águas subterrâneas são frequentemente baseados em tecnologias da engenharia química e civil que têm se desenvolvido ao longo dos últimos 20 anos. Isto inclui ampla variedade de tratamentos químicos e físicos, bem como manipulações para acelerar ou reduzir o movimento do agente contaminante na matriz. Embora, em certos casos, processos biológicos, em especial microbiológicos, tenham mostrado aplicabilidade (CUNNINGHAM et al., 1997).

Fitorremediação (do grego o prefixo *phyto*, planta e do latim o sufixo *remedium*, cura ou tratamento) é uma designação dada a uma série de tecnologias que fazem uso de plantas para controlar e/ou amenizar a contaminação em áreas comprometidas. Muitas técnicas e aplicações têm sido erroneamente chamadas de fitorremediação, causando certa confusão. O termo é relativamente novo, proposto em 1991 (EPA, 2000).

A fitorremediação de sítios contaminados por As utilizando plantas hiperacumuladoras tem atraído bastante atenção. Fitorremediação é definida

normalmente como o uso de plantas para remover poluentes, o que oferece uma tecnologia verde remediadora, econômica e viável para ambientes contaminados, em comparação com técnicas de substituição, solidificação e lavagem do solo, bastante utilizadas (BAKER et al., 1994; SALT; SMITH; RASKIN, 1998; BLAYLOCK et al., 1999). A fitoextração é uma das estratégias mais promissoras da fitorremediação, no que se refere à translocação e concentração dos metais no interior das plantas acumuladoras. A aplicação da fitoextração está limitada a testes de campo em pequena escala, mas tem sido proposta como uma tecnologia bastante viável para a remoção de poluentes do ambiente. Embora haja um número crescente de trabalhos realizados com espécies vegetais hiperacumuladoras de As, especialmente *Pteris vittata*, as informações disponíveis sobre a fitorremediação de As em condições de campo ainda são escassas.

A fitorremediação vem se destacando dos demais métodos de remediação de solos contaminados, em especial, por elementos-traço, devido ao seu caráter permanente, aplicada *in situ*, associada aos baixos custos de manutenção, melhoria da estrutura do solo, aumento da fertilidade, proteção do solo contra erosão hídrica e eólica, sendo esta última uma característica de extrema relevância em solos contaminados com As, pois a dispersão pelo vento é uma das formas de contaminação por este elemento, além de recuperar a estética da área impactada e melhorar as condições para o desenvolvimento de microrganismos do solo, dentre os quais um grande número participa de processos vitais para o planeta, como as bactérias fixadoras de nitrogênio (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000; CUNNINGHAM; OW, 1996; HARTLEY et al., 2009; SANTOS, 2010; LOPEZ, 2010).

A fitorremediação tem emergido como uma fitotecnologia bastante promissora, econômica e operacionalmente, por utilizar plantas e a microbiota rizosférica associada, para remover ou conter poluentes orgânicos e inorgânicos

de ambientes contaminados, como elementos-traço que, no presente trabalho, destaca-se o As.

A influência dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos dos elementos é de grande interesse ecológico e econômico, pois as ações desempenhadas por estes organismos garantem os “serviços da natureza”, que são componentes essenciais dos ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A participação dos microrganismos na ciclagem dos elementos, não se restringe aos ciclos do C, N, P, S, elementos indispensáveis para vida no planeta. Há microrganismos que atuam no ciclo geoquímico de elementos como o As, atuando na redução, oxidação e metilação (OREMLAND; STOLZ, 2003; ISLAM et al., 2004), afetando tanto a especiação quanto a toxicidade deste elemento, que até o presente momento não se conhece o papel funcional para a essencialidade da vida no planeta. O arsenato é menos tóxico que o arsenito, mas paradoxalmente, a resistência ao arsenato requer que este seja reduzido a arsenito, o qual será extruído da célula. Por outro lado, a oxidação do arsenito, que seria um mecanismo, principalmente, de desintoxicação celular (ANDERSON; WILLIAMS; HILLE, 1992), pode tornar-se fonte de energia em microrganismos quimiolitotróficos (SILVER; PHUNG, 2005). Bactérias que metabolizam elementos tóxicos representam, portanto, uma ferramenta bastante promissora para a restauração de áreas contaminadas, como as de mineração.

Solos poluídos por ações antrópicas, geralmente apresentam níveis de matéria orgânica reduzidos, e portanto, o crescimento de plantas neste solos é muitas vezes limitado pela deficiência de N. Em vista disso, estratégias de revegetação, usualmente utilizam espécies vegetais leguminosas para melhorar o teor de N no solo (GRAHAM; VANCE, 2003; MOREIRA; SOARES; SIQUEIRA, 2010). Recentemente, cresceu o interesse pela utilização de leguminosas associadas com microrganismos para a biorremediação, tanto de áreas contaminadas por elementos-traço (CARRASCO et al., 2005; MATSUDA

et al., 2002a-b; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; FRANCO et al., 1992), quanto por poluentes orgânicos (BARAC et al., 2004). Este sistema apresenta uma série de vantagens, como o uso de microrganismos, fator que afeta a solubilidade, biodisponibilidade e mobilidade de elementos-traço; e leguminosas, normalmente são pioneiras na colonização de solos de baixa fertilidade e degradados, possuindo espécies adaptadas a diferentes ambientes, e o uso de associação simbiótica rizóbio-leguminosa como um sistema eficiente no fornecimento de N. Esta perfeita combinação atua ainda, estimulando a sobrevivência e ação de organismos rizosféricos, para uma degradação mais eficiente dos poluentes (GLICK, 2004; KUIPER et al., 2004; ZHUANG et al., 2007).

2.4 Leguminosas e simbioses radiculares em ambientes contaminados com elementos-traço

Minas de exploração mineral a céu aberto representam um grande desafio para programas de recuperação de áreas degradadas. Nestes ambientes, todo o horizonte superficial do solo é retirado, levando à exposição de materiais com baixa estruturação e susceptíveis a promover a dispersão de argila (DIAS, 1998). Sendo assim, a introdução de espécies vegetais capazes de estabelecer simbioses com microrganismos do solo, como FMAs e BFNNL, é uma alternativa a ser utilizada. Espécies leguminosas de rápido crescimento e grande produção de matéria vegetal têm-se mostrado efetivas nestas condições (MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002a-b; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; FRANCO et al., 1992).

Estudos têm demonstrado a ocorrência de vários isolados de FMAs em solos contaminados por elementos-traço e ainda a ação fitoprotetora da simbiose

micorrízica nestas condições (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2007). Em 2008, Soares e Siqueira relataram os benefícios da inoculação de FMAs para o crescimento de *Brachiaria decumbens* em solo multicontaminado por elementos-traço. O efeito benéfico da inoculação foi atribuído à redução na concentração destes elementos na parte aérea das plantas micorrizadas, com maior retenção nas raízes. Recentemente, Schneider (2011) relatou a ocorrência de espécies de FMAs em solos contaminados com elevados teores de As, demonstrando o grande e generalizado potencial de adaptação dos FMAs ao elevado teor de As.

Embora as evidências de proteção dos FMAs às plantas sejam fortes, os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados, sendo necessários mais estudos a fim de demonstrar como estes mecanismos atuam. Entretanto, grupos de pesquisa internacionais têm sugerido vários mecanismos como: efeito de diluição dos elementos-traço nos tecidos vegetais em devido a um maior crescimento vegetal (CHRISTIE; LI; CHEN, 2004); supressão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera (KALDORF et al., 1999); redução da absorção devido à retenção e imobilização dos elementos-traço nas estruturas fúngicas (KHAN et al., 2000; ZHU; CHRISTIE; LAIDLAW, 2001; GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2002) com consequente redução da transferência dos elementos das raízes para a parte aérea (JONER; BRIONES; LEYVAL, 2000; CHRISTIE; LI; CHEN, 2004).

Resultados experimentais evidenciam que as micorrizas podem atuar como barreira física ao transporte desses elementos para a parte aérea (ANDRADE et al., 2003; ANDRADE; JORGE; SILVEIRA, 2005; SOARES; SIQUEIRA, 2008). Estudos realizados no exterior apontam que isto ocorre possivelmente em função da complexação dos elementos-traço em grupos funcionais da parede celular dos FMAs tais como: hidroxila, carboxila, amino e sulfídrico (GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1994; GOMES; MENDONÇA-

HAGLER; SAVVAIDIS, 1998). Além da complexação é possível que haja retenção em glicoproteínas insolúveis denominadas “glomalinas” que são produzidas em grande quantidade pelas hifas de certos FMAs, onde grande quantidade de elementos-traço pode ser sequestrada. Cabral et al. (2009) constataram elevada retenção de Cu no micélio de FMA *in vitro*.

Recentemente, o envolvimento da simbiose micorrízica na redução da fitotoxidez de As, tem sido o objeto de estudo de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. Os resultados têm demonstrado que a maioria das plantas adaptadas a solos contaminados com As são geralmente associadas aos FMAs (GONZÁLEZ-CHAVEZ et al., 2002; WANG et al., 2002; AL AGELY; SYLVIA; MA, 2005) e isto estaria relacionado com o aumento na aquisição de P pelas plantas micorrizadas (AHMED; KILLHAM; ALEXANDER, 2006; CHEN et al., 2007). O arsenato é dominante sob condições aeróbicas, sendo este análogo ao fosfato. Devido a essa similaridade, a absorção de As e P pelas plantas e pelos FMAs pode ocorrer através dos mesmos transportadores (MEHARG; MACNAIR, 1992; ROSEN, 2002), o que possibilita a inibição efetiva da absorção de arsenato pelo fosfato.

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

Para um melhor entendimento dos mecanismos que atuam na atenuação da toxidez de elementos-traço em plantas micorrizadas, a avaliação da expressão gênica tanto de plantas quanto de fungos micorrízicos que possam estar envolvidos nos mecanismos de detoxificação e tolerância (RIVERA-BECERRIL et al., 2005) apresenta-se como uma alternativa bastante promissora. Estudos brasileiros nesta área são inexistentes, porém resultados promissores obtidos pela comunidade científica internacional têm sido publicados (HILDEBRANDT; REGVAR; BOTHE, 2007; GONZÁLEZ-GUERRERO et al., 2005; LANFRANCO et al., 2002).

Além da ocorrência de FMAs em solos contaminados com elevados teores de As, tem sido relatado também a ocorrência natural de leguminosas (CARRASCO et al., 2005) e rizóbios (MANDAL et al., 2008; CARRASCO et al., 2005; MACUR et al., 2001). No entanto, a utilização de leguminosas inoculadas na revegetação de solos brasileiros contaminados com As é inexistente (REICHMAN, 2007; CARRASCO et al., 2005).

A utilização de microrganismos em estudos de revegetação de áreas contaminadas com elementos-traço tem sido pouco explorada até o momento (VÁSQUEZ; ESTEBEN; CARPENA, 2008; CARRASCO et al., 2005). Quando se trata de contaminação orgânica, os microrganismos são capazes de oxidar o material orgânico a CO₂, porém elementos-traços não sofrem a mesma ação, sendo possível apenas alterar a sua forma. No entanto, bactérias demonstram algumas respostas a elementos-traço como biossorção, precipitação e atuação enzimática para a transformação de um determinado elemento, sendo ferramenta importante a ser utilizada na recuperação de áreas contaminadas com elementos-traço (VALLS; LORENZO, 2002). Diels, van der Lelie e Bastiaens (2002) desenvolveram reatores baseados na biossorção de elementos-traço presentes em solo e água subterrânea por microrganismos. A precipitação de elementos-traço por microrganismos é o resultado da redução dissimilatória ou ainda uma

consequência secundária de processos metabólicos não relacionados diretamente com a transformação destes (LLOYD et al., 2000). Junto com a transformação mediada por enzimas, que levam a precipitação, outros processos biológicos podem ser aplicados para biorremediação, desde que não sejam responsáveis por aumentar os riscos ao ambiente.

A capacidade de rizóbios, isolados de áreas contaminadas com elevadas concentrações de As, em acumular e serem resistentes a diferentes níveis deste elemento tem sido relatada (MANDAL et al., 2008; CARRASCO et al., 2005; MACUR et al., 2001). Sabe-se que algumas espécies possuem genes (ars) que codificam para a resistência ao As. No entanto, estudos brasileiros abordando a tolerância e resistência ao As em rizóbios são inexistentes.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Grupos de pesquisa internacionais têm demonstrado que a maioria das plantas adaptadas a solos contaminados com As são geralmente associadas aos FMAs e isto estaria relacionado com o aumento na aquisição de P pelas plantas micorrizadas.

Além da ocorrência de FMAs em solos contaminados com elevados teores de As, tem sido relatado também a ocorrência natural de leguminosas e rizóbios. No entanto, a utilização de leguminosas, associadas a FMAs e rizóbios, na revegetação de solos brasileiros contaminados com As tem sido pouco explorada até o momento.

REFERÊNCIAS

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

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

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York, Springer, 2001. 879 p.

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

AL AGELY, A.; SYLVIA, D. M.; MA, L. Q. Mycorrhizae increase arsenic uptake by the hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 34, p. 2181-2186, 2005.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. Glasgow, Black Academic & Professional, 1990. 339 p.

ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, J.; HILLE, R. The purification and characterization of arsenite oxydase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum containing hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 23674-23682, 1992.

ANDRADE, S. A. L. et al. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, p. 945-954, 2003.

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

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

BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 41-49, 1994.

BARAC, T. et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature**, Londres, v. 22, p. 583-588, 2004.

BLAYLOCK, M. J. et al. Phytoremediation of Lead-Contaminated Soil at a New Jersey Browfield Site. **The Journal of environmental cleanup costs, technologies and techniques**, Washington, v. 9, p. 93-101, 1999.

BROOKS, R. R. **Plants that hyperaccumulate heavy metals**. Wallingford: CAB International, 1998. 384 p.

CABRAL, L. et al. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 25-29, 2009.

CAMPOS, M. L. et al. Teor e capacidade máxima de adsorção de arsênio em latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, p. 1311-1318, 2007.

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

CARNEIRO, M. A. C. et al. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 1669-1677, 1999.

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

CENTENO, J. A. et al. Pathology related to chronic arsenic exposure. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Parks, v. 110, p. 883-886, 2002.

CERVANTES, C. et al. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 355-367, 1994.

CHEN, Y.; AHSAN, H. Cancer burden from arsenic in drinking water in Bangladesh. **American Journal of Public Health**, Boston, v. 94, p. 741-744, 2004.

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

CHEN, M.; MA, L. Q.; HARRIS, W. G. Baseline concentrations of 15 trace elements in Florida soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 28, p. 1173-1181, 1999.

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

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

CUNNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R.; HUANG, J. W. Phytoremediation of contaminated soils. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p. 393-397, 1995.

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

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of contaminated water and soil. In: KRUGER, E. L.; ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. (Ed), **Phytoremediation of soil and water contaminants**, Washington: American Chemical Society, 1997. v. 664, p. 2-17.

DIAS, L. E. Caracterização de substratos para fins de recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa-MG: Folha de Viçosa, 1998. p. 27-44.

DIELS, L.; van der LELIE; N.; BASTIAENS, L. New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Amsterdam, v. 1, p. 75-82, 2002.

FAYIGA, A. O.; MA, L. Q. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 168, p. 71-89, 2005.

FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Ptyrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 284, p. 27-35, 2002.

FRANCO, A. A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1992. 8 p. (Comunicado Técnico, 9).

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, p. 364-368, 1994.

GLICK, B. R. Teamwork in phytoremediation. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p. 526-527, 2004.

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 29, p. 85-92, 1998.

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

GONZÁLEZ-GUERRERO, M. et al. Characterization of a *Glomus* intraradices gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 130-140, 2005.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 131, p. 872-877, 2003.

HARTLEY, W. et al. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, p. 2654-2662, 2009.

HEATH, R. L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 139-146, 2007.

HUANG, R. Q. et al. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, Southeast China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 368, p. 531-541, 2006.

ISLAM, F. S. et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. **Nature**, London, v. 430, p. 68-71, 2004.

ISRAR, M. et al. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere: Chemistry, physics and biology as focused on environmental problems*, Oxford, v. 65, p. 591-598, 2006.

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

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

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

KHAN, A.G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere: Chemistry, physics and biology as focused on environmental problems*, Oxford, v. 21, p. 197-207, 2000.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E. J. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.85-144.

KUIPER, I. et al. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 17, p. 6-15, 2004.

LADEIRA, A. C. Q.; CIMINELLI, V. S. T. Mobility of As (III) and As (V) on soils. In: COURTENEY YOUNG (Ed.). **Minor elements**. Salt Lake: SME, 2000. p. 191-198.

LANFRANCO, L. et al. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, p. 58-67, 2002.

LLOYD, J. R. et al. Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3743-3749, 2000.

LOPEZ, M. V. **Microbiota edáfica como indicadora da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

MACUR, R. E. et al. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 35, p. 3676-3682, 2001.

MANDAL, S. M. et al. Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: Isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 54, p. 93-99, 2008.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, London, v. 58, p. 201-235, 2002.

MARQUES, J. J. G. S. M. **Trace element distributions at the landscape and micrometer scales**. 2000. 183 p. PhD Thesis – Purdue University, West Lafayette, 2000.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 121-132, 2000.

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

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S. M.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 343-355, 2002a.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S. M.; SIQUEIRA, J. O. Sobrevivência de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* em misturas de solo contaminadas com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 26, p. 249-256, 2002b.

McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. Suppression of the High Affinity Phosphate Uptake System: A Mechanism of Arsenate Tolerance in *Holcus lanatus* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 519-524, 1992.

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

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

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; CARVALHO, T. S.; SIQUEIRA, J. O. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 771-779, 2010.

OLIVEIRA, R. C. et al. Arsênio em solos do Cerrado. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 25., 2002, Rio de Janeiro. **Anais....** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2002. 9 p.

O'NEILL, P. Arsenic. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: J. Wiley, 1990. 339 p.

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

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

PRASAD, M. N. V. et al. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. **Environmental Pollution**, Barking, v. 158, p. 18-23, 2010.

REICHMAN, S. M. The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2587-2593, 2007.

RIVERA-BECERRIL, F. et al. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 51-60, 2005.

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

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

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-668, 1998.

SANTOS, G. A. **Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio**. 2006. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SANTOS, J. V. **Biomassa e atividade microbiana como indicadoras da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço**. 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

SCHNEIDER, J. **Ecologia e fitoproteção de fungos micorrízicos arbusculares em solos contaminados com arsênio**. 2011. 179 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SILVA, S.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1749-1757, 2006.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 599-608, 2005.

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

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A. et al. (Ed.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 654 p.

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

SNELLER, F. E. C. et al. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. **New Phytologist**, Cambridge, v. 144, p. 223-232, 1999.

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

SOUZA, F. A.; SILVA, E. M. R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: Siqueira, J. O. (Ed). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. 290 p.

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

STEFFENS, J. C. The heavy metal-binding peptides of plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 553-575, 1990.

THANABALASINGAM, P.; PICKERING, W. F. Arsenic sorption by humic acids. **Environmental Pollution**, London, v. 12, p. 233-246. 1986.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1443-1452, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Arsenic Treatment Technologies for Soil, Waste, and Water**. Office of Solid Waste and Emergency Response. 2002. EPA-542-R-02-004. Disponível em: <http://www.clu-in.org/download/remed/542r02004/arsenic_report.pdf>. Acesso em: 5 ago 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Introduction to Phytoremediation**. Office of Research and Development. 2000. EPA-600-R-99-107. Disponível em: <<http://clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>>. Acesso em: 05 ago 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chenico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALLS, M.; de LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 327-338, 2002.

VÁSQUEZ, S.; ESTEBEN, E.; CARPENA, R. O. Evolution of arsenate toxicity in nodulated white lupine in a long-term culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 8580-8587, 2008.

VENUGOPAL, B.; LUCKEY, T. D. Metal Toxicity in Mammals. In: VENUGOPAL, B.; LUCKEY, T. D. **Chemical toxicity of metals and metalloids**. New York: Plenum, 1978. v. 2, 409 p.

WALTHAM, C. A.; EICK, M. J. Kinetics of arsenate adsorption on goethite in the presence of silicic acid. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 66, p. 818-825. 2002.

WANG, J. R. et al. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, p. 1552-1561, 2002.

WANG, H. B. et al. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, p. 225-233, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Arsenic in drinking water**. 2001a. Disponível em: <<http://www.who.int/int-fs/en/fact210.html>>. Acesso em: 15 jan 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arsenic and arsenic compounds. **Environmental Health Criteria 224**. 2 ed. 2001b. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#1.1>>. Acesso em: 15 jan 2010.

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

ZHAO, F. J.; DUNHAM, S. J.; MACGRATH, S. P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 156, p. 27-31, 2002.

ZHU, Y. G.; CHRISTIE, P.; LAIDLAW, A. S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere: Chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 42, p. 193-199, 2001.

ZHUANG, X. et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environmental International**, New York, v. 33, p. 406-413, 2007.

CAPÍTULO 2 Fungos Micorrízicos arbusculares na toxicidade de arsênio para leguminosas em solo contaminado pela extração de ouro

RESUMO

A fitorremediação tem emergido como uma fitotecnologia bastante promissora, econômica e operacionalmente, por utilizar plantas e a microbiota rizosférica associada, para remover ou conter elementos-traço. Foram avaliados o potencial de uso de espécies leguminosas associadas a FMAs e rizóbios, e também o efeito da inoculação de FMAs na fitoproteção de leguminosas inoculadas com rizóbios em solo contaminado com As. Quatro espécies leguminosas inoculadas com suas respectivas estirpes bacterianas fixadoras de Nitrogênio aprovadas como inoculante, *Acacia mangium* (BR 3617 – *Bradyrhizobium japonicum*), *Crotalaria juncea* L. (BR 2001 – *Bradyrhizobium* sp.), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell. Conc.) Morong (BR 4406 – *Bradyrhizobium elkanii*) e *Stizolobium aterrimum* (BR 2811 – *Bradyrhizobium* sp.), em associação com FMAs, foram cultivadas em solo contaminado com As. Foram testados quatro isolados de FMAs, *Glomus etunicatum*, *Acaulospora morrowiae*, *Gigaspora gigantea* e *Acaulospora* sp., sendo os primeiros oriundos de solo multicontaminado com Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), e o último isolado de solo contaminado com As. O experimento contou também com um tratamento controle sem inoculação de FMAs. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para avaliar o potencial das espécies vegetais utilizadas, quanto à extração de As, e identificá-las como tolerantes ou hiperacumuladoras, adotou-se o índice de translocação (IT). A relação P:As foi utilizada para verificar se o efeito protetor dos FMAs sobre as espécies vegetais apresenta relação com a melhoria do estado nutricional de P em relação a As, sendo avaliadas também enzimas do sistema antioxidativo como APX, CAT, GR e SOD. As raízes das plantas utilizadas como controle, sem inoculação de FMAs, não apresentaram colonização micorrízica, para todas as espécies vegetais testadas, enquanto as raízes das plantas inoculadas apresentaram até 26, 28, 25 e 24% de colonização, para *Acacia mangium*, *Crotalaria juncea*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Stizolobium aterrimum*, respectivamente. A inoculação com FMAs proporcionou incremento significativo da produção de matéria seca da parte aérea em todas as espécies vegetais, porém houve diferenças entre os isolados de FMAs testados. As quatro espécies vegetais apresentaram um baixo índice de translocação de As, sendo a maior parte deste acumulada nas raízes, caracterizando-as como tolerantes ao As. A inoculação de FMAs melhorou significativamente a relação P:As e reduziu a atividade de enzimas antioxidantes, demonstrando o efeito seu fitoprotetor e o potencial de uso na recuperação de solos contaminados com As.

Palavras-chave: Micorriza arbuscular. Leguminosas tropicais. Fitorremediação.

ABSTRACT

Phytoremediation has emerged as a promising phytotechnology, which is economically and operationally beneficial on the basis of plants and associated rhizospheric microorganisms can remove or retain trace elements. We evaluated the potential of leguminous species associated with rhizobia and AMF, and the effect of AMF to phytoprotection of legumes inoculated with rhizobia in contaminated soil with As. *Acacia mangium* and BR 3617 - *Bradyrhizobium japonicum*, *Crotalaria juncea* L. and BR 2001 - *Bradyrhizobium* sp., *Enterolobium contortisiliquum* (Vell. Conc.) Morong and BR 4406 - *Bradyrhizobium elkanii* and *Stizolobium aterrimum* and BR 2811 - *Bradyrhizobium* sp., in association with mycorrhizal fungi in soil contaminated with As were used. The AMF species were *Glomus etunicatum*, *Acaulospora morrowiae*, *Gigaspora gigantea* isolated from multi-contaminated soil and *Acaulospora* sp. isolated from As contaminated soil. The experiment also included a control treatment without AMF inoculation. It was used a completely randomized design with four replications. The transfer factor (TF) was used to assess the potential of As extraction by the plant species, to define the plants as tolerant or hyperaccumulators. The ratio P:As was used to verify whether the protective effect of AMF on plant species was related to improvement of nutritional status in relation to the P, also the antioxidant capacity was evaluated by the determination of the enzymatic activity of APX, CAT, GR and SOD. The roots of the plants used as control without AMF inoculation did not show mycorrhizal colonization for all the plant species tested, while the inoculated roots showed colonization up to 26%, 28%, 25% 24% for *Acacia mangium*, *Crotalaria juncea*, *Enterolobium contortisiliquum* and *Stizolobium aterrimum*, respectively. Inoculation with AM fungi has provided significant increase in dry matter production of shoots in all plant species, but there were differences among AMF species. The four plant species showed a low As transfer factor because of the high accumulation in the roots, characterizing them as As tolerant. The inoculation of AMF improved the ratio P:As significantly and the antioxidant enzymes activity reduced significantly too. It demonstrates the phytoprotector effect and its potential use in remediation of contaminated soils with As.

Keywords: Arbuscular mycorrhizas. Tropical leguminous. Phytoremediation.

1 INTRODUÇÃO

A recuperação de áreas contaminadas por arsênio (As) tem sido um grande desafio para a comunidade científica em todo o mundo, principalmente de áreas de mineração, pois durante o processo de extração são produzidas grandes quantidades de rejeito que afetam bruscamente a cobertura vegetal (BAKER et al. 1994; HUANG et al. 2004; DONG et al. 2008). A retirada da cobertura vegetal em áreas contaminadas acelera a degradação do solo, pois o deixa desprotegido contra a erosão hídrica e eólica, ocasionando a lixiviação dos contaminantes para o lençol freático e desencadeando um efeito cascata, que leva os contaminantes para outras áreas. Tecnologias envolvendo processos físicos, químicos e biológicos, têm sido utilizadas para a recuperação de áreas contaminadas por elementos-traço, dentre as quais tem se destacado nos últimos 20 anos a fitotecnologia, técnica bastante promissora para a reabilitação *in situ* dessas áreas (BAKER et al. 1994; CHANEY et al. 1997, CUNNINGHAM et al. 1997; ITRC 2009), que consiste basicamente em utilizar plantas tolerantes aos contaminantes para a degradação, extração, contenção dos mesmos ou a ação simultânea dos três mecanismos. O emprego de fitotecnologias vem apresentando resultados satisfatórios para a reabilitação de ambientes que sofreram algum tipo de contaminação, seja por compostos orgânicos e/ou inorgânicos (CUNNINGHAM; BERTI; HUANG, 1995; TU et al. 2004; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; NASCIMENTO; XING, 2006; CARNEIRO et al., 2008). Contudo, deve ser considerada também a rizosfera, que atua beneficiando o desenvolvimento das plantas, abrigando entre outros organismos, fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL), os quais estabelecem interações simbióticas mutualísticas com as plantas hospedeiras (CARNEIRO et al., 1999; SILVA; SOARES; SIQUEIRA, 2006; SOARES; SIQUEIRA, 2008).

A relação simbiótica planta-bactérias diazotróficas-fungos micorrízicos, estabelecida de forma mutualística, constitui um sistema tripartite funcional bastante interessante. As plantas noduladas (leguminosas) e micorrizadas adquirem a capacidade de incorporar C e N ao solo, e elevam sua capacidade de absorção de nutrientes, como o P, por exemplo, tornando-se mais tolerantes aos estresses ambientais (SOUZA; SILVA, 1996; FRANCO; FARIA, 1997; FRANCO et al., 2000; FRANCO; BALIEIRO, 2000). Assim, espécies vegetais como as leguminosas que estabelecem estas simbioses são indicadas para aumentar o teor de matéria orgânica do sistema em condições de baixa fertilidade, como é o caso de áreas mineradas.

Recentemente, o envolvimento da simbiose micorrízica na redução da fitotoxicidade de As tem sido o objeto de estudo de vários grupos de pesquisa internacionais. Os resultados têm demonstrado que a maioria das plantas adaptadas a solos contaminados com As são geralmente associadas aos FMAs (GONZÁLEZ-CHAVEZ et al., 2002; WANG et al., 2002; AGELY et al., 2005) e isto estaria relacionado com o aumento na aquisição de P pelas plantas micorrizadas (AHMED et al., 2006; CHEN et al., 2007). Xu et al. (2008) demonstraram o aumento da tolerância de *Medicago truncatula* ao As exercido pela inoculação de *Glomus mosseae*. Neste experimento foi observado uma elevada relação P:As, firmando o efeito protetor exercido pelo FMA.

No entanto, a revegetação de solos brasileiros contaminados com arsênio, em associação com a microbiota edáfica, é dificultada pela falta de informações sobre espécies tolerantes, pois as espécies até agora caracterizadas e identificadas se restringem às de clima temperado. Sendo assim, a seleção de espécies tropicais tolerantes ao As é o primeiro passo para um processo eficiente de revegetação de solos e substratos brasileiros contaminados com este metalóide. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial

fitorremediador de quatro leguminosas e a contribuição dos FMAs no crescimento destas espécies em solo contaminado com As.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, Departamento de Ciência do Solo (DCS), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período de 05/03/2010 a 04/05/2010. Avaliou-se, independentemente, o potencial de quatro espécies leguminosas inoculadas com suas respectivas estirpes bacterianas fixadoras de Nitrogênio aprovadas como inoculante pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), *Acacia mangium* (BR 3617 – *Bradyrhizobium japonicum*), *Crotalaria juncea* L. (BR 2001 – *Bradyrhizobium* sp.), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell. Conc.) Morong (BR 4406 – *Bradyrhizobium elkanii*) e *Stizolobium aterrimum* (BR 2811 – *Bradyrhizobium* sp.), em associação com FMAs, em solo contaminado com As. Para estes estudos procurou selecionar-se espécies vegetais que apresentassem crescimento inicial rápido e em baixos valores de pH, visto as características que o solo utilizado como substrato apresentava. Como substrato foram utilizados 200 kg solo da camada superficial (0-20 cm) proveniente de uma área de mineração de ouro, localizada no município de Paracatu-MG. A coleta do solo ocorreu em julho de 2008. O solo foi seco ao ar em temperatura ambiente ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) e peneirado em malha de 2 mm.

Ao solo foi adicionado CaCO_3 PA de modo a elevar a saturação por bases do solo a 50%. Visando otimizar e homogeneizar a adição do mesmo ao volume total de solo, este último foi revolvido durante uma semana sobre lona plástica. Após este procedimento, o solo foi autoclavado a 120°C durante 60 min por dois dias subsequentes, sendo a segunda autoclavagem realizada 24 horas

após a primeira. No quadro 1 são apresentadas as características químicas e físicas do solo utilizado neste experimento, ambas analisadas após a autoclavagem.

A adubação do solo foi feita adicionado fosfato de cálcio dibásico $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ PA, de modo a fornecer 50 mg dm^{-3} de fósforo. O Magnésio foi aplicado como sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 50 mg dm^{-3} , imediatamente após o plantio via solução. Enquanto a adubação potássica, fornecida via sulfato de potássio (K_2SO_4) - 100 mg dm^{-3} , foi realizada juntamente com a aplicação dos micronutrientes, os quais foram aplicados na forma de solução, parcelada em duas vezes (20 e 40 dias após a emergência foliar), num total de 0,81; 3,66; 4,00; 1,33; 0,15 e 1,56 mg dm^{-3} solo de B (H_2BO_3), Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Mo ($\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e Fe (Fe-EDTA), respectivamente (ALVAREZ, 1974).

Quadro 1 Características químicas e físicas da amostra de solo contaminado com arsênio, proveniente de área degradada pela mineração de ouro, para crescimento de leguminosas

pH _{H2O}	Características químicas									
	P-rem	P ⁽¹⁾	K ⁽¹⁾	Ca ²⁺⁽²⁾	Mg ²⁺⁽²⁾	Al ³⁺⁽³⁾	H + Al ⁽³⁾	MO ⁽⁴⁾	As	
									Mehlich ⁽⁵⁾	USEPA ⁽⁶⁾
mg L ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³					dag Kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		
5,5	61,36	40,1	25,4	0,68	0,22	0,1	0,9	0,5	13,2	395,9
Acidez média ^{(7)*}		Bom ^{(8)□}	Baixo ^{(9)†}	Baixo ^{(9)†}	Baixo ^{(9)†}	Muito baixo ^{(9)‡}	Muito baixo ^{(9)‡}	Muito baixo ^{(9)‡}		
Bom ^{(7)**}		Muito bom ^{(8)□□}								
Características físicas										
Areia ⁽¹⁰⁾			Silte ⁽¹⁰⁾		Argila ⁽¹⁰⁾			Classe textural ⁽¹¹⁾		
160			760		80			Franco siltosa		

¹⁾ Extrator Mehlich-1 (MEHLICH, 1978, 1984). ²⁾ Extrator KCl 1 mol L⁻¹. ³⁾ Acidez potencial em pH 7,0 extraída com acetato de cálcio 1 mol L⁻¹. ⁴⁾ Matéria orgânica –oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N. ⁵⁾ Teor de As disponível. ⁶⁾ Teor de As total determinado pelo método 3051-A da USEPA. ⁷⁾ Interpretação para a acidez ativa do solo conforme 5ª aproximação: (* Classificação química, ** Classificação agrônômica). ⁸⁾ Interpretação da disponibilidade para o fósforo de acordo com o teor de argila e com o valor do ^{□□}P rem, conforme 5ª aproximação. ⁹⁾ Interpretação de fertilidade do solo para a matéria orgânica e para o complexo de troca catiônica (†Baixo, ‡Muito baixo) conforme 5ª aproximação. ¹⁰⁾ Método da pipeta (DAY, 1965). ¹¹⁾ Classificação de acordo com a instrução normativa nº 2 do MAPA de 09 de outubro de 2008.

O solo foi disposto em vasos plásticos com capacidade para 2,3 dm³, os quais foram revestidos com sacos plásticos, visando evitar a contaminação do local onde o experimento foi conduzido. Utilizou-se água destilada estéril para ocupar 60% do volume total de poros e o solo foi deixado em incubação por 15 dias.

As sementes das quatro espécies de leguminosas utilizadas foram escarificadas com H₂SO₄ PA concentrado, cada uma em seu tempo necessário, sendo *Acacia mangium* e *Crotalaria juncea* por 5 minutos, *Enterolobium contortisiliquum* e *Stizolobium aterrimum* por 45 minutos. Foram pré-germinadas sobre algodão e papel filtro umedecidos com H₂O destilada estéril, em placas de Petri, incubadas em estufa a 28°C até a emissão da radícula.

As estirpes bacterianas foram cultivadas sob agitação a 120 rpm em meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) líquido, também conhecido como YMA, por 168 horas (10⁸ cel mL⁻¹). Foram aplicados 2 mL de inoculante por plântula, sendo plantadas quatro por vaso para as quatro espécies vegetais em estudo. Passados 30 dias foi feito desbaste deixando apenas duas plantas por vaso.

Foram testados três isolados de FMAs que apresentaram benefícios para o crescimento de plantas em solo multi-contaminado com elementos-traço, em estudo desenvolvido pelo mesmo laboratório, sendo *Glomus etunicatum*, *Acaulospora morrowiae* e *Gigaspora gigantea* (SILVA et al., 2006), e também um isolado proveniente de isolamento do solo em estudo identificado como *Acaulospora* sp. (SCHNEIDER, 2011). O experimento constituiu-se de um tratamento controle sem FMA e quatro tratamentos de inoculação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foram aplicados, aproximadamente, 600 esporos por vaso no transplantio das plântulas. Os esporos foram extraídos (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) de vasos de cultivo mantidos na coleção de FMAs deste laboratório. O tratamento controle

recebeu 50 mL de um filtrado de solo-inóculo sem propágulos de FMAs, objetivando equilibrar a microbiota edáfica.

Para avaliar o potencial fitoprotetor dos FMAs foram analisadas enzimas do estresse oxidativo vegetal, sendo superóxido dismutase (SOD) (GIANNOPOLIS; REIS, 1977), ascorbato peroxidase (APX) (NAKANO; ASCADA, 1981), catalase (CAT) (HAVIR; McHALE, 1987) e glutathione redutase (GR) (CAKMAK et al., 1993). Para a extração enzimática foi retirado o terceiro trifólio, completamente expandido, a partir do ápice, o qual foi congelado em nitrogênio líquido durante a coleta e após foi armazenado em freezer a -80°C .

Para determinar a atividade enzimática foram utilizados 100 mg de tecido foliar. O material foi macerado em N_2 líquido acrescido de 50% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) insolúvel, suficiente para evitar oxidação do material, e homogeneizado em 1 mL do tampão de extração (fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} , pH 7,0; EDTA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; e ácido ascórbico 10 mmol L^{-1}). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para análise da atividade enzimática.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLIS; REIS, 1977), em um meio de reação composto por fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} , pH 7,8, metionina 14 mmol L^{-1} , EDTA $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, NBT $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e riboflavina $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 10 minutos em uma caixa equipada com lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas por espectrofotometria a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da CAT foi estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 3 minutos em um

meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mmol L^{-1} (HAVIR; McHALE, 1987). A atividade da GR, foi obtida baseada no método de Cakmak et al. 1993, monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH com decréscimo na absorbância a 340 nm por 3 minutos, sendo utilizado o meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} , pH 7,8, glutationa oxidada (GSSG) 1 mmol L^{-1} e NADPH 0,075 mmol L^{-1} . A atividade da APX foi realizada monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm (NAKANO; ASADA,1981), sendo o meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} , pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mmol L^{-1} e H_2O_2 0,1 mmol L^{-1} .

Aos 60 dias após a semeadura, foram determinados a altura e o diâmetro do caule das plantas. A seguir, as mesmas foram cortadas ao nível do solo. O tecido vegetal foi separado em parte aérea e raízes, sendo estas últimas lavadas em água corrente visando retirar completamente o solo aderido. Cerca de 1 g de raízes frescas foram coletadas, clarificadas e coradas com azul de tripan (KOSKE; GEMMA, 1989) e avaliadas pelo método das intersecções em placas reticuladas (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) para obter-se a taxa de colonização micorrízica.

O remanescente das raízes foi deixado por aproximadamente 1 minuto em solução de HCl 0,1 mol L^{-1} para remoção do As aderido superficialmente às raízes (TU; MA, 2003). Após esse procedimento, as raízes foram lavadas várias vezes com água deionizada. O restante das amostras de raízes e a parte aérea foram levados para estufa com circulação de ar a 65 °C até massa constante (cerca de 72 h) para determinar a massa da matéria seca.

A determinação do teor de P e As foi realizada nas raízes e na parte aérea, utilizando-se amostras de 0,2 g de material seco finamente triturado, o qual foi digerido segundo metodologia 3051-A da USEPA (USEPA, 1998). Os teores de P e As foram quantificados pela técnica de fluorescência de raios X por

reflexão total (*Total-Reflection X-Ray Fluorescence - TXRF*), usando espectrômetro de bancada “S2 PicoFoxTM” (BRUKER, 2007). As condições de operação para as medições TXRF foram checadas periodicamente, para garantir a qualidade dos resultados obtidos na análise do material vegetal. Alguns testes foram realizados para este propósito seguindo recomendações do fabricante. A avaliação dos espectros da TXRF e o cálculo das concentrações dos elementos com base na relação entre a massa da amostra e do padrão interno foram realizadas utilizando o software Spectra Plus 5.3, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlim, Alemanha conectado ao equipamento (SPECTRA 5.3 SOFTWARE, 2007). As amostras e soluções padrão para a análise TXRF foram preparadas como apresentado a seguir: uma quantidade de 100 µL do padrão interno (100 µg Ga L⁻¹) foi misturada a 500 µL da amostra. A solução resultante foi homogeneizada utilizando um vórtex e uma alíquota de 20 µL foi transferida para o porta amostra (pastilha de quartzo), a qual foi seca em estufa com temperatura em torno de 50°C (STOSNACH & MAGES 2009; MARGUÍ et al. 2010). O limite de detecção (LD) que é a quantidade mínima do elemento que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao background, para o As foi de aproximadamente 6 µg kg⁻¹. O LD foi calculado de acordo com as especificações presentes no manual do equipamento “S2 PicoFoxTM”, utilizando a seguinte equação:

$$LLD_i = \frac{3 * C_i * \sqrt{N_{BG}}}{N_i}$$

em que, LLD_i é o menor limite de detecção do elemento i, C_i é a concentração do elemento i, N_i é a contagem da área do pico de fluorescência, N_{BG} é o background da área subjacente ao pico de fluorescência, e por fim 3 equivale ao critério 3 sigma. Este critério assume que um elemento será detectado somente se a área do pico for 3 vezes maior que a estatística do background (S2 PICOFOX, 2007).

Para avaliar o potencial das espécies vegetais utilizadas, quanto à extração de As, e identificá-las como tolerantes ou hiperacumuladoras, adotou-se o índice de translocação (IT), sendo obtido pela divisão da concentração de As na parte aérea pela concentração nas raízes, e o fator de bioconcentração (FB) obtido pela divisão da concentração de As na planta pela concentração de As no solo (TU et al. 2002), respectivamente. Avaliou-se ainda a relação P:As para verificar se o efeito protetor dos FMAs sobre as espécies vegetais utilizadas apresenta relação com a melhoria do estado nutricional de P em relação a As, uma vez que há antagonismo entre estes dois elementos conforme demonstrado em estudos de Xu et al. (2008) e Dong et al. (2008).

Durante o período experimental, a temperatura média diária variou de 17,1 a 29,1°C, a umidade relativa esteve entre 59 a 90% e a insolação média diária foi de 7,9 horas. Os resultados foram submetidos à análise de variância, quando significativa foi aplicado o teste estatístico Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS

3.1 Nodulação, Colonização micorrízica e produção de biomassa vegetal

Todas as plantas apresentaram sintomas de toxidez, como amarelecimento das folhas basais, com necrose inicial das bordas foliares, já descritos por outros autores (MA et al. 2001, MELO et al. 2009). Contudo, o estresse causado pelo As não afetou a sobrevivência das espécies vegetais durante todo o período experimental.

As quatro espécies vegetais apresentaram nódulos, porém a fixação biológica de nitrogênio mostrou-se eficiente apenas em *A. mangium* e *C. juncea*, nas quais os nódulos embora pequenos mostraram-se viáveis e ativos, com coloração avermelhada. Enquanto as outras duas espécies, *E. contortisiliquum* e *S. aterrimum*, após 30 dias de cultivo demonstraram deficiência de N, fazendo-se necessária a aplicação de 100 mg dm³ N. Embora, a fixação biológica de N tenha suprido as necessidades nutricionais em *A. mangium* e *C. juncea*, houve uma baixa produção de matéria seca por estas duas espécies, impossibilitando obter a quantidade de material necessária para realizar a leitura de N.

Ambos, o tempo de aparecimento dos primeiros nódulos e o número de nódulos por planta foram investigados quanto a presença de As, em estudos realizados por Neumann et al. (1998) e Reichman (2007), onde foi verificado que a nodulação é altamente sensível ao As, o que ajuda a explicar a baixa eficiência das estirpes recomendadas para *E. contortisiliquum* e *S. aterrimum* no solo contaminado com As.

As raízes das plantas utilizadas como controle, sem inoculação de FMAs, não apresentaram colonização micorrízica, para todas as espécies vegetais testadas, enquanto as raízes das plantas inoculadas apresentaram até 26,

28, 25 e 24% de colonização (Tabela 2), para *Acacia mangium*, *Crotalaria juncea*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Stizolobium aterrimum*, respectivamente.

Tabela 2 Taxa de colonização de fungos micorrízicos arbusculares inoculados em quatro leguminosas em um solo contaminado com As

Isolados FMAs	Leguminosas			
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	<i>Stizolobium aterrimum</i>
	Colonização (%)			
Não Inoculado	0 c	0 c	0 c	0 c
<i>Glomus etunicatum</i>	25 a	25 b	21 b	19 b
<i>Gigaspora gigantea</i>	22 b	25 b	25 a	24 a
<i>Acaulospora morrowieae</i>	26 a	26 b	24 a	24 a
<i>Acaulospora sp.</i>	22 b	28 a	21 b	20 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna comparando FMAs, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

A inoculação com FMAs proporcionou incremento significativo da produção de matéria seca da parte aérea em todas as espécies vegetais, porém houve diferenças entre os isolados de FMAs testados (Figura 1). A matéria seca da parte aérea de *Acacia mangium* foi incrementada apenas por *Gigaspora gigantea* e *Acaulospora morrowieae*, sendo o aumento em torno de 3%, já a matéria seca de raízes foi incrementada em torno de 2% pelo isolado *Acaulospora sp.* A matéria seca da parte aérea de *Crotalaria juncea* foi incrementada por todos os isolados testados, destacando-se *Acaulospora morrowieae* e *Acaulospora sp.*, os quais foram responsáveis por aumentos em torno de 30%. A matéria seca de raízes não foi influenciada estatisticamente.

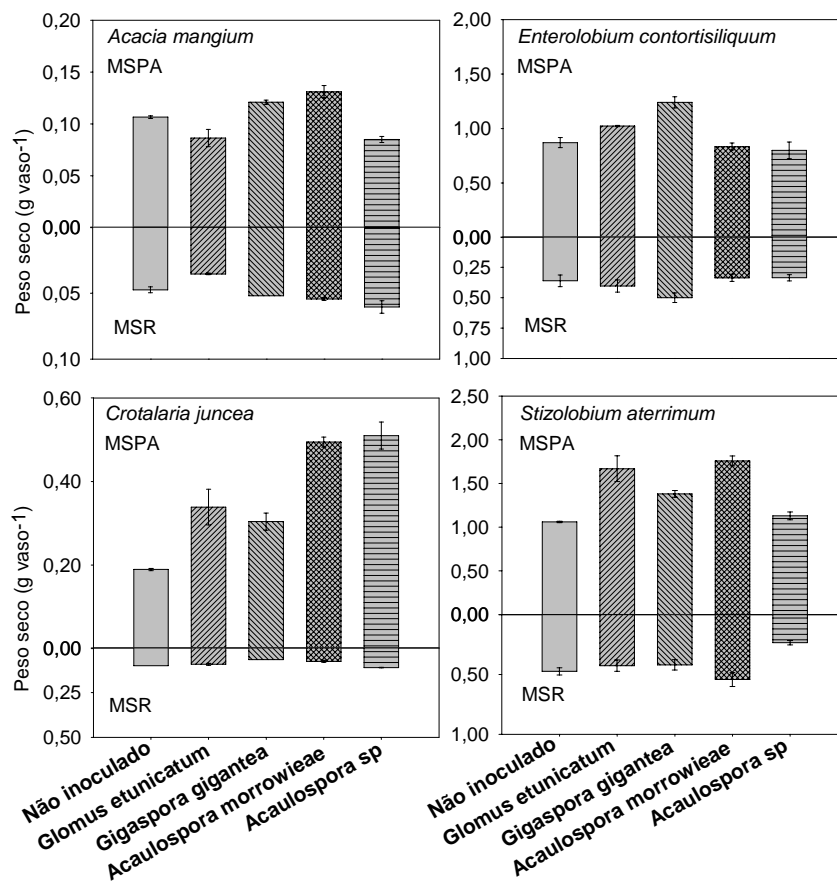


Figura 1 Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de quatro leguminosas inoculadas com FMAs em solo contaminado com As. Barras de erro: \pm Erro padrão da média

A inoculação de *Enterolobium contortisiliquum* com *Gigaspora gigantea* incrementou a MSPA em 37%, e *Glomus etunicatum* incrementou com 15%. Em relação a MSR, apenas o isolado *Gigaspora gigantea* apresentou incremento, com 14%. O incremento de MSPA em *Stizolobium aterrimum*, quando inoculada, tanto com *Acaulospora morrowieae*, quanto *Glomus*

etunicatum, foi em torno de 70%, seguidos por *Gigaspora gigantea* com 32%, quando comparados com o controle sem FMA.

3.2 Teor de P e As, e relação P:As nas raízes e parte aérea

Com relação ao teor de As na parte aérea, observa-se que a inoculação de todos os FMAs, reduziu o teor de As, enquanto que na raiz o teor foi reduzido apenas com a inoculação de *Acaulospora morrowieae* e *Acaulospora* sp (Tabela 3). Já o teor de P na parte aérea foi maior com a inoculação de *Glomus etunicatum* (Tabela 4). A relação P:As na parte aérea de *A. mangium* foi elevada por todos os isolados de FMAs testados (Tabela 5).

Tabela 3 Teor de As, da parte aérea e raiz, de leguminosas cultivadas em solo contaminado com As sob inoculação com FMAs

Isolados (FMAs)	Leguminosas							
	A. m.*	C. j.*	E. c.*	S. a.*	A. m.*	C. j.*	E. c.*	S. a.*
	As na Parte Aérea (mg kg ⁻¹)				As na Raiz (mg kg ⁻¹)			
Não Inoculado	82,71a	72,12a	10,11c	30,81b	179,76d	285,34d	52,39a	115,75a
<i>Glomus etunicatum</i>	47,90c	45,85b	16,10a	19,70d	245,28b	439,89b	36,77b	96,68b
<i>Gigaspora gigantea</i>	58,54b	29,38c	13,68b	20,31d	270,45a	282,82e	56,12a	115,61a
<i>Acaulospora morrowieae</i>	16,49e	44,50b	13,20b	34,81b	232,59c	397,65c	33,80b	114,99a
<i>Acaulospora</i> sp.	30,11d	25,72d	10,11c	34,62a	127,13e	633,37a	48,74a	96,98b

*A. m. *Acacia mangium*; C. j. *Crotalaria juncea*; E. c. *Enterolobium contortisiliquum*; S. a. *Stizolobium aterrimum*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, comparando FMAs, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, p<0,05

Em *Crotalaria juncea* o teor de As na parte aérea foi significativamente maior na ausência de inoculação com FMAs, enquanto que os maiores teores de As nas raízes foram observados na inoculação de *Acaulospora* sp., *Glomus etunicatum* e *Acaulospora morrowieae*, em ordem decrescente. O teor de P na parte aérea foi incrementado pelo isolado *Acaulospora morrowieae* (Tabela 4).

Tabela 4 Teor de P, da parte aérea e raiz, de leguminosas cultivadas em solo contaminado com As, sob inoculação com FMAs

Isolados (FMAs)	Leguminosas							
	A. m.*	C. j.*	E. c.*	S.a.*	A. m.*	C. j.*	E. c.*	S. a.*
	P na Parte Aérea (g kg ⁻¹)				P na Raiz (g kg ⁻¹)			
Não Inoculado	1,96b	2,60b	2,54b	3,25a	832,10a	0,246a	485,33b	740,19b
<i>Glomus etunicatum</i>	2,35a	2,98b	2,79a	3,23a	822,06b	0,028c	475,98b	750,36b
<i>Gigaspora gigantea</i>	1,74c	2,90b	2,34b	3,42a	380,00d	0,020d	624,07a	896,53a
<i>Acaulospora morrowieae</i>	1,16e	3,86a	3,04a	3,41a	722,72c	0,022d	34,64c	957,76a
<i>Acaulospora</i> sp.	1,34d	3,02b	2,16b	3,33a	339,72e	0,034b	49,63c	100,35c

*A. m. *Acacia mangium*; C. j. *Crotalaria juncea*; E. c. *Enterolobium contortisiliquum*; S. a. *Stizolobium aterrimum*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, comparando FMAs, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, p<0,05

A relação P:As na parte aérea de *C. juncea* foi elevada por todos os isolados de FMAs, enquanto nas raízes esta mesma relação foi reduzida pelos isolados *Acaulospora* sp, *G. etunicatum* e *A. morrowieae*. O teor de As na parte aérea de *E. contortisiliquum* não demonstrou ser reduzido pela inoculação com FMAs. Enquanto que nas raízes, a inoculação de *E. contortisiliquum* com *G. etunicatum* e *A. morrowieae* reduziu o teor de As. O teor de P na parte aérea de *E. contortisiliquum* foi incrementado pelas inoculações com *G. etunicatum* e *A. morrowieae*, enquanto nas raízes o teor de P foi elevado pelo isolado *G. gigante*. A relação P:As na parte aérea foi maior quando *E. contortisiliquum* recebeu inoculação com *A. morrowieae* e *Acaulospora* sp, o contrário foi observado nas raízes, onde estes isolados diminuíram a relação P:As, enquanto o isolado *G. etunicatum* foi responsável pelo aumento desta mesma relação (Tabela 5).

Tabela 5 Relação P:As, na parte aérea e raiz, de leguminosas cultivadas em solo contaminado com As, sob inoculação com FMAs

FMAs	Leguminosas							
	A. m.	C. j.	E. c.	S. a.	A. m.	C. j.	E. c.	S. a.
	Parte Aérea				Raiz			
Não Inoculado	23,69d	36,03e	149,25b	103,52c	4,62a	3,14b	9,36b	6,40b
<i>Glomus etunicatum</i>	49,09b	65,03d	173,43b	164,14a	3,35b	2,81d	13,36a	7,79a
<i>Gigaspora gigantea</i>	29,69c	98,42b	172,23b	168,53a	1,40e	4,30a	11,14b	7,76a
<i>Acaulospora morrowieae</i>	70,03a	86,57c	240,15a	97,69c	3,10c	2,99c	1,02c	8,34a
<i>Acaulospora</i> sp.	44,48b	117,21a	213,52a	128,12b	2,67d	1,93e	1,01c	1,03c

* A. m. *Acacia mangium*; C. j. *Crotalaria juncea*; E. c. *Enterolobium contortisiliquum*; S. a. *Stizolobium aterrimum*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, comparando FMAs, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, $p < 0,05$; (ns) não significativo.

As inoculações de *S. aterrimum*, com *G. gigantea* e *G. etunicatum*, proporcionaram uma redução no teor de As na parte aérea, já na raiz, os isolados *G. etunicatum* e *Acaulospora* sp. foram os responsáveis pela redução do teor de As. O teor de P na parte aérea de *S. aterrimum* não foi significativo, enquanto que nas raízes o teor de P foi incrementado pelos isolados *G. gigantea* e *A. morrowieae*.

3.4 Índice de translocação e efeito do As sobre as atividades enzimáticas

A inoculação de FMAs em todas as espécies vegetais demonstrou reduzir o índice de translocação de As, embora tenha havido diferenças entre os isolados e as espécies vegetais (Tabela 6).

Tabela 6 Índice de translocação de As, da raiz para a PA, de leguminosas cultivadas em solo contaminado com As, sob inoculação com FMAs

Isolados (FMAs)	Índice de translocação			
	Leguminosas			
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	<i>Stizolobium aterrimum</i>
Não Inoculado	0,46a	0,25a	0,34a	0,26a
<i>Glomus etunicatum</i>	0,20d	0,10b	0,47a	0,20b
<i>Gigaspora gigantea</i>	0,22c	0,10b	0,24b	0,17b
<i>Acaulospora morrowieae</i>	0,07e	0,11b	0,39a	0,30a
<i>Acaulospora sp.</i>	0,24b	0,04c	0,20b	0,27a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna comparando FMAs, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, $p < 0,05$

Em *A. mangium*, todos os isolados de FMAs reduziram o IT, destacando-se o isolado *A. morrowieae*, responsável pelo menor IT observado. O IT em *C. juncea* também foi reduzido por todos os FMAs, sendo o isolado *Acaulospora sp.* o responsável pelo menor IT, não havendo distinção entre os demais isolados testados. Em *Enterolobium contortisiliquum*, as inoculações com *G. gigantea* e *Acaulospora sp.* apresentaram os menores IT de As das raízes para a PA. Enquanto o IT em *S. aterrimum* foi reduzido pelos isolados *G. etunicatum* e *G. gigantea*.

A atividade da APX foi reduzida pela inoculação com FMAs em *A. mangium*, porém, houve diferenças entre os isolados de FMAs (Figura 2). O isolado *Acaulospora sp.* reduziu a atividade da APX em torno de 90%, seguido por *A. morrowieae*, o qual reduziu 78%, a inoculação com *G. gigantea* reduziu a atividade em 45% e *G. etunicatum* em 11%.

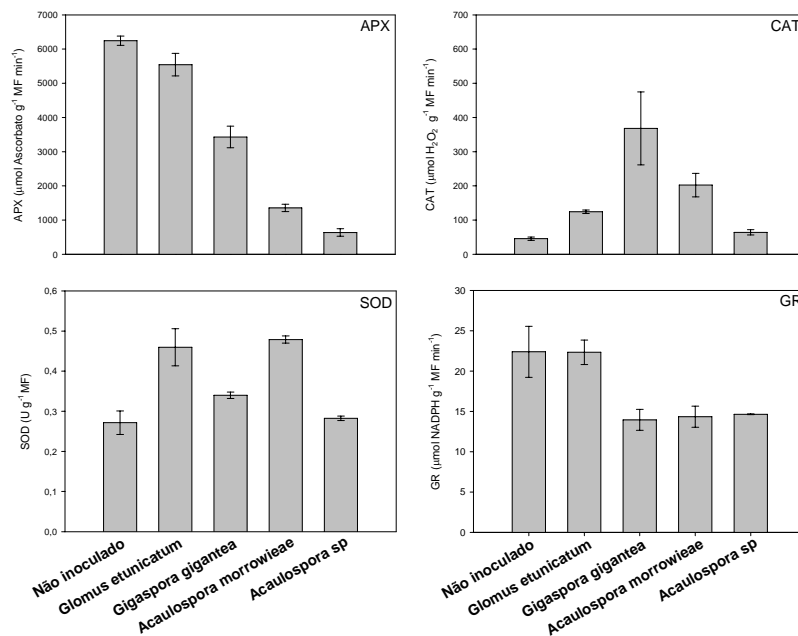


Figura 2 Atividade específica da ascorbato peroxidase – APX; catalase – CAT; superóxido dismutase – SOD e glutatona redutase – GR em *Acacia mangium* sob inoculação de FMAs em solo contaminado com As

A inoculação de FMAs não reduziu a atividade das enzimas CAT e SOD. Enquanto a inoculação com os isolados *Gigaspora gigantea*, *Acaulospora morrowiae* e *Acaulospora sp.* demonstrou reduzir a atividade da GR em *A. mangium*.

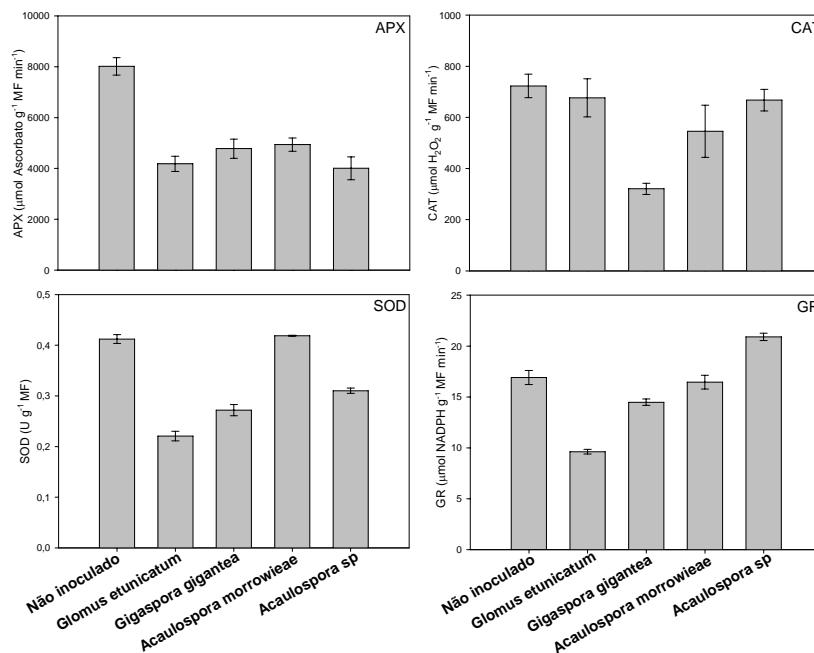


Figura 3 Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX); catalase(CAT); superóxido dismutase (SOD) e glutaciona redutase (GR) em *Crotalaria juncea* sob inoculação de FMAs em solo contaminado com As

A atividade enzimática da APX em *Crotalaria juncea* foi reduzida por todos os isolados de FMAs. Enquanto a atividade da CAT foi reduzida apenas pelo isolado *Gigaspora gigantea*. Já a atividade da SOD foi reduzida pelos isolados *Glomus etunicatum*, *Gigaspora gigantea* e *Acaulospora sp*. A redução da atividade da GR foi observada sob a inoculação de *Glomus etunicatum* e *Gigaspora gigantea*.

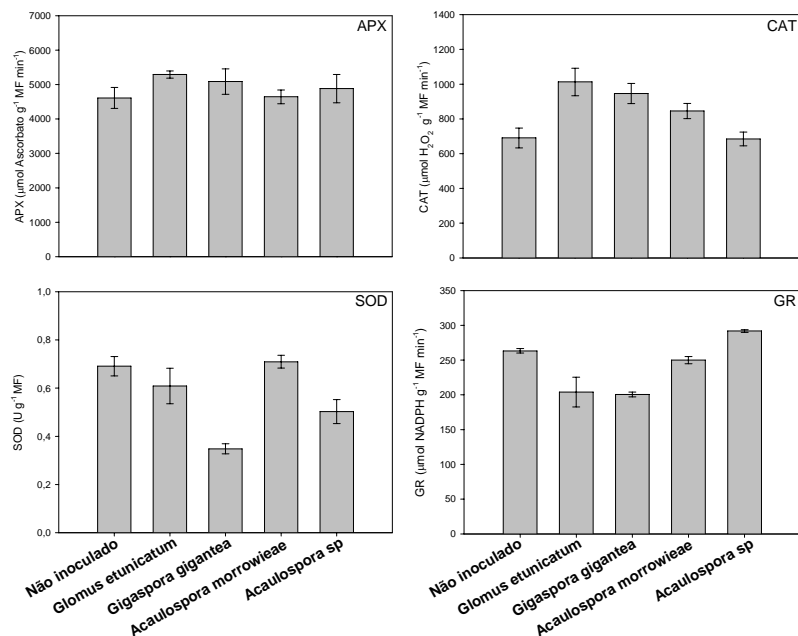


Figura 4 Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GR) em *Enterolobium contortisiliquum* sob inoculação de FMAs em solo contaminado com As

Em *E. contortisiliquum* a atividade da APX não foi significativa (Figura 4). A atividade enzimática da CAT não foi reduzida sob a inoculação de FMAs. Os isolados *Gigaspora gigantea* e *Acaulospora sp*. demonstram reduzir a atividade da SOD. Já a GR teve sua atividade reduzida pelos isolados *Glomus etunicatum* e *Gigaspora gigantea*.

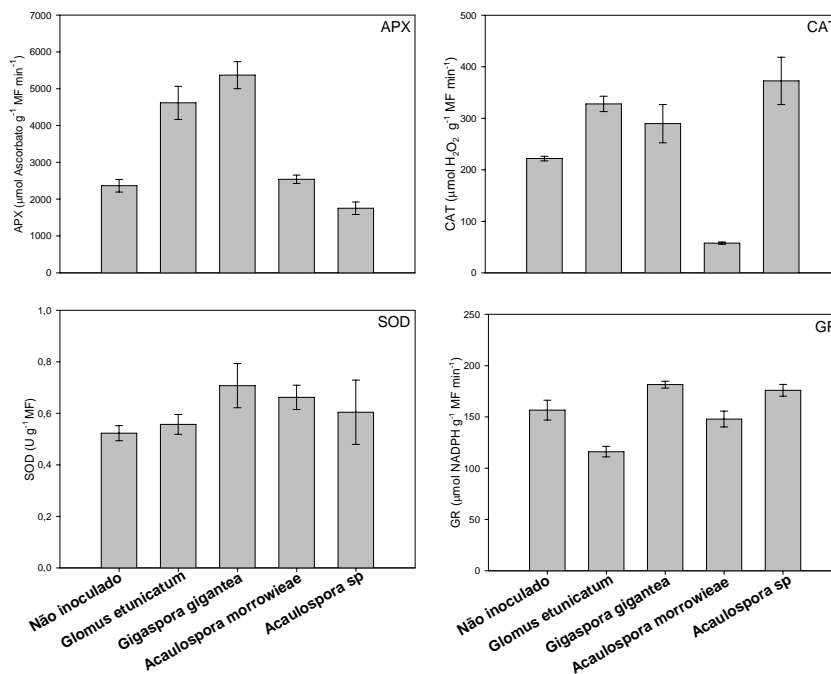


Figura 5 Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX); catalase(CAT); superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR) em *Stizolobium aterrimum* sob inoculação de FMAs em solo contaminado com As

Em *S. aterrimum* a inoculação de FMAs não reduziu a atividade das enzimas APX e SOD. A atividade da CAT foi reduzida em *S. aterrimum* somente pelo isolado *A. morrowieae*, sendo uma redução de 80%. A GR também teve sua atividade reduzida somente por um isolado, sendo *G. etunicatum* com cerca de 25% de redução.

4 DISCUSSÃO

A matéria seca da parte aérea das quatro espécies vegetais foi incrementada pela inoculação com FMAs, porém houve diferenças entre os isolados testados. A espécie *Crotalaria juncea* demonstrou ser dependente da simbiose micorrízica nesta condição testada, uma vez que todos os isolados de FMAs contribuíram para o aumento da sua produção de MSPA. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais também tem sido relatado aumento da produção de biomassa por FMAs em solo contaminado com As (GONZALES-CHAVEZ et al. 2002; LIU et al., 2005; AHMED et al., 2006; SCHNEIDER, 2011).

Gonzales-Chavez et al. (2002), encontraram uma colonização reduzida de *Glomus mosseae*, 12% e 27%, em *Holcus lanatus* resistente e sensível ao As, respectivamente. A colonização micorrízica também se apresentou reduzida, no presente trabalho, fato este que pode ser devido à dificuldade de crescimento radicular provocada talvez pela textura bastante siltosa do solo empregado, que após ser umedecido tornava-se bastante compactado.

Em soluções de solo natural, as formas de As disponíveis para as raízes são arsenito e arsenato, os quais apresentam dois modos de ação. A toxicidade provocada por arsenito é devida a capacidade que este possui em reagir com grupos sulfidrilas de proteínas, afetando assim a sua função (LEONARD; LAUWERYS, 1980; CHRISTOPHERSEN et al., 2009), enquanto o arsenato, por ser quimicamente similar ao fosfato inorgânico (P_i), é incorporado em compostos como o ATP e o análogo As(V)-ATP, e assim priva a célula da sua fonte de energia, levando à morte celular (MEHARG, 1994; CHRISTOPHERSEN et al., 2009). Devido a similaridade que o As(V) apresenta com o P_i , o seu transporte através da membrana plasmática das plantas via

transportadores de P_i , ocorre eficientemente, tornando-se um competidor para o P_i (MEHARG et al., 1994; CHRISTOPHERSEN et al., 2009).

Vários trabalhos mostram que plantas micorrizadas de várias espécies são mais tolerantes ao As, e apresentam um maior crescimento comparadas com o controle sem inoculação (COVEY et al., 1981; MEHARG et al., 1994; AHMED et al., 2006; CHEN et al., 2007; POPE et al., 2007; ULTRA et al., 2007a-b; XU et al., 2008). Embora, um aumento da nutrição de P em plantas não inoculadas também possa reduzir a sensibilidade ao As (CHRISTOPHERSEN et al., 2009) o efeito dos FMAs pode estar ligado ao aumento da absorção de P_i e do crescimento que ocorrem quando as espécies vegetais inoculadas com FMAs mostram crescimento e respostas positivas ao P.

O maior teor de P na PA de *Acacia mangium* foi observado sob a inoculação com *G. etunicatum*, o qual reduziu o teor de P nas raízes, elevando, conseqüentemente, a relação P:As na parte aérea (Tabela 6). Isto sugere que a planta micorrizada transloca o P para a parte aérea para elevar a relação P:As e amenizar a toxicidade deste elemento-traço. A relação P:As em *Acacia mangium* foi incrementada por todos os FMAs testados. Estes resultados encontram-se de acordo com outros estudos, sugerindo que a colonização micorrízica arbuscular pode oprimir o sistema de transporte de P de alta afinidade, com isso a absorção de As também é restringida, absorvendo e suprindo a planta com a quantidade de P suficiente via transportadores de P de baixa afinidade, localizados nas raízes micorrizadas, resultando em um aumento da resistência da planta ao As (HARRISON et al. 2002; LIU et al. 2005; CHEN et al., 2006, 2007). Tal fato é reforçado pelo índice de translocação do As da raiz para a PA, o qual foi maior quando *Acacia mangium* não recebeu inoculação com FMAs.

Observando o teor de P na PA de *Crotalaria juncea*, esta espécie demonstrou ter o maior de teor quando inoculada com *A. morrowiae*, enquanto o teor de As foi reduzido por todos os FMAs. Nas raízes, o maior teor de P foi

observado na ausência de inoculação. Já o teor de As nas raízes apresentou-se elevado sob a inoculação com *Acaulospora* sp., *G. etunicatum* e *A. morrowiae*, em ordem decrescente. Estes isolados elevaram a relação P:As na parte aérea e reduziram esta mesma relação na raiz, conseqüentemente houve redução na translocação de As das raízes para a parte aérea, indicando um possível mecanismo de sequestro de As nas raízes micorrizadas. Recentemente, o envolvimento de FMAs na transformação de As inorgânico para formas orgânicas menos tóxicas, diminuindo a absorção de As em plantas de girassol, foi demonstrado por Ultra et al. (2007).

A inoculação de *Enterolobium contortisiliquum* com *Glomus etunicatum* e *Acaulospora morrowiae* elevou o teor de P na parte aérea, enquanto que nas raízes, a inoculação com o isolado *Gigaspora gigantea* foi responsável por elevar o teor de P. Embora, o isolado *G. etunicatum* tenha elevado o teor de P na parte aérea, a relação P:As na parte aérea não foi elevada, devido ao alto índice de translocação. Já o isolado *A. morrowiae*, embora tenha apresentado um alto índice de translocação de As, foi capaz de elevar o teor de P na parte aérea, e também a relação P:As. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, onde foi demonstrado que a inoculação com FMAs aumenta a transferência de P da raiz para a PA, como demonstrado pelo aumento do teor de P e, conseqüentemente, da relação P:As (DONG et al. 2008).

Devido a similaridade entre o fofasto e o arsenato, a relação P:As é um bom índice para a sua abundância relativa e a compreensão desta relação na planta. A espécie hiperacumuladora de As, *Pteris vittata*, geralmente apresenta relação P:As na PA (0,5 – 3,8) menor que a encontrada nas raízes (3 – 29), uma vez que esta espécie por ser hiperacumuladora apresenta alto índice de translocação de As das raízes para a PA, onde o As é compartimentalizado (TU; MA 2003). Espécies não hiperacumuladoras como *Zea mays* L. subsp. *mays* (WOOLSON et al., 1973), *Lycopersicon esculentum* Mill. (BURLO et al., 1999)

e *Spartina alterniflora* L. (CARBONELL et al., 1998) apresentam valores de translocação bem mais elevados, 102–4400, 500–4200 e 800–8000, respectivamente, pois o aumento da absorção de P é um mecanismo de proteção à toxicidade do As em plantas não hiperacumuladoras.

Plantas tolerantes tendem a restringir a translocação de As para a PA, enquanto as hiperacumuladoras translocam o contaminante ativamente (FITZ; WENZEL 2002). O índice de translocação de As das raízes para a parte aérea foi reduzido por todos os isolados de FMAs em *Acacia mangium* e *Crotalaria juncea*. Embora, o comportamento dos FMAs não tenha sido o mesmo para *Enterolobium contortisiliquum* e *Stizolobium aterrimum*, as inoculações de *G. gigantea* e *Acaulospora* sp nesta primeira espécie vegetal reduziram o índice de translocação, e a redução deste mesmo índice em *Stizolobium aterrimum* foi causada pelos isolados *G. gigantea* e *G. etunicatum*. Este comportamento nos permite inferir que a inoculação das espécies vegetais utilizadas com FMAs em solo contaminado com As é uma alternativa para restringir a translocação de As das raízes para a parte aérea da planta, aumentando a sua tolerância ao As.

Este aumento da tolerância de plantas micorrizadas torna-se de uso muito importante para projetos de recuperação de áreas contaminadas com As em solos brasileiros, visto que as espécies vegetais até então caracterizadas e identificadas como tolerantes ou hiperacumuladoras de As se restringem às de clima temperado.

Estudos mostram que o As pode levar ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BHATTACHARYA; BHATTACHARYA, 2005), pela oxidação espontânea do As(III) a As(V) e pela inibição da dissipação do gradiente protônico na cadeia transportadora de elétrons, podendo causar desequilíbrio entre os processos de produção e remoção de oxidantes (KITCHIN; AHMAD, 2003). As EROs como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot})

são continuamente produzidos, predominantemente, em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (JEMIOLA-RZEMNSKA et al., 2007). O equilíbrio entre a produção e o consumo de EROs pode ser perturbado por diversos fatores estressantes como alta luminosidade, déficit hídrico, baixas temperaturas, metais pesados e elementos-traço e outros agentes (APEL; HIRT, 2004).

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes, que incluem a ação de mecanismos enzimáticos, como aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da ascorbato peroxidase (APX), da glutathione redutase (GR) e de mecanismos não enzimáticos, como o aumento da produção de tióis (fitoquelatinas) (CAO; MA, 2004).

A atividade da APX em *A. mangium* demonstrou-se elevada, na ausência de inoculação com FMAs. Embora a atividade das outras três enzimas, CAT, SOD e GR tenha sido baixa. Estudos indicam que a atividade da APX é um importante mecanismo antioxidante quando as espécies vegetais são expostas a pequenas concentrações de As (SANTOS, 2006; CAO et al., 2004), quando são expostas à concentrações mais elevadas, há uma redução significativa na sua eficiência e/ou na sua síntese (RONSEIN et al., 2006). A alta atividade da APX e reduzida atividade das demais enzimas em *A. mangium* pode demonstrar o efeito fitoprotetor dos FMAs, os quais reduzem o índice de translocação de As das raízes para a parte aérea, conseqüentemente os níveis de As na parte aérea são reduzidos, diminuindo o estresse oxidativo.

O comportamento enzimático em *C. juncea* seguiu o apresentado para *A. mangium*. Enquanto para *E. contortisiliquum* a APX mostrou-se elevada, junto com CAT e GR, sendo que para esta última enzima a inoculação com FMAs, mais especificamente, com os isolados *G. etunicatum* e *G. gigantea*, mostrou

reduzir a atividade enzimática. A atividade enzimática em *S. aterrimum* não foi reduzida pela inoculação com FMAs.

De modo geral, as plantas utilizadas no presente trabalho não demonstraram potencial hiperacumulador de As, caracterizado por teores foliares acima de 1000 mg As kg⁻¹ (MA et al. 2001). No entanto, todas demonstraram ser beneficiadas pela inoculação com FMAs em solo contaminado com As, restringindo a translocação de As para a PA, caracterizando-as como tolerantes.

5 CONCLUSÃO

Fungos micorrízicos arbusculares podem atenuar a toxicidade do As em leguminosas crescidas em solo contaminado com As.

As leguminosas testadas neste trabalho não apresentam potencial hiperacumulador, porém apresentaram-se tolerantes ao As.

A inoculação com FMA reduz a atividade da APX, principalmente para *Acacia mangium* e *Crotalaria juncea*.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F. R. S.; KILLHAM, K.; ALEXANDER, I. Influences of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and nutrition of lentil irrigated with arsenic contaminated water. **Plant and Soil**, The Hague, v. 258, p. 33–41, 2006.
- ALVAREZ, V. H. **Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois Latossolos de Minas Gerais**. 1974. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1974.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373–399, 2004.
- BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 41–49, 1994.
- BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Induction of stress by arsenic in *Clarus batrachus*: involvement of peroxisomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, p. 178–187, 2005.
- BURLO, F. et al. Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 1247–1253, 1999.
- CAKMAK, I.; DRAGANA, S.; HORST, M. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, p. 127–132, 1993.
- CARBONELL, A. A. et al. Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 217, p. 189–199, 1998.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1669-1677, 1999.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, p. 621-632, 2008.

CHANEY, R. L. et al. Phytoremediation of soil metals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 8, p. 279-284, 1997.

CHEN, B.; ZHU, Y. G.; SMITH, F. A. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) from a uranium mining-impacted soil. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, v. 62, p. 1464–1473, 2006.

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

CHRISTOPHERSEN, H. M.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Arbuscular mycorrhizal colonization reduces arsenate uptake in barley via downregulation of transporters in the direct epidermal phosphate uptake pathway. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, p. 962-974, 2009.

COVEY, R. P.; KOCH, B. L.; LARSEN, H. J. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth of apple and corn in low-phosphorus soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 712–715, 1981.

CUNNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R.; HUANG, J. W. Phytoremediation of contaminated soils. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p. 393-397, 1995.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of contaminated water and soil. In: KRUGER, E. L.; ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. (Ed). **Phytoremediation of soil and water contaminants**, Washington: American Chemical Society, 1997. v. 664p. 2-17.

DONG, Y. et al. Arbuscular mycorrhiza enhanced arsenic resistance of both white clover (*Trifolium repens* Linn.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants in an arsenic-contaminated soil. **Environmental Pollution**, London, v. 155, p. 174-181, 2008.

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

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

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 897-903, 1997.

FRANCO, A. A. et al. The importance of biological nitrogen fixation on land rehabilitation. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G. (Ed). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. New York: Kluwer Academic, 2000. p. 569-570.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C. E., (Ed.). **Transition to global sustainability: the contribution of brazilian science**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2000. p. 211-233.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1928. 143 p.

GERDEMANN, J. B.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, p. 235-246, 1963.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, p. 489-500, 1980.

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

HARRISON, M. J.; DEWBRE, G. R.; LIU, J. A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2413–2429, 2002.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 450-455, 1987.

HUANG, J. W. et al. Phytofiltration of arsenic from drinking water using arsenic-hyperaccumulating ferns. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 38, p. 3412-3417, 2004.

INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL.

Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised. PHYTO-3. Washington: Interstate Technology & Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg Update. 2009. Disponível em: <<http://www.itrcweb.org/Documents/PHYTO-3.pdf>>. Acesso em 10 set. 2009.

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

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

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, p. 486-488, 1989.

LIU, Y. et al. Yield and arsenate uptake of arbuscular mycorrhizal tomato colonized by *Glomus mosseae* BEG167 in As spiked soil under glasshouse conditions. **Environment International**, New York, v. 31, p. 867-873, 2005.

LEONARD, A.; LAUWERYS, R. R. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 75, p. 49-62, 1980.

MA, L. Q. et al. A fern that hyperaccumulates arsenic, a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. **Nature**, London, v. 409, p. 579, 2001.

MARGUÍ, E. et al. Analysis of inlet and outlet industrial wastewater effluents by means of benchtop total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Chemosphere**, Oxford, v. 80, p. 263-270, 2010.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p.121-132, 2000.

MEHARG, A. A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, p. 989-993, 1994.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 33, p. 455-465, 2009.

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

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 299-311, 2006.

NEUMANN, H. et al. Toxicity testing of heavy metals with the *Rhizobium*-legume symbiosis: High sensitivity to cadmium and arsenic and arsenic compounds. **Environmental Science and Pollution Research**, Kyoto, v. 5, p. 28-36, 1998.

POPE, S. et al. Arsenic uptake by *Medicago truncatula*: P supply and arbuscular mycorrhizal (AM) colonization do not reduce specific uptake from soil. In: ZHU, Y.; LEPP, N.; NAIDU, R. (Ed.). **Biogeochemistry of trace elements: environmental protection, remediation and human health**. Beijing: Tsinghua University, 2007. 1036 p.

REICHMAN, S. M. The Potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2587-2593, 2007.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singletto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 563-568, 2006.

S2 PICOFOX™. **User Manual. Bruker Advanced X-ray Solutions**. Berlin: Bruker AXS Microanalysis GmH, 2007.

SCHNEIDER, J. **Ocorrência e ação fitoprotetora de fungos micorrízicos em áreas contaminadas com arsênio**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SILVA, S.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1749-1757, 2006.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. 716 p.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Elsevier, 2008. 787 p.

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

SOUZA, F. A.; SILVA, E. M. R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras, UFLA, 1996. 290 p.

SPECTRA 5.3. **Software for Acquisition and Evaluation of XRF Spectra.**
Berlin: Bruker AXS Microanalysis GmbH, 2007.

STOSNACH, H.; MAGES, M. Analysis of nutrition-relevant trace elements in human blood and serum by means of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, p. 354-356, 2009.

TU, C.; MA, L. Q.; BONDADA, B. Arsenic Accumulation in the Hyperaccumulator Chinese Brake and Its Utilization Potential for Phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1671-1675, 2002.

TU, C.; MA, L. Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, p. 243-251, 2003.

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

TU, S.; MA, L. Q. Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Plant and Soil**, The Hague, v. 249, p. 373-382, 2003.

TU, S. et al. Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Groundwater by the Arsenic Hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 6, p. 35-47, 2004.

ULTRA, V. U. et al. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, p. 29-41, 2007.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **Method 3051 A:** Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. New York: EPA, 2007. Disponível em:
<<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>>.
Acesso em mar: 2010.

WOOLSON, E. A.; AXLEY, J. H.; KEARNEY, P. C. The chemistry and phytotoxicity of arsenic in soils: II. Effects of time and phosphorus. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 37, p. 254-259, 1973.

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

CAPÍTULO 3 Isolamento e Tolerância ao Arsênio de Bactérias de nódulos de Leguminosas crescidas em solo de área de Mineração de ouro

RESUMO

Bactérias fixadoras de N capazes de estabelecer simbiose com leguminosas têm sido consideradas uma ferramenta promissora para programas de revegetação de solos contaminados com As. Foram isoladas e caracterizadas bactérias de nódulos de *Crotalaria spectabilis* e *Stizolobium aterrimum* crescidas em área de mineração de ouro contaminada com As e *Phaseolus vulgaris* utilizado como planta isca para a captura de rizóbios de solo da mesma área. As bactérias foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente em meio 79, com azul de Bromotimol em pH 6.9. Os isolados foram agrupados de acordo as características fenotípicas. Observou-se uma alta variação fenotípica. Posteriormente, foi avaliada a concentração mínima inibitória (CMI) de As (0, 50, 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ As) e a resistência a 15 antibióticos diferentes: ácido nalidíxico (30 mcg), ampicilina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), cefadroxil (30 mcg) ceftriaxona (30 mcg), claritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), oxacilina (1 mcg), rifamicina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg). Foram utilizados um total de 38 isolados juntamente com 7 estirpes tipo ou referência pertencentes aos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Burkholderia*. Após análise da CMI foram selecionados dois isolados UFLA 0516 e UFLA 0514, sendo o primeiro tolerante até 200 mmol L⁻¹ e o último sensível ao As. Estes dois isolados tiveram seu crescimento e produção de exopolissacarídeo avaliados em meio 79 líquido sob as mesmas concentrações de As. A CMI em meio sólido foi avaliada e comparada ao agrupamento fenotípico. Observou-se a formação de dois grupos bastante distintos. No grupo A houve predomínio de isolados que acidificam o meio 79, produzem goma abundante e são de crescimento rápido. Enquanto no B predominou em sua maioria isolados que alcalinizam o meio de cultivo e produzem pouca goma. Bactérias tolerantes ao As apresentaram também resistência a vários antibióticos. O isolado UFLA 0516 apresenta crescimento rápido e acidifica o pH do meio de cultivo. Este demonstrou também tolerância a elevadas concentrações de As em meio líquido e grande produção de exopolissacarídeo. Enquanto o isolado UFLA 0514 teve seu crescimento inibido pelo As. A tolerância das bactérias isoladas de nódulos de área de mineração de ouro está relacionada com as características culturais tais como rápido crescimento, acidificação do meio de cultivo e produção de exopolissacarídeo.

Palavras-chave: Leguminosas tropicais. Bactérias fixadoras de N nodulíferas. Elementos-traço. Biorremediação.

ABSTRACT

Leguminous plants associated with efficient N-fixing bacteria have been considered a promising tool for revegetation programs of As contaminated soils. The bacteria tested were isolated from nodules of *Crotalaria spectabilis* and *Stizolobium aterrimum* grown in gold mining area contaminated with As. *Phaseolus vulgaris* was used as host plant to get soil rhizobia from the same area. The bacteria strains were characterized phenotypically in the 79 growth medium, with bromothymol blue at pH 6.9. The isolates were grouped according to phenotypic characteristics. There was a high phenotypic variation. The minimum inhibitory concentration (MIC) to As (0, 50, 100, 150 and 200 mmol L⁻¹ As) and the resistance to 15 different antibiotics: nalidixic acid (30 mcg), ampicillin (10 mcg), amoxicillin (10 mcg), azithromycin (15 mcg), cefadroxil (30 mcg), ceftriaxone (30 mcg), clarithromycin (15 mcg), chloramphenicol (30 mcg), erythromycin (15 mcg), streptomycin (10 mcg), gentamicin (10 mcg), kanamycin (30 mcg), oxacillin (1 mcg), rifamycin (30 mcg) and vancomycin (30 mcg) were evaluated. 60 strains were isolated, 38 of them and seven type or reference strains belonging to the genera *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Burkholderia* were evaluated. Two isolates UFLA 0516 and UFLA 0514 were selected according to the MIC analysis. The first was tolerant to 200 mmol L⁻¹ As and the other was sensitive to all As concentrations evaluated. The growth and exopolysaccharide production capacities of these two strains were evaluated on 79 liquid medium with the same As concentrations. The MIC results were compared with the phenotype grouping. Two fairly distinct groups were found. Predominance of isolates that acidify the medium 79, abundant exopolysaccharide production and fast growth for the group A. On the other hand, in the B group predominated the mostly isolates capable of alkalize the growth medium culture and with low exopolysaccharide production. The As tolerant bacteria showed resistance to multiple antibiotics too. The isolate UFLA 0516 showed fast-growing ability, capacity to acidify the medium, tolerance to high concentrations of As in liquid medium and large production exopolysaccharide. On the other hand, the isolate UFLA 0514 had As growth inhibition. The tolerance of bacterial isolates of nodules from plants growth in mining gold area is related to cultural features such as fast growth, acidification of the medium and production of exopolysaccharide.

Keywords: Tropical leguminous. N-fixing bacteria nodulation. Trace elements. Bioremediation.

1 INTRODUÇÃO

O arsênio é um metalóide cristalino, encontrado na natureza em quatro estados de oxidação, arsenato (As V), arsenito (As III), na forma elementar (As 0) e como arsenieto (As^{-III}). Os dois estados de oxidação maiores são comumente encontrados, enquanto os dois menores são raros no ambiente. Sob condições oxidantes em baixos valores de pH, o As (V) é a forma predominante, enquanto o As(III) torna-se dominante sob condições redutoras em valores maiores de pH. A concentração de As na crosta terrestre varia de 0,5-2,5 mg kg⁻¹ (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007). Entretanto, em solos de áreas de mineração, a concentração pode chegar a 20.000 mg kg⁻¹.

Alguns métodos têm sido utilizados na tentativa de remover elementos-traço, com destaque para o uso de materiais naturais e ambientalmente compatíveis, como a utilização de plantas e microrganismos, que devido à habilidade de resistir, detoxificar e adsorver estes metais, têm sido alvos de importantes estudos para remediação de ambientes contaminados (VOLESKY; HOLAN, 1995; VEGLIO; BEOLCHINI, 1997; LASAT, 2002; SINGH et al., 2003; GAVRILESCU, 2004). Muitos microrganismos, incluindo bactérias, algas e fungos, possuem a habilidade para remover elementos-traços do meio ambiente. A capacidade de bioabsorção, 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 ou insolúveis de elementos-traços (CASTEIN et al., 1999; LOVELY et al., 1993; LEDIN; KRANTZ-RULCKER; ALLARD, 1996; SILVER; PHUNG, 1996; NIU et al., 1993; FOSTER; MOY; ROGERS, 2000; KAZY et al., 2002; DIAZ-MARRERO et al., 2004; COMTE; GUIBAUD; BAUDU, 2008).

Bactérias fixadoras de nitrogênio (também denominadas de rizóbio) capazes de formar simbiose com leguminosas apresentam também uma alternativa promissora para programas de revegetação de solos degradados (FRANCO et al., 1992), uma vez que estas bactérias quando tolerantes a metais, estimulam o crescimento da planta em ambientes contaminados. Estudos relacionados com a tolerância de rizóbios a elementos-traços têm sido realizados para diferentes gêneros (PURCHASE; MILES; YOUNG, 1997; TRANNIN et al., 2001; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; BROSS; BEYENS; SMOLDERS, 2005; CARRASCO et al., 2005), estando recentemente focados na bioengenharia de isolados tolerantes, para aplicação direta em processos de biorremediação (VALLS et al., 2000; SRIPRANG et al., 2002; WU et al., 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias fixadoras de nitrogênio de nódulos de leguminosas crescidas em solo de mineração de ouro, contaminado com As, bem como ainda, avaliar a tolerância dos isolados ao As.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Descrição do local de estudo e amostragem

A coleta dos nódulos foi realizada, em março de 2011, nas dependências da mina aurífera situada no município de Paracatu, região noroeste de Minas Gerais, Brasil. Foram coletados nódulos de raízes de duas espécies leguminosas *Crotalaria spectabilis* e *Stizolobium aterrimum*, em cinco pontos diferentes para cada espécie.

Todo o sistema radicular foi retirado do solo, utilizando um enxadeco, estando atento para não remover acidentalmente os nódulos. As raízes noduladas foram acondicionadas em sacos plásticos, e conduzidas até o laboratório, para

efetuar a lavagem das raízes em água corrente, visando retirar o excesso de solo aderido, para posterior coleta dos nódulos. Após a lavagem das raízes, o excesso de água foi removido com papel absorvente. De cada leguminosa foram coletados 40 nódulos. Sendo estes retirados das raízes com uma tesoura, deixando um pequeno pedaço de raiz aderido, visando facilitar sua manipulação, e armazenados individualmente em frascos, contendo sílica gel na parte inferior e algodão na parte superior, com tampa hermeticamente fechada para evitar a entrada de umidade (MOREIRA, 2010). Os nódulos foram mantidos sob armazenamento até o Laboratório de Microbiologia do Solo – DCS/UFLA, onde foi feito isolamento.

2.2 Isolamento e caracterização cultural

Para o isolamento das bactérias foram usados dez nódulos de cada espécie leguminosa, obtidas do campo como descrito anteriormente. Além destes, foram obtidos nódulos a partir de captura com *Phaseolus vulgaris*, utilizando solo proveniente de área de mineração de ouro, cujas características químicas encontram-se no quadro 1. Neste estudo foram incluídas também estirpes tipo ou referência de rizóbio já descritas: ORS571^T, *Azorhizobium caulinodans*; BR5401^T, *Azorhizobium doebereinereae*; BR2001 e BR2811, *Bradyrhizobium* sp.; BR3804, *Mesorhizobium plurifarum*; BR322^T, *Rhizobium tropici*, e LMG1222, *Burkholderia cepacia*.

Antes do isolamento, os nódulos foram bem lavados e reidratados em água destilada estéril, por cerca de 5 minutos. Após esse procedimento, os nódulos foram desinfestados superficialmente conforme Vincent (1970). Posteriormente, foram macerados em placas de Petri contendo meio de cultura 79, também conhecido como YMA (VINCENT, 1970), com azul de bromotimol e pH 6.9 (FRED; WAKSMAN, 1928) e o material foi espalhado em forma de

estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas sob temperatura de 28°C. Foram obtidos isolados de todos os nódulos utilizados. Colônias isoladas foram selecionadas e plaqueadas para purificação. Após a purificação dos isolados, as seguintes características culturais foram avaliadas: alteração do pH do meio de cultura, taxa de crescimento avaliada pelo tempo de formação de colônias isoladas, características das colônias (tamanho, formato, borda, elevação, superfície, transmissão de luz, coloração, massa de crescimento e absorção do indicador azul de bromotimol) e produção de muco (polissacarídeos extracelulares). A caracterização foi realizada conforme o descrito em Moreira et al., (1993), Jesus et al., (2005) e Moreira (2010).

Foram utilizados no total de 45 isolados, sendo 13 isolados de nódulos de *Stizolobium aterrimum*, 10 isolados de nódulos de *Crotalaria spectabilis*, 15 isolados de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, juntamente com sete estirpes tipo ou referência dos seguintes gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Burkolderia*, do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras, os quais foram estudados quanto a tolerância ao As.

Foram utilizadas 11 características culturais para o agrupamento. O dendrograma foi construído pelo método WARD (método da mínima variância), avaliando a distância binária, pelo pacote Cluster do programa R. Após a construção do dendrograma baseado nas características morfológicas culturais dos isolados foi analisada a frequência dos indivíduos resistentes às diferentes concentrações de As, nos grupos formados pela caracterização cultural, utilizando o teste qui-quadrado, a 5% de significância.

2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de As em meio YMA sólido

Cada estirpe cresceu em 30 mL de meio YM em pH 6.9, sob agitação orbital de 125 rpm a 28 °C. Após 72 horas de crescimento quando atingiu-se 1×10^8 células por mL, retirou-se uma alíquota de 1 mL de cultura de cada estirpe e transferiu-se para microtubos de 1,5 mL esterilizados, e centrifugada a 8.000 rpm, a 25 °C, por quatro minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 8,5 g/L) e centrifugadas novamente, repetindo este processo de lavagem por três vezes. Posteriormente, alíquotas de 20 μ L de suspensões de células lavadas foram inoculadas e estriadas com alça de platina em placas contendo meio YMA suplementado com diferentes concentrações de As. As concentrações de As ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) aplicadas ao meio de cultura foram de 50, 100, 150 e 200 mmol L^{-1} além de um tratamento controle sem a adição de As. Após a adição do As ao meio, o pH foi ajustado para 6.9 com solução de HCl 0,5 mol L^{-1} . Para avaliar a susceptibilidade dos isolados ao As determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) a qual é definida como a menor concentração na qual não ocorreu a formação de unidades formadoras de colônias (UFC) visíveis, após 9 dias de incubação a 28 °C. Nesta etapa do estudo determinou-se o número de isolados que apresentaram crescimento em cada concentração de As a partir de três repetições.

2.5 Avaliação do crescimento dos isolados UFLA 0516 e UFLA 0514 em meio YM líquido suplementado com diferentes concentrações de As

Após determinação da CMI, selecionaram-se dois isolados, sendo um tolerante a todas as concentrações de As testadas (isolado UFLA 0516), e o

outro que não apresentou crescimento em nenhuma das concentrações de As testadas (isolado UFLA 0514). Estes dois isolados foram avaliados quanto sua tolerância ao As nas concentrações de 0, 50 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ As em meio YM líquido, em dois valores de pH, 5.0 e 6.9. Estes valores de pH foram definidos considerando o valor de pH 5.0 do solo da área de onde foram coletados os nódulos e o valor de pH 6.9 do meio utilizado para o isolamento. Os isolados foram inoculados (1×10^8 células) em 50 mL de meio YM suplementado com diferentes concentrações de As e incubados a 28 °C, sob agitação de 125 rpm por 72 horas.

A avaliação do número de células viáveis presentes em cada concentração de As, 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). O pH das soluções foi determinado no final de cada experimento. A partir da avaliação do número de UFC desta estirpe nas diferentes concentrações de As e pH foram obtidas equações de regressão (programa Table Curve 2D for Windows v. 5.03. Jandel Corporation). Como medida do crescimento bacteriano também foi determinado o peso seco das células para cada concentração de As em solução, sendo este procedimento realizado apenas para o isolado tolerante (UFLA 0516). Esta decisão foi tomada, devido à sensibilidade do isolado (UFLA 0514) apresentada na presença de As. Para isto, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos após as 72 horas de incubação e os pellets celulares produzidos após centrifugação foram secos a 70°C por 48 horas.

2.6 Avaliação da produção de Exopolissacarídeos (EPS) nas diferentes concentrações de As em meio YM líquido

A extração do EPS foi realizada para os dois isolados selecionados após o teste de CMI, (UFLA 0516 – tolerante) e (UFLA 0514 – sensível) em 50 mL de meio de cultura YM líquido, em dois valores de pH, 5.0 e 6.9, suplementado com as diferentes concentrações de As avaliadas anteriormente (50, 100, 150 e 200 mM de As, com a adição de um tratamento controle sem a adição de As), em um total de 3 replicatas. Os isolados foram crescidos durante 72 horas sob agitação de 125 rpm a 28°C. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células bacterianas para eliminação dos resíduos de meio de cultura, conforme experimento anterior. Uma alíquota de 500 µl de inóculo foi inoculada, usando uma pipeta com ponteiros estéreis, nos meios com as diferentes concentrações de As, e nos dois valores de pH. Estes foram incubados a 28 °C, sob agitação de 125 rpm, por 72 horas. Após o período de incubação, a cultura (células + EPS produzido) foi centrifugada a 10.000 g, por 30 min, a 4°C. O pellet bacteriano precipitado foi coletado e seco em estufa, a 70°C, até peso constante. Ao sobrenadante foi adicionado acetona gelada em um volume 2:1, sendo posteriormente mantido por 24 horas em repouso sob refrigeração para precipitação do EPS. Após a filtração e coleta do EPS, este foi mantido em estufa de secagem por 48 horas a 70°C. A produção do EPS total foi avaliada pelo peso seco do produto, por peso seco das células.

2.7 Teste de resistência dos isolados a antibióticos

A inibição do crescimento, de todos os 38 isolados, juntamente com as 7 estirpes tipo ou referência foi testada para 15 diferentes antibióticos: ácido nalidíxico (30 mcg), ampicilina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), azitromicina

(15 mcg), cefadroxil (30 mcg) ceftriaxona (30 mcg), claritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), oxacilina (1 mcg), rifamicina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg). As bactérias foram crescidas em meio YM por 72 horas a 28 °C e uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi plaqueada com alça de Drigalski em placas de YMA. Os discos de antibióticos comercialmente adquiridos (Cecon- Sensobiodisc) foram depositados sobre o meio de cultivo e após 48 horas de incubação a 28 °C o diâmetro das zonas de inibição foram medidas, em um total de três repetições. As bactérias foram então classificadas como resistente ou sensível para cada antibiótico testado.

2.8 Fixação biológica de nitrogênio em vida livre

Os isolados os controles positivos BR5401^T e ORS571^T, que são estirpes tipo de *Azorhizobium doebereinereae* e *Azorhizobium culinodans*, respectivamente, foram inoculadas no meio do meio de cultura semi-sólido, em frascos com capacidade para 10 mL contendo 5 mL do meio livre de nitrogênio – LO (DREYFUS; ELMERICH; DOMMERGUES, 1983) com a seguinte composição: 10 g de lactato de sódio; 1,67 g K₂HPO₄; 0,87g de KH₂PO₄; 0,05g de NaCl; 0,1g MgSO₄.7H₂O; 40 mg de CaCl₂; 4 mg de FeCl₃; 5 mg de MoO₄Na. 2H₂O; 10 mg de biotina; 20 mg de ácido nicotínico; 10 mg de ácido pantotênico e 2 ml de elementos traço por litro de meio, em pH 7,0. Além do lactato de sódio, o manitol também foi testado como fonte de carbono.

Os frascos foram incubados de três a sete dias no escuro, a 28°C, para formação da película na região superficial do meio. Os controles positivos foram comparados com as amostras; aquelas que formaram película nesse período de tempo tiveram o crescimento considerado positivo e as que não formaram película, negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O "screening" para a resistência ao As foi feito pela determinação do CMI, utilizando 38 isolados, das quais, 13 foram isoladas de nódulos de *Stizolobium aterrimum*, 10 isoladas de nódulos de *Crotalaria spectabilis*, ambas coletadas em solo de uma área de mineração de ouro, e 15 isolados de solo da mesma área de mineração (Figura 1), sendo utilizado *Phaseolus vulgaris* como planta isca para a captura de rizóbios nativos do solo.

Quadro 1 Características químicas e físicas de solo contaminado com arsênio, proveniente de área degradada pela mineração de ouro, de onde foram coletados nódulos de *Crotalaria spectabilis* e *Stizolobium aterrimum*

Características químicas										
pH _{H2O}	P-rem	P ⁽¹⁾	K ⁽¹⁾	Ca ²⁺⁽²⁾	Mg ²⁺⁽²⁾	Al ³⁺⁽³⁾	H + Al ⁽³⁾	MO ⁽⁴⁾	As	
									Mehlich ⁽⁵⁾	USEPA ⁽⁶⁾
	mg L ⁻¹	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³				dag Kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	
5,5	61,36	40,1	25,4	0,68	0,22	0,1	0,9	0,5	13,2	395,9
Características físicas										
Areia ⁽⁷⁾			Silte ⁽⁷⁾		Argila ⁽⁷⁾		Classe textural ⁽⁸⁾			
160			760		80		Franco siltosa			

⁽¹⁾ Extrator Mehlich-1 (MEHLICH, 1978, 1984). ⁽²⁾ Extrator KCl 1 mol L⁻¹. ⁽³⁾ Acidez potencial em pH 7,0 extraída com acetato de cálcio 1 mol L⁻¹. ⁽⁴⁾ Matéria orgânica –oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N. ⁽⁵⁾ Teor de As disponível. ⁽⁶⁾ Teor de As total. ⁽⁷⁾ Método da pipeta (DAY, 1965). ⁽⁸⁾ Classificação de acordo com a instrução normativa nº 2 do MAPA de 09 de outubro de 2008.

Foram incluídas estirpes referência dos gêneros *Azorhizobium* (*A. caulinodans* – ORS 571T; *A. doebereinae* – BR 5401T), *Mesorhizobium* (*M. plurifarum* – BR 3804), *Rhizobium* (*R. tropici* – BR 322T), *Burkholderia* (*B. cepacia* – LMG 1222), e representantes do gênero *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium* sp. – BR 2001 e BR 2811), sendo esta última estirpe, recomendada e aprovada como inoculante para *S. aterrimum*, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A possibilidade de sequenciar ácidos nucleicos trouxe um grande avanço para a microbiologia, assim como para a classificação de microrganismos (WOESE, 1987), que tem sido fortemente influenciada pelo uso de técnicas moleculares. Embora o sequenciamento de ácidos nucleicos seja uma técnica de extrema importância para a classificação dos microrganismos, a avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos e é muito útil, em laboratórios que não possuem tecnologias sofisticadas, por ser de baixo custo (VANDAMME et al., 1996, JESUS et al., 2005). Tais características permitem a distinção de diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que posteriormente podem ser detectadas mediante estudos mais refinados (PELCZAR et al., 1981; MOREIRA et al., 1993; JARVIS et al., 1997; DE LAJUDIE et al., 1998). A avaliação do tempo de formação de colônias isoladas e a alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como indicador de diferenças fisiológicas entre gêneros são características culturais relevantes, que podem ser avaliadas (JORDAN, 1984; MOREIRA; PEREIRA, 2001, JESUS et al., 2005). Outras características, além destas, também são utilizadas com sucesso no estudo da ecologia de rizóbios, sendo a avaliação da produção de muco (polissacarídeos extracelulares), características das colônias (tamanho, formato, borda, elevação, superfície, coloração, transmissão de luz e massa de crescimento) (VINCENT, 1970; MOREIRA et al., 1993; ODEE et al., 1997;

MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997; PEREIRA, 2000; MELLONI, 2001; JESUS et al., 2005).

Analisando o dendrograma de agrupamento percebe-se a formação de dois grandes grupos bastante distintos. Ressalta-se que o dendrograma de agrupamento foi criado baseado somente nos dados de caracterização morfológica.

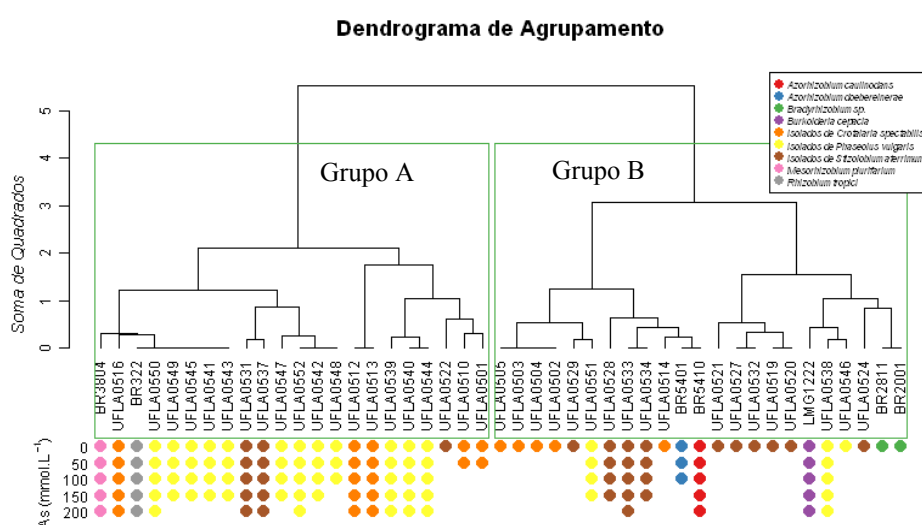


Figura 1 Dendrograma de agrupamento baseado em características fenotípicas culturais de bactérias isoladas de nódulos de três diferentes leguminosas. Relação entre os grupos culturais e a concentração de As tolerada pelos isolados

No grupo A houve predominância de isolados que acidificam o meio 79. Sendo que a maioria (15 isolados) apresentou produção de muco abundante e crescimento rápido. Enquanto isso, o grupo B apresentou em sua maioria isolados que alcalinizam o meio 79 e grande parte apresentando pouca ou moderada produção de muco e rápido tempo de crescimento, também apresentou alguns isolados com taxa de crescimento lento (Tabela 1).

Tabela 1 Principais características culturais dos grupos A e B formados no dendrograma

Identificação Isolados	Princ. Características Culturais do grupo A ⁽¹⁾			Identificação Isolados	Princ. Características Culturais do grupo B ⁽¹⁾		
	1	2	3		1	2	3
UFLA 0516	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0504	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0550	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0502	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0549	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0503	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0545	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0505	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0541	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0529	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0543	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0551	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0531	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0528	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0537	2-3	Ácido	Moderada	UFLA 0533	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0547	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0534	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0552	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0514	2-3	Alcalino	Pouca
UFLA 0542	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0521	6-9	Neutro	Abundante
UFLA 0548	2-3	Ácido	Abundante	UFLA 0527	6-9	Alcalino	Moderada
UFLA 0512	2-3	Neutro	Abundante	UFLA 0532	6-9	Alcalino	Moderada
UFLA 0513	2-3	Neutro	Abundante	UFLA 0519	6-9	Alcalino	Moderada
UFLA 0539	2-3	Neutro	Moderada	UFLA 0520	6-9	Alcalino	Moderada
UFLA 0540	2-3	Neutro	Moderada	UFLA 0538	2-3	Neutro	Moderada
UFLA 0544	2-3	Neutro	Moderada	UFLA 0546	2-3	Alcalino	Moderada
UFLA 0522	2-3	Ácido	Pouca	UFLA 0524	4-5	Alcalino	Abundante
UFLA 0510	2-3	Ácido	Moderada	BR5401	2-3	Alcalino	Escassa
UFLA 0501	2-3	Ácido	Moderada	BR5410	2-3	Alcalino	Escassa
BR3804	4-5	Ácido	Abundante	BR2001	6-9	Alcalino	Abundante
BR322	2-3	Ácido	Abundante	BR2811	6-9	Alcalino	Abundante
				LMG1222	2-3	Neutro	Moderada

⁽¹⁾ Principais características culturais dos isolados - 1 (Tempo, em dias, para visualização de colônias isoladas: 2-3, rápido; 4-5, intermediário e 6-9, lento); 2 (Modificação do pH do meio de cultura 79); 3 (produção de muco)

Nota-se que a resistência dos isolados ao As mostrou relação com suas respectivas características fenotípicas, como tempo de crescimento, modificação do pH do meio e produção de muco. Para a maioria dos isolados, foi observada uma alta resistência ao As, enquanto apenas 16 isolados tiveram seu crescimento inibido na presença deste elemento-traço nas concentrações testadas. O tempo de crescimento observado para 8 dos 16 isolados (UFLA 0504, UFLA 0502, UFLA 0503, UFLA 0505, UFLA 0529, UFLA 0514, UFLA 0524, UFLA 0546) sensíveis ao As foi de intermediário a rápido, os quais mostraram alcalinizar o pH do meio 79 e produzir pouco muco, enquanto 5 isolados (UFLA 0521, UFLA 0527, UFLA 0532, UFLA 0519, UFLA 0520) e duas estirpes referência

(BR2001 e BR2811) apresentaram tempo de crescimento lento (6-9 dias), demonstrando também alcalinizar o meio 79 e produzir muco de forma moderada a abundante. Apenas um isolado sensível ao As (UFLA 0522) demonstrou acidificar o pH do meio 79, o qual apresentou ainda tempo de crescimento rápido e pouca produção de muco. Do total das 45 bactérias testadas quanto a resistência ao As, 16 mostraram-se resistentes a este elemento-traço em todas as concentrações testadas. A maioria apresenta tempo de crescimento rápido (2-3 dias), como característica em comum, a exceção é a estirpe BR3804, a qual apresenta crescimento intermediário (4-5 dias). Das bactérias resistentes ao As em todas as concentrações testadas, 7 são capazes de acidificar o meio 79 (UFLA 0516, UFLA 0550, UFLA 0531, UFLA 0537, UFLA 0552, BR3804 e BR322), além de apresentarem produção de muco abundante; outros 7 isolados não alteram o pH do meio 79, deixando-o neutro (UFLA 0512, UFLA 0513, UFLA 0539, UFLA 0540, UFLA 0544, UFLA 0538 e LMG1222) e produzem muco de forma moderada a abundante. Apenas duas bactérias que resistiram ao As em todas as concentrações testadas tem como característica alcalinizar o meio (UFLA 0533 e BR5410). Diferentemente da maioria, estas duas bactérias apresentaram pouca e escassa produção de muco, respectivamente.

Nas concentrações de 50 e 100 mmol L⁻¹ As observou-se um crescimento em torno de 63% dos isolados. Na concentração de 150 mmol⁻¹ As o crescimento foi de 55%, enquanto na concentração de 200 mmol L⁻¹ As este valor caiu para 35%. Percebe-se uma alta tolerância dos isolados testados até a concentração de 150 mmol L⁻¹ As, uma vez que a porcentagem de crescimento ficou acima de 50%.

É importante ressaltar que neste estudo as concentrações de As toleradas pelos isolados testados foram muito superiores às observadas em outros trabalhos (CARRASCO et al., 2005; JACKSON; DUGAS; HARRISON, 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

Em relação ao comportamento das estirpes referência, dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Burkolderia*, observou-se o crescimento em todas as concentrações de As testadas, para *Azorhizobium caulinodans* (BR 5410), *Mesorhizobium plurifarum* (BR3804), *Rhizobium tropici* (BR322) e *Burkolderia cepacia* (LMG1222). A espécie *Azorhizobium doebereinereae* (BR5401) resistiu ao As até a concentração de 100 mmol L⁻¹, enquanto as estirpes representantes do gênero *Bradyrhizobium* sp (BR2001 e BR2811) mostraram-se sensíveis ao As nas concentrações testadas.

Solos contaminados por elementos-traço, geralmente apresentam baixa fertilidade (NOGUEIRA; SOARES, 2010), tornando de grande relevância estudos envolvendo o potencial do uso de rizóbios, em programas de revegetação de solos contaminados. A tolerância de rizóbios a elevadas concentrações de As tem sido evidenciada em alguns trabalhos. Carrasco et al. (2005) isolaram 96 rizóbios de nódulos de várias espécies leguminosas, presentes em um solo contaminado com As. O teste de resistência em placas de Petri demonstrou que apenas 10 isolados foram resistentes a 300 mg L⁻¹ As (4 mmol L⁻¹). Carrasco et al. (2005) demonstraram ainda a resistência de *Sinorhizobium meliloti* a nível genético. A análise da sequência dos fragmentos de resistência As de *S. meliloti* indicaram uma alta homologia com a proteína, ArsB, envolvida na resistência de outras proteobactérias. A comparação de sequências de nucleotídeos e a predição da sequência de aminoácidos revelou um alto grau de homologia com genes de resistência ao As (81-89%).

Em um trabalho realizado com a espécie vegetal *Pteris vittata*, hiperacumuladora de As, Huang et al. (2010) verificaram a diversidade da comunidade microbiana rizosférica resistente ao As. Foram obtidos 53 isolados em placas contendo 400 mmol L⁻¹ de arsenato. Dentre doze isolados selecionados, devido a sua maior resistência, foi encontrado um isolado pertencente ao gênero *Mesorhizobium* sp.

Estudos com estirpes de rizóbio, de diferentes gêneros (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*) a metais, demonstram a resistência a Zn, Cd e Cu (TRANNIN et al., 2001; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002), e são poucos os trabalhos envolvendo diferentes gêneros de rizóbio quanto a tolerância ao As.

No presente estudo, dos 45 isolados testados selecionou-se os isolados UFLA 0516 e UFLA 0514 para estudos posteriores devido a alta tolerância e sensibilidade ao As, respectivamente. O efeito das concentrações de As sobre o crescimento dos isolados UFLA 0516 e UFLA 0514 em meio líquido após um período de 72 horas foi avaliado determinando-se o número de unidades formadoras de colônia por mL de meio, bem como o peso seco das células (Figura 2).

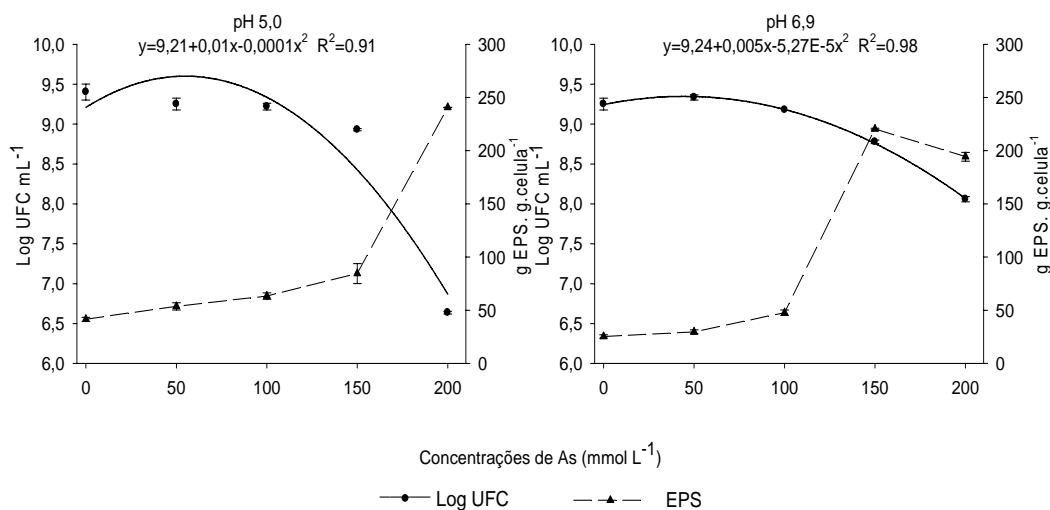


Figura 2 Teste em meio YM líquido para determinação do número de células viáveis e produção de exopolissacarídeo em diferentes concentrações de As para o isolado UFLA 0516 após 72 horas de crescimento sob agitação (125 rpm) a 28 °C

Apesar das condições de difusão, complexação e disponibilidade do As em meio líquido serem diferentes daquelas observadas no meio sólido, a estirpe UFLA 0516 comportou-se semelhantemente nas duas condições de cultivo, ou seja, foi capaz de crescer em meio sólido, assim como em meio líquido nas maiores concentrações de As testadas. Porém, no meio líquido, a redução no crescimento desta estirpe pode ser avaliada quantitativamente.

O Log UFC, reforça o comportamento do isolado UFLA 0516 em relação ao pH. Este isolado acidifica o meio 79 em placa, demonstrando sua preferência de crescimento em pH mais ácido. A máxima produção de células em pH 5.0 ocorreu na concentração de 54,98 mmol L⁻¹ As, com Log UFC de 9,60. Enquanto em pH 6.9 o número máximo do Log UFC foi de 9,35, na concentração de 44,08 mmol L⁻¹ As. Em pH 5.0 o Log UFC sempre demonstrou-se superior ao pH 6.9 até a concentração de 150 mmol L⁻¹ As, na concentração de 200 mmol L⁻¹ As no pH 5.0 o Log UFC foi de 6,64 e em pH 6.9 foi de 8,06 Log UFC mL⁻¹. É interessante notar que a produção de exopolissacarídeo, em ambos valores de pH vem aumentando à medida que o número de células decai, deixando evidente que a produção de EPS possa fazer parte do processo de resistência ao As. Em pH 5.0 houve uma maior produção de EPS com um menor Log UFC, na concentração de 200 mmol L⁻¹ As. Possivelmente, a redução na produção de EPS, em pH 6.9 a partir da dose de 150 mmol L⁻¹ tenha ocorrido, devido à incapacidade das células em dispendere maiores quantidades de energia a partir deste valor para a produção de compostos extracelulares, havendo uma canalização de energia para multiplicação celular. Nota-se que o Log UFC em pH 5.0 na concentração de 200 mmol L⁻¹ As é 2,76 unidades menores que na concentração 0. Enquanto em pH 6.9 essa redução foi de apenas 1,19 unidades.

Juntamente com a capacidade que algumas bactérias apresentam em absorver elementos-traço, há propriedades intrínsecas das células bacterianas, incluindo aquelas relacionadas com a estrutura da parede celular e produção de

substâncias extracelulares como os exopolissacarídeos no sequestro dos metais na parte externa da célula, que diminuem a sua entrada e conseqüente toxicidade ao metabolismo celular (BEVERIDGE; MURRAY, 1980; GADD, 1992; PEREIRA; LIMA; FIGUEIRA, 2006b; GEETS et al., 2008).

Uma vez que os polissacarídeos microbianos são conhecidos como potentes compostos na adsorção de elementos-traço, também foi interesse deste trabalho investigar a produção destes biopolímeros na presença de As. A quantidade de EPS por grama de peso seco de célula bacteriana (g de EPS/g de célula) produzida pelo isolado UFLA 0516 foi avaliada em meio de cultura YM líquido complementado com as diferentes concentrações de As (Figura 2). A produção de EPS para o isolado UFLA 0514 não foi avaliada devido à ausência de crescimento nas concentrações de As testadas.

Observa-se que a produção de EPS pelo isolado UFLA 0516 aumenta na medida em que aumenta a concentração de As, sugerindo que talvez este possa ser um mecanismo de proteção a toxicidade do As. Uma maior produção de EPS por espécies de *Pseudomonas* relacionado à exposição de elementos-traços como o arsênio foi relatada por alguns autores (BANERJEE 1986; BEECH; CHEUNG, 1995; KIDAMBI et al., 1995).

Foi avaliada também, no presente trabalho, a resistência dos isolados a diferentes antibióticos. A maioria dos isolados que resistiram ao As em todas as concentrações testadas, apresentou também, resistência múltipla a antibióticos (Tabela 2). Esta múltipla resistência a antibióticos observada para estes isolados deve estar relacionada ao alto grau de tolerância ao As. Em outros estudos, esta tolerância a elementos-traço interligada com a múltipla resistência a antibióticos também tem sido relatada, sendo sugerido pelos autores, que sobre condições ambientais de estresse, microrganismos resistentes a elementos-traço e antibióticos se adaptam mais rapidamente, se multiplicando e colonizando o

ambiente contaminado com maior facilidade (FOSTER et al., 1983; TIMONEY et al., 1978).

Tabela 2 Resultados do teste de resistência antimicrobiano por disco-difusão (mm)

Isolado	AZI ⁽¹⁾	AMO ⁽²⁾	AMP ⁽³⁾	CFD ⁽⁴⁾	CLA ⁽⁵⁾	CLO ⁽⁶⁾	CRO ⁽⁷⁾	ERI ⁽⁸⁾	EST ⁽⁹⁾	GEN ⁽¹⁰⁾	KAN ⁽¹¹⁾	NAL ⁽¹²⁾	OXA ⁽¹³⁾	RFM ⁽¹⁴⁾	VAN ⁽¹⁵⁾
UFLA 0501	35,55	19,63	R	5,80	24,87	11,16	R	25,49	20,83	10,90	21,66	21,88	R	R	R
UFLA 0502	28,38	R	R	20,90	R	16,10	12,67	R	15,50	7,96	11,54	R	R	R	R
UFLA 0503	R	R	R	18,37	27,67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
UFLA 0504	R	R	R	17,84	R	R	10,61	R	8,36	8,62	9,80	R	R	R	R
UFLA 0505	R	R	R	16,64	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
UFLA 0510	40,95	9,99	R	18,07	23,25	R	R	19,80	20,47	12,48	26,48	16,84	R	R	R
UFLA 0512	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8,76	9,44	R	R	R	9,60
UFLA 0513	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8,53	11,99	R	R	R	8,71
UFLA 0514	R	R	R	R	R	R	R	R	11,08	R	R	R	R	R	R
UFLA 0516	R	R	R	R	R	R	R	R	R	9,01	11,62	R	R	14,24	11,73
UFLA 0519	R	R	R	R	R	R	R	R	R	13,08	28,29	R	R	R	R
UFLA 0520	41,84	R	R	R	R	R	R	R	R	13,00	30,66	17,53	R	R	R
UFLA 0521	R	R	R	13,57	R	R	R	R	12,17	12,04	31,10	26,56	R	34,94	R
UFLA 0522	41,54	22,10	R	9,05	20,76	R	R	R	R	R	18,21	9,72	R	R	R
UFLA 0524	R	15,60	R	R	R	R	R	R	R	R	21,19	22,18	R	19,33	R

Tabela 2 continua

Isolado	AZI ⁽¹⁾	AMO ⁽²⁾	AMP ⁽³⁾	CFD ⁽⁴⁾	CLA ⁽⁵⁾	CLO ⁽⁶⁾	CRO ⁽⁷⁾	ERI ⁽⁸⁾	EST ⁽⁹⁾	GEN ⁽¹⁰⁾	KAN ⁽¹¹⁾	NAL ⁽¹²⁾	OXA ⁽¹³⁾	RFM ⁽¹⁴⁾	VAN ⁽¹⁵⁾
UFLA 0527	25,01	15,00	14,92	R	16,30	R	R	R	R	R	23,53	33,96	15,93	21,42	R
UFLA 0528	14,88	R	R	21,22	30,21	R	R	33,73	14,14	R	13,32	R	R	36,23	R
UFLA 0529	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
UFLA 0531	R	R	13,05	24,47	R	R	R	R	17,13	R	R	R	R	24,77	R
UFLA 0532	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18,53	R	R	R	R
UFLA 0533	22,22	23,35	30,02	R	18,73	13,81	30,47	22,53	13,20	12,02	14,63	37,99	19,75	22,71	27,28
UFLA 0534	7,37	30,00	40,85	47,50	R	11,00	44,75	R	12,65	10,65	14,20	12,15	R	29,05	R
UFLA 0537	7,55	R	R	R	R	R	R	R	R	10,87	12,82	R	R	15,82	R
UFLA 0538	15,35	R	R	20,33	R	R	R	R	11,58	11,63	20,89	R	R	10,66	11,40
UFLA 0539	27,47	R	R	R	25,54	18,16	23,57	16,10	28,46	9,27	12,02	R	R	16,37	R
UFLA 0540	42,14	R	R	R	23,28	22,19	35,53	26,34	32,80	12,00	30,12	13,06	R	31,39	19,78
UFLA 0541	9,69	R	R	R	R	R	R	R	R	10,44	13,13	R	R	11,57	10,76
UFLA 0542	40,07	R	R	R	18,58	12,24	R	23,36	R	12,53	23,29	10,13	R	28,51	28,92
UFLA 0543	34,53	R	R	R	22,98	16,32	R	22,72	16,62	12,59	24,03	R	R	28,71	24,69
UFLA 0544	36,42	R	R	R	9,25	11,43	R	9,25	R	24,00	16,38	R	R	18,32	R
UFLA 0545	11,43	R	R	R	R	R	R	R	R	8,39	7,13	R	R	16,95	11,99

Tabela 2 conclusão

Isolado	AZI ⁽¹⁾	AMO ⁽²⁾	AMP ⁽³⁾	CFD ⁽⁴⁾	CLA ⁽⁵⁾	CLO ⁽⁶⁾	CRO ⁽⁷⁾	ERI ⁽⁸⁾	EST ⁽⁹⁾	GEN ⁽¹⁰⁾	KAN ⁽¹¹⁾	NAL ⁽¹²⁾	OXA ⁽¹³⁾	RFM ⁽¹⁴⁾	VAN ⁽¹⁵⁾
UFLA 0546	R	14,40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
UFLA 0547	R	7,52	R	R	9,61	R	12,80	R	R	9,31	15,47	12,81	R	R	R
UFLA 0548	43,21	R	R	R	24,77	25,77	8,44	31,86	14,19	11,39	22,85	9,65	R	31,89	33,64
UFLA 0549	10,58	R	7,27	7,02	16,12	17,25	9,25	19,38	8,49	9,13	12,54	7,19	7,20	13,73	7,67
UFLA 0550	R	R	R	R	R	R	R	R	R	6,35	8,87	R	R	12,94	11,42
UFLA 0551	R	R	R	R	R	R	19,76	R	R	6,87	R	12,81	R	6,80	R
UFLA 0552	R	R	12,47	R	R	19,60	R	R	R	R	16,58	17,46	R	10,22	19,61
BR3804	R	R	R	32,75	R	7,90	R	R	R	11,45	11,04	R	R	15,90	7,50
BR322	21,10	R	R	R	R	R	R	R	7,90	13,45	25,77	R	R	10,11	12,67
BR5401	R	R	R	10,21	R	12,08	R	R	12,63	11,69	20,35	R	R	31,89	R
BR5410	R	R	R	13,35	R	12,21	R	R	12,44	R	17,91	21,97	R	27,06	R
BR2001	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22,28	R	R	18,57	R
BR2811	R	11,53	11,55	14,31	R	R	11,39	R	R	R	24,85	R	R	19,72	R
LMG1222	R	R	R	R	R	7,20	R	R	R	7,20	17,97	11,68	R	12,94	R

⁽¹⁾Azitromicina, ⁽²⁾Amoxicilina, ⁽³⁾Ampicilina, ⁽⁴⁾Cefadroxil, ⁽⁵⁾Clarithromicina, ⁽⁶⁾Cloranfenicol, ⁽⁷⁾Ceftriaxona, ⁽⁸⁾Eritromicina, ⁽⁹⁾Estreptomicina, ⁽¹⁰⁾Gentamicina, ⁽¹¹⁾Kanamicina, ⁽¹²⁾Ácido Nalidíxico, ⁽¹³⁾Oxaciclina, ⁽¹⁴⁾Rifamicina e ⁽¹⁵⁾Vancomicina.

A presença de elevadas concentrações de As parece co-selecionar a resistência a antibióticos juntamente com a tolerância a este elemento-traço nas bactérias (BERG et al., 2010; WRIGHT et al, 2006). Provavelmente, ambas as resistências a antibióticos e ao As em bactérias isoladas de áreas contaminadas sejam mediadas por bombas de efluxo, em suas membranas (LONG et al., 2010). Os mecanismos moleculares e bioquímicos utilizados pelos isolados descritos neste trabalho, quanto a resistência a antibióticos e elementos-traço necessitam ser investigados.

Sabendo do potencial que os isolados deste trabalho apresentam, avaliou-se a capacidade desses quanto a fixação de nitrogênio em vida livre. Os controles positivos BR5401^T e ORS571^T formaram película somente na presença de lactato (Tabela 3).

Tabela 3 Formação de películas por estirpes de bactérias sobre a superfície do meio LO na presença de lactato e manitol como fonte de carbono

Estirpes	Aparecimento de película		Estirpes	Aparecimento de película		Estirpes	Aparecimento de película	
	Manitol	Lactato		Manitol	Lactato		Manitol	Lactato
UFLA 0519	+	-	UFLA 0503	-	-	UFLA 0545	-	+
UFLA 0520	-	-	UFLA 0504	-	-	UFLA 0546	-	-
UFLA 0521	-	-	UFLA 0505	+	-	UFLA 0547	+	+
UFLA 0522	-	-	UFLA 0510	-	-	UFLA 0548	-	-
UFLA 0524	+	-	UFLA 0512	-	-	UFLA 0549	-	-
UFLA 0527	-	-	UFLA 0513	-	-	UFLA 0550	-	-
UFLA 0528	-	-	UFLA 0514	+	-	UFLA 0551	-	-
UFLA 0529	-	-	UFLA 0516	+	-	UFLA 0552	-	+
UFLA 0531	-	-	UFLA 0538	-	-	BR2001	+	-
UFLA 0532	+	-	UFLA 0539	-	-	BR2811	+	-
UFLA 0533	-	+	UFLA 0540	+	+	BR3804	-	-
UFLA 0534	-	-	UFLA 0541	-	+	BR322	+	+
UFLA 0537	-	-	UFLA 0542	-	+	BR5401	-	+
UFLA 0501	-	-	UFLA 0543	-	-	ORS571 ^T	-	+
UFLA 0502	-	-	UFLA 0544	+	+	LMG1222	NA	NA

+: cresceu; -: não cresceu; NA: não avaliada

Quanto à fixação de nitrogênio em vida livre, dos 38 isolados de nódulos de *C. spectabilis*, *S. aterrimum* e *P. vulgaris*, 14 isolados formaram película em meio LO. Destes, sete isolados foram capturados do solo utilizando *P. vulgrais*, como planta isca (UFLA 0540, UFLA 0544 e UFLA 0547) os quais formaram película em ambas fontes de Carbono, manitol e lactato, enquanto (UFLA 0541, UFLA 0546, UFLA 0545, e UFLA 0552) formaram a película indicadora de fixação em vida livre somente em lactato. Três isolados de *C. spectabilis* (UFLA 0505, UFLA 0514 e UFLA 0516), formaram a película em meio LO, sendo o

isolado UFLA 0516, resistente ao As em todas as concentrações testadas. Dos isolados de *S. atterimum*, quatro apresentaram formação de película (UFLA 0519, UFLA 0524, UFLA 0532 e UFLA 0533), dos quais, os três primeiros fixam nitrogênio em vida livre, utilizando manitol como fonte de carbono, e o último também fixa nitrogênio em vida livre, porém usa lactato como fonte de carbono. Das estirpes referência cinco demonstraram fixar nitrogênio em vida livre, sendo BR2001, BR2811, BR5401, ORS571^T, as quais utilizam lactato como fonte de carbono, enquanto a estirpe BR322 utiliza ambas fontes de carbono, manitol e lactato. Apesar dos resultados indicarem que há isolados capazes de fixar nitrogênio em vida livre, mais estudos fazem-se necessários. Estudos de autenticação destes isolados quanto à capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em simbiose devem ser realizados, visando o potencial de uso em revegetação de áreas contaminadas com As.

Os resultados deste estudo demonstram um grande potencial do isolado UFLA 0516 em produzir EPS sob elevadas concentrações de As. Devido à sua resistência e capacidade de produzir EPS em concentrações elevadas de As sob condições aeróbicas, este isolado pode ser futuramente empregado para remediação de As em reatores ou mesmo "*in situ*". No entanto, muitos aspectos da interação entre este microrganismo e outros elementos-traços e leguminosas, ainda encontram-se inexplorados e, portanto, futuros estudos sobre os aspectos fisiológicos e possíveis aplicações deste isolado fazem-se necessários.

4 CONCLUSÃO

A tolerância ao As de bactérias isoladas de nódulos de mineração de ouro está relacionada com as características culturais tais como o rápido crescimento, acidificação do meio de cultura e produção de exopolissacarídeo.

A resistência das bactérias a vários antibióticos também demonstra estar relacionada com a tolerância ao As.

A elevada tolerância ao As apresentada pelos isolados torna-os uma ferramenta em potencial, que merece mais estudos visando a aplicabilidade destes em biorremediação.

REFERÊNCIAS

BANERJEE, P. C. Alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: effect of arsenite and other metabolic inhibitors. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 145, p. 408-410, 1986.

BEECH, I. B.; CHEUNG, C. W. S. Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking v. 35, p. 59-72, 1995.

BERG, J.; THORSEN, M. K.; HOLM, P. E.; JENSEN, J.; NYBROE, O.; BRANDT, K. K. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay, **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, p. 8724–8728, 2010.

BEVERIDGE, T. J.; MURRAY, R. G. E. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 141, p. 876-887, 1980.

BHATTACHARJEE, H. et al. Arsenic transporters from *E. coli* to humans. In: BROOME-SMITH, J. K. et al. (Ed.). Transport of molecules across microbial membranes. In: SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY SYMPOSIA, 58., 1999, Cambridge. **Annals...** Leeds: Society for General Microbiology, 1999. 279 p.

BOBROWICZ, P. et al. Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 13, p. 819–828, 1997.

BRIDGE, T. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Extracellular metalbinding activity of the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 2987-2995, 1999.

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

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

CASTEIN, H. V. et al. Removal of mercury from chloralkali electrolisis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5279-5284, 1999.

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, p. 185-193, 2008.

DE LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, p. 369-382, 1998.

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, p. 356-362, 2004.

DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMERGUES, Y.R. Free-living *rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 45, p.711-713, 1983.

FRANCO, A. A. et al. Revegetação de Solos Degradados: Comunicado Técnico. In: EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Rio de Janeiro, p. 1-9, n. 9, 1992.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory Manual of General Microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil.** 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1928. 145 p.

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, p. 1757-1760, 2000.

FOSTER, T. J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 47, p. 361-409, 1983.

GADD, G. M. Metals and microorganisms: A problem of definition. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 100, p. 197-203, 1992.

GAVRILESCU, M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 4, p. 219-232, 2004.

GEETS, J. et al. Microbial activities, monitoring and application as part of a management strategy for heavy metal-contaminated soil and ground water. **Developments in Soil Science**, Amsterdam, v. 32, p. 521-559, 2008.

GLADYSHEVA, T. B.; ODEN, K. L.; ROSEN, B. P. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. **Biochemistry**, Easton, v. 33, p. 7288–7293, 1994.

HUANG, A. et al. Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 56, p. 236-246, 2010.

JACKSON, C. R.; DUGAS, S. L.; HARRISON, K. G. Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 2319-2322, 2005.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium cicer*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshansense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, p.895-898, 1997.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 769-776, 2005.

JI, G. et al. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. **Biochemistry**, Easton, v. 33, p. 7294-7299, 1994.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-256.

KABATA-PENDIAS, A., MUKHERJEE, A. B. **Trace Elements from Soil to Human**. Berlin: Springer, 2007. 550 p.

KAZY, S. K. et al. Extracellular polysaccharides 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, p. 583-588, 2002.

KIDAMBI, S. P. et al. Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2172-2179, 1995.

LASAT, M. M. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 109-120, 2002.

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

LONG, F. et al. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. **Nature**, Londres, v. 467, p. 484–488, 2010.

LOVELY, D. R.; WIDMAN, P. K.; WOODWARD, J. C.; PHILLIPS, E. J. P. Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Dsulfovibrio vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 3572-3576, 1993.

MACY, J. M. et al. *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov. sp. nov., a new arsenate respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 46, p. 1153–1157, 1996.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p.1005-1010, 1997.

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, p. 343-355, 2002a.

MELLONI, R. **Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita**. 2001. 173p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MILES, A. A.; MISRA, A. A. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, p. 732-749, 1938.

MOREIRA, F. M. S.; PEREIRA, E. G. Microsymbionts: Rhizobia. In: SWIFT, M.; BIGNELL, D. (Ed.). **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Indonesia: Bogor, 2001. 34 p.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de Biologia dos solos tropicais**: Amostragem e Caracterização da biodiversidade. Lavras: UFLA, 2010. 368 p.

MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B. P. Arsenate Reductases in Prokaryotes and Eukaryotes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, p. 745-748, 2002.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 311-325, 2002.

MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B. P. The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR2* gene encodes an arsenate reductase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, p. 127-136, 1998.

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

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

NOGUEIRA, M. A.; SOARES, C. R. F. S. Micorrizas Arbusculares e Elementos-Traço. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas**: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: UFLA, 2010. 716 p.

ODEE, D. W. et al. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v.188, p.65-75, 1997.

OLIVERA, A. et al. Enumeration and Characterization of Arsenic-Tolerant Diazotrophic Bacteria in a Long-Term Heavy-Metal-Contaminated Soil. **Water, Air and Soil Pollution: an international journal of environmental pollution**, Dordrecht, v. 200, p. 237–243, 2009.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. v.1. 1072 p.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PEREIRA, S. I. A.; LIMA, A. I. G.; FIGUEIRA, E. M. A. P. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated portuguese soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 176-186, 2006b.

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

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

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

SINGH, O. V. et al. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, p. 405-12, 2003.

SRIPRANG, R. et al. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, p. 279-93, 2002.

TIMONEY, J. et al. Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 36, p. 465-472, 1978.

TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de Estirpes e Isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a Zinco, Cádmio e Cobre "In Vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, p. 305-316, 2001.

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

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v.60, p.407-438, 1996.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption a review. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 44, p. 301-316, 1997.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 11, p. 235-250, 1995.

WRIGHT, M. S. et al. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 293–302, 2006.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.

WU, C. H. et al. Engineering Plant-Microbe Symbiosis for Rhizoremediation of Heavy Metals. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1129-1134, 2006.