

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HIPERACUMULAÇÃO DE CÁDMIO EM PLÂNTULAS DE
Cajanus cajan INOCULADAS COM *Pseudomonas***

Gabriela Cabral Fernandes

Bióloga

2014

**D
I
S
S.**

/

**F
E
R
N
A
N
D
E
S**

**G.
C.**

**2
0
1
4**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HIPERACUMULAÇÃO DE CÁDMIO EM PLÂNTULAS DE
Cajanus cajan INOCULADAS COM *Pseudomonas***

Gabriela Cabral Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2014

Fernandes, Gabriela Cabral
F363 Hiperacumulação de cádmio em plântulas de *Cajanus*
h *cajan* inoculadas com *Pseudomonas* / Gabriela Cabral
Fernandes. – – Jaboticabal, 2014
x, 80 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2014

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Maria Benincasa Vidotti, Tereza
Cristina Luque Castellane
Bibliografia

1. Solubilização de fosfato. 2. Ácido indol acético. 3.
Fitorremediação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.35:631.52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: HIPERACUMULAÇÃO DE CÁDMIO EM PLÂNTULAS DE *Cajanus cajan* INOCULADAS COM *Pseudomonas*

AUTORA: GABRIELA CABRAL FERNANDES

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARIA BENINCASA VIDOTTI

Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal / Jaboticabal/SP

Profa. Dra. TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 28 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Cabral Fernandes – nascida em Jaboticabal, estado de São Paulo, em 14 de março de 1986. Ingressou no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado) em março de 2006 pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara – SP, obtendo o título de Bióloga em dezembro de 2009. Durante sua graduação, foi estagiária do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas, departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal, onde em 2011 esteve vinculada ao projeto temático (2008/58114-3) da FAPESP. Foi bolsista CAPES e em julho de 2014, recebeu o título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela FCAV-UNESP, onde em agosto do mesmo ano ingressou no Doutorado em Microbiologia Agropecuária.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

À vovó Lia que foi encantar o céu com seu sorriso.
Ao pequeno André Luis que veio encantar o mundo com sua alegria.
Ao Pai maior e aos amigos espirituais do Cantinho da Fé de André Luiz.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo dom da vida.

Aos meus avós Enercial e Benedicta pela criação.

A minha Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos, pela orientação e pelos ensinamentos de vida.

Ao Prof. Dr. Jackson A. Marcondes de Souza, Prof. Dr. Rogério F. de Carvalho, Profa. Dra. Priscila L. Gratão e Profa. Lúcia M. C. Alves, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Dr. João C. Campanharo que nunca mediu esforços para ajudar-me nas metodologias.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas, que prefiro não citar nomes para que não haja esquecimentos, pelos momentos de ajuda e risadas.

Aos colegas da Comissão Organizadora do Curso de Inverno de Genética, pelo companheirismo e profissionalismo.

A toda minha família, incluindo irmãos, tios, tias, madrinha, padrinho, primos e primas, minha gratidão pelo carinho e pelos bons momentos.

Ao Willian, pelas conversas, carinho, respeito e por acreditar em mim, mesmo quando eu não mais acreditava.

A minha sobrinha Heloísa por encher minha vida de alegria.

Aos professores, coordenadora do programa de Pós – Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), diretores e funcionários da FCAV-UNESP.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho.

A Deus pela vida e por me estender as mãos sempre que precisei.

Meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A torta de filtro como fonte para prospecção bacteriana	2
2.2 O Cádmiio	4
2.2.1 Efeito do cádmio às plantas	6
2.3 Uso da fitorremediação na limpeza de solos contaminados por cádmio	8
2.3.1 Fitoextração.....	9
2.3.2 Fitofiltração.....	10
2.3.3 Fitoestabilização.....	10
2.3.4 Fitovolatilização.....	11
2.3.5 Fitodegradação	11
2.3.6 Rizodegradação	11
2.4 Bactérias como facilitadoras da fitoextração de metais.....	12
2.5 Bactérias produtoras de auxina (ácido 3-indol acético, AIA)	18
2.6 Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF).....	21
2.7 A versatilidade do gênero <i>Pseudomonas</i>	26
2.8 O uso do gene <i>16S rRNA</i> e da isoenzima α -esterase na identificação bacteriana	29
2.9 Feijão guandu (<i>Cajanus cajan</i>): uma planta multiuso.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Fluxograma Experimental:.....	32
3.1.1 Coleta de solo	33
3.2 Isolamento bacteriano	33
3.3 Extração de isoenzima	33
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida	34

3.4.1 Detecção isoenzimática.....	36
3.4.2 Alfa-esterase	36
3.5 Extração e quantificação do DNA.....	36
3.6 PCR de amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	37
3.7 Análise das sequências.....	38
3.8 Construção do dendrograma.....	38
3.9 Resistência ao metal pesado	39
3.10 Efeito da presença de Cd nas curvas de crescimento.	39
3.11 Avaliação da solubilização de fosfato.....	40
3.12 Determinação colorimétrica do AIA	40
3.13 Inoculação e avaliação das sementes estressadas por Cd.....	41
3.14 Dosagem de Cd	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Coleta, Isolamento e identificação dos Isolados.....	41
4.2 Dendrograma de similaridade	45
4.3 Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) do Cd para os isolados	46
4.4 Efeito da presença do Cd nas curvas de crescimento	48
4.5 Seleção das bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico	49
4.6 Seleção das bactérias produtoras de AIA	51
4.7 Inoculação bacteriana e acúmulo de Cd pelas plântulas.....	54
5 CONCLUSÃO	58
6 REFERÊNCIAS.....	59

HIPERACUMULAÇÃO DE CÁDMIO EM PLÂNTULAS DE *Cajanus Cajan* INOCULADAS COM *Pseudomonas*

RESUMO – O cádmio (Cd) é um metal pesado que mesmo sob baixas concentrações, é tóxico. Alguns micro-organismos possuem a habilidade de responder positivamente às quantidades nocivas desse metal. Nesse trabalho, bactérias foram isoladas da torta de filtro, um subproduto da indústria agroenergética e testadas quanto à resistência ao Cd, solubilização de fosfato (SF) e produção de fitormônio de crescimento (AIA). A bactéria que mais se destacou nos testes anteriormente citados foi inoculada em sementes de feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp) e o benefício promovido pela interação na germinação e desenvolvimento das plântulas estressadas pelo Cd foi avaliado. A partir do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*, foi possível comprovar com 91% de similaridade que o isolado selecionado pertence ao gênero *Pseudomonas*. Os resultados inferidos pelo espectrofotômetro de absorção atômica mostraram que a capacidade de retenção de Cd, foi maior nos materiais provenientes das sementes inoculadas e que a capacidade de absorção da raiz em relação à parte aérea foi 80% maior. Assim, a partir desse estudo foi possível observar que as plântulas inoculadas com *Pseudomonas* absorveram mais metal do meio. O estudo de plântulas hiperacumuladoras de Cd pode fornecer informações importantes para a melhor compreensão desta tolerância.

Palavras-chave: Ácido indol acético, feijão guandu, fitorremediação, metal pesado, solubilização de fosfato

CADMIUM HYPERACCUMULATION IN *Cajanus cajan* SEEDLINGS INOCULATED WITH *Pseudomonas*

ABSTRACT - Cadmium (Cd) is a heavy metal that even at low concentrations is toxic. Some microorganisms have the ability to respond positively to harmful amounts of this metal. In this study, bacteria were isolated from the filter cake, a bioproduct of the bioenergy industry and tested for resistance to Cd, phosphate solubilization (PS) and growth phytohormone production (IAA). The bacterium that stood out in the tests mentioned above was inoculated on pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp) seeds and the beneficial interaction for germination and seedling development stressed by Cd was evaluated. From the partial *16S rRNA* gene, it was possible to observe that with 91% similarity the bacterial isolate selected belongs to the genus *Pseudomonas*. The results inferred by atomic absorption spectrophotometer showed that the retention capacity of Cd was higher in materials from inoculated seeds and that the root to shoot ratio absorption capacity was 80% higher. Thus, from this study it was observed that the seedlings inoculated with *Pseudomonas* retained a higher amount of metal. The study of Cd hyperaccumulators seedlings can provide important information for better understanding of this tolerance.

Keywords: indole acetic acid, *Pigeon pea*, phytoremediation, heavy metal, phosphate solubilization

Lista de Tabelas

Tabela 1: Padrões e valores orientadores	5
Tabela 2: Diferentes técnicas de fitorremediação (H. ALI et al. 2013).....	9
Tabela 3: Combinações de plantas-bactérias em vários estudos de fitorremediação de metal (GLICK, 2010)	14
Tabela 4: Importantes micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSP), seus nichos ecológicos e ácidos orgânicos produzidos (SHARMA et al. 2013), doi:10.1186/2193-1801-2-587	23
Tabela 5: Promoção do crescimento de plantas por micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) (Patil et al. 2002; Sharma et al. 2013)	26
Tabela 6: Solução tampão de extração (quantidade suficiente para 100ml)	34
Tabela 7: Solução tampão de sonicação (quantidade suficiente para 100ml)	34
Tabela 8: Solução gel de separação a 10%	35
Tabela 9: Solução gel de concentração a 5%.....	35
Tabela 10: Solução tampão de corrida (quantidade suficiente para um litro)	35
Tabela 11: Classificação dos isolados bacterianos	44
Tabela 12: Concentração mínima inibidora do desenvolvimento bacteriano	47
Tabela 13: Diâmetro da área solubilizada pelos micro-organismos em meio NBRIP	51
Tabela 14: Dosagens colorimétrica do AIA em diferentes estágios de cultivo em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano)	53
Tabela 15: Resultados obtidos a partir da germinação das sementes inoculadas e não inoculadas	56

Lista de Figuras

- Figura 1:** Torta de filtro semicomposta3
- Figura 2:** Visão geral das vias biossintéticas do AIA em bactérias. As linhas tracejadas referem-se às vias nomeadas a partir de um intermediário. IAAId, indol-3-acetaldeído; IAM (indol-3-acetamida), indol-3-acetamida; IPDC, indol-3-piruvato-descarboxilase; Trp triptofano. Adaptado de Spaepen & Vanderleyden (2011).20
- Figura 3:** A variedade funcional e ambiental de *Pseudomonas* spp. O ancestral comum do *Pseudomonas* encontrou uma gama de ambientes abióticos e bióticos que levou à evolução de uma infinidade de traços e estilos de vida com uma sobreposição significativa entre as espécies (SILBY et al. 2011)27
- Figura 4:** Sistema isoenzimático α -esterase em gel de poliacrilamida. Gel A: Isolados JAB-01 ao JAB-20. Gel B: Isolados JAB-21 ao JAB-42. Gel C: Isolados JAB-39 ao JAB-55. Mostrando as diferenças, semelhanças e ausência nos padrões de bandas.....42
- Figura 5:** Perfil eletroforético de alguns dos isolados da torta de filtro, em gel de agarose 0,8% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/ μ L). Canaletas: Kb - padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder - Fermentas). As demais canaletas correspondem aos isolados JAB-01 ao JAB-28.....42
- Figura 6:** Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação do DNA de alguns dos isolados da torta de filtro, pelos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S r RNA pA e p65B, em gel de agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/ μ L). Canaletas Kb – padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder – Fermentas). Demais canaletas correspondem aos isolados JAB-30 ao JAB-46.....43
- Figura 7:** Dendrograma de similaridade a partir da sequência F do isolado JAB-47.45
- Figura 8:** Desenvolvimento bacteriano em meio de cultura contendo Cd46
- Figura 9:** Curva de crescimento da bactéria *Pseudomonas* cultivada em meio líquido DYGS na presença e ausência de Cádmio. Onde: \rightarrow ponto início diluição da amostra (1:3).....48
- Figura 10:** Formação do halo de solubilização no sétimo dia de crescimento bacteriano. Ao lado esquerdo pelo isolado JAB-47 e ao lado direito pelo controle positivo.49
- Figura 11:** Outros isolados que foram destaque para o teste de solubilização de fosfato. Esses pertencentes aos gêneros *Bacillus* (JAB-40 e JAB-52) e *Pantoea* (JAB-46)50

Figura 12: Produção de AIA pelos isolados (colunas de 1 a 7). A coluna 8 refere-se a curva padrão.	52
Figura 13: Germinação das sementes em sistema de potes plásticos.....	54
Figura 14: Sistema de fotoperíodo	55
Figura 15: O gráfico A e B representam o acúmulo de cádmio nas raízes e parte aérea das sementes inoculadas e não inoculadas. Demonstrando que na presença do micro-organismo o acúmulo é maior.	56
Figura 16: O gráfico demonstra que o acúmulo de cádmio é maior nas raízes	57
Figura 17: À esquerda, parte aérea e sementes inoculadas e à direita, parte aérea e sementes não inoculadas).....	58

1 INTRODUÇÃO

Durante a safra 2012/13 foram moídas 588,92 milhões de toneladas de cana de açúcar e para esta safra é esperado um aumento de 10,70% (CONAB, 2013) na produção. No processo de moagem, para cada tonelada de cana moída são gerados 30 kg de torta de filtro, um subproduto utilizado no solo para cultivo tanto para fornecer nutrientes, uma vez que é rico em fósforo, quanto para corrigir a acidez (NARDIN, 2007). Contudo, pesquisas veem reportando que o uso deste subproduto eleva a quantidade de alguns metais pesados disponíveis no solo como, por exemplo, o Cd (RAMALHO; SOBRINHO, 2001). A contaminação por Cd pode resultar também da erosão do solo e de atividades humanas tais como a mineração, indústria e agricultura (PRAPAGDEE et al., 2013) pelo uso de fertilizantes fosfatos que contém em sua composição altas concentrações desse metal.

A presença do Cd na atmosfera, no solo e na água pode causar problemas sérios para todos os organismos, e sua bioacumulação na cadeia alimentar pode ser altamente perigosa (GALLEGO et al., 2012). Neste momento, a busca por micro-organismos e plantas capazes de biorremediar ambientes contaminados, torna-se uma opção viável e altamente eficaz.

“A fitorremediação, refere-se basicamente ao uso de plantas e micro-organismos associados ao solo, para reduzir as concentrações ou efeitos tóxicos de contaminantes nos ambientes” (GREIPSSON, 2011). Essa é uma tecnologia relativamente recente com pesquisas realizadas principalmente durante as últimas duas décadas (1990 em diante). O conceito de fitorremediação (como fitoextração) foi sugerido por Chaney (1983) (ALI et al., 2013).

Já foi reportada a capacidade de *Cajan cajanus*, fitroextrair Cd e Zinco (Zn) (PONIEDZIALEK et al., 2010) e crescer sob altas concentrações de Chumbo (Pb) (SINHAI et al., 2011). Esse feijão pertencente à família das Fabáceas, uma leguminosa usada tanto para alimentação como para cobertura e forragem, possui altos níveis de proteínas e aminoácidos importantes, como a metionina, lisina e triptofano (PAL et al., 2011).

A habilidade de fitorremediação pelo gênero *Pseudomonas*, que engloba bactérias gram-negativas, aeróbias, baciliformes da família Pseudomonadaceae,

tem sido amplamente difundido, como é o exemplo da *Pseudomonas putida* KT2440 uma estirpe modelo na biorremediação (YONG et al. 2014) devido a sua capacidade biodegradadora.

Assim, pelas características positivas apresentadas pelo cultivo do guandu; com o aumento cada vez mais significativo do uso de fertilizantes fosfatados e da torta de filtro nos solos; com os benefícios apresentados pelas pseudomonadas, o objetivo geral desse estudo foi avaliar a capacidade de isolados bacterianos da torta de filtro quanto à habilidade de desenvolvimento em meio com altas concentrações de Cd; capacidade de solubilização de fosfato; de produção de ácido indol acético (AIA) e pela bactéria que obteve destaque nos testes realizados, a capacidade de bioaumentar a acumulação de Cd pelas plântulas de feijão guandu.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A torta de filtro como fonte para prospecção bacteriana

A torta de filtro (TF) é um resíduo composto da mistura de bagaço moído e lodo de decantação, sendo proveniente do processo de clarificação do açúcar. Sua composição é variável, em função da variedade da cana, tipo de solo, maturação da cana, processo de clarificação do caldo e outros (ALMEIDA, 1944; NARDIN, 2007). Para cada tonelada de cana moída são produzidos cerca de 30 kg de torta. Na medida em que a torta é um lodo decantado, verifica-se a concentração de diversos metais: alumínio (Al), manganês (Mn), Zn e ferro (Fe); é também um composto orgânico (85% da sua composição) rico em cálcio (Ca), nitrogênio e potássio com composições variáveis dependendo da variedade da cana e da sua maturação. Em função de sua característica orgânica, o resíduo apresenta elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), o que causa poluição se carreado em direção aos corpos d'água (DE ANDRADE & DINIZ, 2007). Após a separação industrial, tal resíduo é acumulado em áreas ao ar livre, diretamente sobre o solo (Figura 1), para armazenamento temporário até seu destino final, na adubação da cana.



Figura 1: Torta de filtro semicomposta
Foto: Raffaella Rossetto

Durante o processo de clarificação do caldo, a adição de produtos que auxiliam na floculação das impurezas pode aumentar o teor de alguns minerais, principalmente fósforo e cálcio. Cerca de 30% do conteúdo total de fósforo aparece na forma orgânica e o nitrogênio predomina na forma proteica, propiciando lenta liberação desses elementos e conseqüentemente alto aproveitamento pelas plantas. A torta além de fornecer nutrientes às plantas, quando incorporada ao solo em grandes quantidades apresenta propriedades corretivas da acidez do solo. A matéria orgânica (MO) presente na TF traz grandes benefícios à cana-de-açúcar, dentre eles: Presença de micronutrientes; os minerais nela contidos estão menos sujeitos a lixiviação; aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) dos solos na região onde a torta foi aplicada; capacidade de reter maiores quantidades de água, que podem suprir deficiências hídricas, principalmente na brotação; propicia melhores condições físico-químicas e microbiológicas para o desenvolvimento da planta (PENATTI, 1991; NARDIN, 2007).

Ramalho e Sobrinho (2001), após avaliarem dois cambissolos com torta de filtro, verificaram que os resultados apresentaram aumentos significativos para Cd, Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Níquel (Ni) e Pb, sendo que na extração sequencial, os resultados mostraram que a maior percentagem desses elementos encontrava-se na fração residual, de baixa biodisponibilidade. Nesse contexto, a torta de filtro foi o subproduto escolhido para prospecção de bactérias resistentes ao

Cd (BRC), bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) e bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP).

2.2 O Cádmi

Os metais pesados são um grupo composto de elementos metálicos com propriedades que incluem os que são essenciais para a saúde humana como o ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn), os que são elementos traço e outros que não são essenciais e potencialmente tóxicos, especialmente se eles se acumulam, tais como mercúrio (Hg), arsênio (As), chumbo (Pb), o plutônio (Pu), vanádio (V), tungstênio (W) e cádmio (Cd) (JOHRI et al., 2010).

O Cd é um metal com uma pequena demanda biológica e pouco degradável por processos abióticos e bióticos. Esse pode ser encontrado na natureza associado a sulfetos de minérios de Zn, Cu e Pb. Ele é utilizado principalmente como anticorrosivo em aço galvanizado, já o sulfeto de cádmio e o selenito como pigmentos em plásticos e os compostos de cádmio na manufatura de pilhas e baterias recarregáveis de níquel-cádmio, em componentes eletrônicos e reatores nucleares (CETESB, 2012).

A contaminação por Cd pode resultar de fontes naturais como a atividade vulcânica, a erosão de rochas sedimentares e fosfáticas e os incêndios florestais, bem como das atividades antropogênicas, tais como mineração, indústria e agricultura. Tipicamente, o Cd do solo é facilmente incorporado em plantas comestíveis e posteriormente entra na cadeia alimentar, provocando efeitos adversos na saúde de seres humanos através do consumo dessas plantas. Esse metal em solo agrícola é um problema ambiental grave e merece atenção imediata (PRAPAGDEE et al., 2013), pois afeta fortemente as plantas em diferentes processos tais como, o crescimento, a fotossíntese, a absorção e distribuição de nutrientes, podendo levar a planta à morte celular (GALLEGO et al., 2012).

Ao manter contato com plantas, humanos e animais, o Cd causa bioacumulação, que se caracteriza pelo acúmulo de metais pesados em níveis milhares de vezes maiores que os presentes no ambiente, podendo se acumular no

corpo por um período superior a 10 anos. Assim, quando as concentrações deste metal atingem níveis acima de dez vezes do detectado naturalmente, efeitos deletérios sobre o DNA e estruturas celulares podem ser evidenciados, com danos irreversíveis (PIZZAIA, 2013)

Outro meio do Cd entrar na cadeia alimentar é através da água potável que pode ser contaminada devido à presença do metal como impureza no zinco de tubulações galvanizadas, soldas e acessórios metálicos; pela adsorção a argila ou material orgânico ou mesmo pela bioacumulação em plantas aquáticas, invertebrados, peixes e mamíferos. Concentrações elevadas, de 2 a 30 mg/kg de cádmio por peso úmido, são encontradas em moluscos e crustáceos. O pH é fator determinante para a disponibilidade do metal em solos e sedimentos; quanto maior a acidez maior a disponibilidade (CETESB, 2012). Os padrões e valores orientados para as diferentes águas estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Padrões e valores orientadores

Fonte: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cadmio.pdf>

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Solo	1,3 mg/kg*	Valor de preservação	CONAMA 420/2009
	3,0 mg/kg*	VI cenário agrícola-APMax	
	8,0 mg/kg*	VI cenário residencial	
	20 mg/kg*	VI cenário industrial	
Água potável	0,005 mg/L	Padrão de potabilidade	Portaria 2914/2011
Água subterrânea	5,0 µg/L	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
	50 µg/L	VMP (dessedentação de animais)	
	10 µg/L	VMP (irrigação)	
	5,0 µg/L	VMP (recreação)	
Águas doces	0,001 mg/L	VM (classe 1 e 2)	CONAMA 357/2005
	0,01 mg/L	VM (classe 3)	
Águas salinas	0,005 mg/L	VM (classe 1)	CONAMA 357/2005
	0,04 mg/L	VM (classe 2)	
Águas salobras	0,005 mg/L	VM (classe 1)	CONAMA 357/2005
	0,04 mg/L	VM (classe 2)	

* = massa seca; APM_{ax} = Área de Proteção Máxima; VI = Valor de investigação; VMP = Valor Máximo Permitido; VM = Valor Máximo; LMT = Limite Máximo de Tolerância.

A toxicidade por Cd foi constatada pela primeira vez em 1858 quando trabalhadores expostos ao pó de CdO (óxido de cádmio), usado na fabricação de

baterias, contraíram enfisema e proteinúria, as primeiras doenças ligando Cd à toxicidade renal (FRIBERG 1984; JOHRI et al., 2010). Após a II Guerra Mundial, uma doença óssea com fraturas e dor severa, conhecida como a doença Itai – Itai, uma forma de osteomalacia renal induzida por Cd, foi identificada no Japão. Subsequentemente, as toxicocinética e toxicodinâmica do Cd foram descritas, indicando a sua ligação à proteína metalotioneína, assim advertências internacionais de riscos para a saúde a partir da poluição pelo Cd foram emitidas na década de 1970. Em 1990, estudos epidemiológicos relataram efeitos adversos à saúde, indicando que níveis muito baixos de exposição ao cádmio pode dar origem a uma disfunção renal entre os subgrupos sensíveis das populações humanas, como as pessoas com diabetes. Atualmente, esse metal está incluído no grupo I dos carcinogênicos (NORDBERG, 2009).

Os efeitos patológicos associados à toxicidade do cádmio são, além de severos, essencialmente irreversíveis, visto que lesa praticamente todas as células do organismo, atuando por bloqueio da respiração celular e de alguns sistemas enzimáticos fundamentais. Esse metal se fixa nos pulmões, eritrócitos, baço, glândulas endócrinas e suprarrenais, fígado e rim, sendo a dose letal estimada em $1\mu\text{g/g}^{-1}$ de peso. A intoxicação aguda de Cd produz um quadro clínico característico: causa febre, cerca de quatro horas após a sua entrada no organismo, irritação nos olhos, nariz e garganta, tosse, dispnéia, fraqueza, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, e, após cerca de três dias, pode causar edema agudo no pulmão. Já na intoxicação crônica, pode-se ter o início dos sintomas anos após a exposição, havendo o aparecimento de problemas respiratórios, cáries, amarelecimento dos dentes, anorexia, fadiga, perda de peso, palidez, anemia, proteinúria e dano tubular renal seguida de osteomalácia (PLUNKETT, 1987; BRITO FILHO, 1988; SANTOS, 2011).

2.2.1 Efeito do cádmio às plantas

O Cd é um elemento não-essencial que mesmo em baixas concentrações causa danos ao crescimento e desenvolvimento das plantas e induz ao estresse

oxidativo (GRATÃO et al., 2005) . Wagner (1993) considerou que soluções de solo não poluídas possuem concentrações variando entre 0,04 e 0,32 mM de Cd. Já, solução de solo que possui concentrações de Cd variando de 0,32 a aproximadamente 1,0 mM pode ser considerada de nível moderado à poluída (SANITÁ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999; BENAVIDES, et al., 2005).

Um efeito claro da toxidez pelo Cd pode ser observado na germinação. Quando sementes são postas a germinar em ambiente com altos níveis de cádmio, a atividade das α e β amilases é significativamente reduzida, comprometendo a respiração, resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (GUIMARÃES et al., 2008).

O efeito do Cd na atividade enzimática está associado ao fato de que grande número de enzimas contém metais e a substituição destes por outro metal com mesma carga e tamanho similar, pode resultar na inibição da atividade da enzima (GUIMARÃES et al., 2008). O Cd, por sua semelhança com o Zn, pode substituí-lo nestas enzimas, resultando em alteração da atividade enzimática (SHAW et al., 2004). Segundo Kurdziel et al. (2004), em algumas espécies de plantas foi observado que o Cd modifica a estrutura da Rubisco, que é a enzima mais abundante nas plantas e por conseguinte a proteína mais abundante no planeta, resultando na dissociação desta enzima em subunidades, o que pode ser devido à substituição do magnésio pelo Cd.

As enzimas do sistema antioxidativo também são afetadas pelo Cd. A catalase (CAT), enzima antioxidativa chave, presente principalmente nos peroxissomos, têm sua atividade e o seu nível de proteína reduzidas na folha na presença de 50 μ M de Cd, concomitante ao aumento dos níveis de seu RNA mensageiro, contraste que sugere que o cádmio afeta a expressão deste gene também a nível pós- transcricional. Romero- Puertas et al. (2006), mostraram que a CAT é oxidativamente modificada pelo Cd, e as proteínas oxidadas podem ser o alvo de proteases específicas do peroxissomo (ROMERO- PUERTAS et al., 2006). As superóxido dismutases (SODs) são outro grupo de enzimas que protegem as células contra o estresse oxidativo e que são afetadas pelo Cd (GRATÃO et al., 2009; DOURADO et al., 20013)

As plantas não estressadas (em condições normais de seu metabolismo), normalmente, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a reações bioquímicas naturais da célula. Entretanto, aquelas que são colocadas em situação que podem gerar algum estresse, por exemplo, por exposição a metais pesados produzem de forma intensificada estas EROs que devem ser desintoxicadas por respostas celulares ao estresse, para que possam sobreviver e se desenvolver, devido ao fato destas EROs serem muito tóxicas (PIZZAIA, 2013). O estresse oxidativo provocado pelo efeito tóxico do Cd em plantas causa danos celulares que são irreversíveis e desencadeiam o processo de morte celular programada (GALLEGO et al., 2012; PIZZAIA, 2013). Isto pode ser reflexo da ação das EROs sobre macromoléculas levando à alteração dos ácidos nucleicos, inclusive com quebras cromossômicas (PIZZAIA, 2013).

Diante dos fatores estressores que o Cd causa às plantas, essas desenvolveram mecanismos de tolerância e adaptação, os quais envolvem processos e reações de natureza nutricional, fisiológica e bioquímica que possibilitam seu uso na recuperação de áreas com excesso de metais pesados (SOUZA et al., 2011).

2.3 Uso da fitorremediação na limpeza de solos contaminados por cádmio

Os danos causados por metais sobre o ecossistema agrícola pode, possivelmente, serem resolvidos através da utilização de plantas tolerantes que “limpam” as áreas contaminadas com metais (SINGH & PRASAD, 2011; AZEVEDO et al., 2012), radionuclídeos, bem como os poluentes orgânicos (tais como hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, bifenilos policlorados, e pesticidas) (ALI et al., 2013). Mas, para que o uso da fitorremediação seja eficiente é necessário investigar e entender como as plantas funcionam, bem como quais rotas metabólicas e genes estão envolvidos em tal processo (VERBRUGGEN et al., 2009). Os mecanismos de desintoxicação, acumulação e tolerância a Cd, tornaram-

se a base para o uso de plantas na remediação de solos contaminados por este metal (MENDOZA-CÓZALT et al., 2011).

As plantas manuseiam os contaminantes sem afetar o solo, conservando assim a sua utilidade e fertilidade (MENCH et al., 2009). Até agora, diferentes abordagens físicas, químicas e biológicas foram empregues para este propósito. Os métodos convencionais de remediação incluem a vitrificação *in situ*, a incineração do solo, escavação e aterro sanitário, lavagem do solo, nivelamento do solo, solidificação e estabilização de sistemas eletro-cinético (SHEORAN et al., 2011; WUANA & OKIEIMEN, 2011). Esses métodos sofrem limitações como alto custo, mão de obra intensiva, mudanças irreversíveis em propriedades do solo e perturbação da microflora nativa do solo, bem como podem criar problemas de poluição secundária (ALI et al., 2013). As técnicas de fitorremediação resumidas na Tabela 2, incluem fitoextração (ou fitoacumulação), fitofiltração, fitoestabilização, fitovolatilização e fitodegradação (ALKORTA et al., 2004; ALI et al. 2013).

Tabela 2: Diferentes técnicas de fitorremediação (ALI et al. 2013)

Técnica	Descrição
Fitoextração	Acúmulo de poluentes na biomassa disponível por exemplo, nos brotos
Fitofiltração	Sequestro de poluentes de águas contaminadas por plantas
Fitoestabilização	Limita a mobilidade e biodisponibilidade de poluentes no solo por raízes de plantas
Fitovolatilização	Conversão de poluentes para a forma volátil e sua posterior liberação para a atmosfera
Fitodegradação	Degradação de xenobióticos orgânicos por enzimas contidas nos tecidos das plantas
Rizodegradação	Degradação de xenobióticos orgânicos na rizosfera por micro-organismos rizosféricos
Fitodesalinização	Remove o excesso de sal de solos salinos por halófitos

2.3.1 Fitoextração

A fitoextração (também conhecida como fitoacumulação, fitoabsorção ou fitosequestração) é a absorção de contaminantes do solo ou da água pelas raízes das plantas e sua translocação para a parte aérea (SEKARA et al., 2005; YOON et

al., 2006; RAFATI et al., 2011; ALI et al., 2013). A translocação do metal para a parte aérea é um processo bioquímico crucial e é desejável para uma fitoextração eficaz, porque a colheita da biomassa radicular, geralmente não é viável (ZACCHINI et al., 2009; TANGAHU et al., 2011; ALI et al., 2013).

2.3.2 Fitofiltração

A fitofiltração é a remoção de poluentes da água contaminada, águas superficiais ou águas residuais, pelas plantas (MUKHOPADHYAY & MAITI, 2010; ALI et al., 2013). A fitofiltração pode ser rizofiltração (uso de raízes de plantas) ou blastofiltração (uso de mudas) ou caulofiltração (uso de brotos de plantas excisadas) (MESJASZ-PRZYBYLOWICZ et al., 2004; ALI et al., 2013). Em fitofiltração, os contaminantes são absorvidos ou adsorvidos e assim a sua passagem para as águas subterrâneas é minimizado (ALI et al., 2013).

2.3.3 Fitoestabilização

A fitoestabilização ou fitoimobilização é o uso de certas plantas para a estabilização de contaminantes em solos contaminados (SINGH, 2012, ALI et al., 2013). Esta técnica é usada para reduzir a mobilidade e biodisponibilidade de poluentes no meio ambiente, evitando assim a sua migração para as águas subterrâneas ou a sua entrada na cadeia alimentar (ERAKHRUMEN, 2007; ALI et al., 2013). No entanto, fitoestabilização não é uma solução permanente, pois os metais pesados permanecem no solo; apenas o seu movimento (circulação) é limitado. Na verdade, é uma estratégia de gestão para a estabilização (inativação), dos contaminantes potencialmente tóxicos (VANGRONSVELD et al., 2009, ALI et al., 2013).

2.3.4 Fitovolatilização

A fitovolatilização é a absorção de poluentes do solo por plantas, a sua conversão em forma volátil e posterior liberação para a atmosfera. Esta técnica pode ser usada para poluentes orgânicos e alguns metais pesados como o mercúrio e selênio. No entanto, seu uso é limitado pelo fato de que ele não remove o poluente completamente, somente transfere de um segmento (solo) para outro (atmosfera), onde ele pode ser depositado. A fitovolatilização é a mais controversa das tecnologias de fitorremediação (PADMAVATHIAMMA & LI, 2007; ALI et al. 2013).

2.3.5 Fitodegradação

A fitodegradação é a degradação de poluentes orgânicos por plantas com a ajuda de enzimas como a dehalogenase e oxigenase; não é dependente de microorganismos rizosféricos (VISHNOI & SRIVASTAVA, 2008, ALI et al., 2013). As plantas podem acumular xenobióticos orgânicos de ambientes poluídos e desintoxicá-los através de suas atividades metabólicas. A partir deste ponto de vista, as plantas verdes podem ser consideradas como “fígado verde” para a biosfera. A fitodegradação é limitada à remoção de poluentes orgânicos apenas porque os metais pesados não são biodegradáveis. Recentemente, os cientistas têm demonstrado o seu interesse em estudar fitodegradação de diversos poluentes orgânicos, incluindo herbicidas sintéticos e inseticidas. Alguns estudos têm relatado o uso de plantas geneticamente modificadas para este fim (DOTY et al., 2007, ALI et al., 2013).

2.3.6 Rizodegradação

A rizodegradação refere-se à quebra de poluentes orgânicos no solo por microorganismos habitantes da rizosfera (MUKHOPADHYAY & MAITI, 2010; ALI et al., 2013). A rizosfera estende-se aproximadamente 1,0 mm em torno da raiz e está sob a influência da planta (PILON-SMITS, 2005; ALI et al., 2013). A razão principal

para a alta degradação de poluentes na rizosfera é provavelmente pelo aumento no número e atividade metabólica dos microrganismos (ALI et al., 2013).

As plantas podem estimular a atividade microbiana cerca de 10-100 vezes mais na rizosfera pela secreção de exsudato com carboidratos, aminoácidos e flavonóides. A liberação de exsudatos pelas raízes das plantas fornece fontes de carbono e nitrogênio para os micro-organismos do solo e cria um ambiente rico em nutrientes, em que a atividade microbiana é estimulada. Além de secretar substratos orgânicos para facilitar o crescimento e atividade de micro-organismos rizosféricos, as plantas também liberam determinadas enzimas capazes de degradar contaminantes orgânicos em solos (KUIPER et al., 2004; YADAV et al., 2010; ALI et al., 2013).

2.4 Bactérias como facilitadoras da fitoextração de metais

Nos últimos vinte anos, os pesquisadores têm se esforçado para utilizar plantas para facilitar a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos do meio ambiente, especialmente a partir do solo. Essas abordagens de fitorremediação já percorreram um longo caminho em um curto espaço de tempo. No entanto, a maior parte deste trabalho foi realizada em condições laboratoriais controladas e não no campo. Como um complemento às várias estratégias de fitorremediação e como parte de um esforço para tornar esta tecnologia mais eficaz, um número de cientistas começou a explorar a possibilidade de utilizar várias bactérias do solo, juntamente com as plantas. Estas bactérias incluem bactérias biodegradativas, bactérias promotoras do crescimento de plantas e bactérias que facilitam a fitorremediação por outros meios (GLICK, 2010).

A fitoextração de metais que precisam ser removidos do ambiente é uma técnica complexa e suas principais limitações são (i) a biodisponibilidade do metal alvo e (ii) a capacidade das plantas para acumular metais na parte aérea (RASKIN & ENSLEY, 2000; GLICK, 2010).

Os cientistas algumas vezes tendem a aumentar a biodisponibilidade do metal através da adição de vários agentes quelantes, uma estratégia que normalmente

funciona numa pequena escala no laboratório, mas é muito menos eficaz no campo. Um grande número de plantas foi testado quanto à sua capacidade para extrair níveis elevados de metais e, em seguida, translocar os metais a partir das raízes para a parte aérea, no entanto, muitas das chamadas plantas hiperacumuladoras não produziram biomassa suficiente para tornar o processo eficiente no campo (RASKIN & ENSLEY, 2000; GLICK, 2010). Embora a utilização de bactérias do solo (geralmente de bactérias promotoras do crescimento de plantas) como auxiliares na fitorremediação de metais pode facilitar significativamente o crescimento de plantas na presença de níveis elevados (inibitórios) de metais, as bactérias normalmente pouco ou nada fazem para aumentar a biodisponibilidade do metal (GLICK, 2010).

Após a demonstração inicial de que uma bactéria promotora do crescimento em plantas e resistente ao níquel diminuiu a toxicidade do metal às plantas de canola (BURD et al., 1998), houve aumento no número de pesquisas demonstrando que as bactérias promotoras do crescimento em plantas auxiliam na fitoextração de metal (Tabela 3). Nos estudos relatados, os quais englobam uma gama de diferentes plantas, metais, solos e bactérias, o efeito da adição das bactérias foi para facilitar o crescimento das plantas e, quando os níveis inferiores menos tóxicos de metais estavam presentes, para aumentar a absorção de metal pela planta (GLICK, 2010).

As bactérias utilizadas para estes estudos são primeiramente selecionadas quanto à resistência ao metal tóxico alvo e, em seguida, elas são muitas vezes selecionadas ou testadas para presença da enzima ACC-deaminase e/ou para a capacidade de sintetizar AIA e sideróforos. Estes estudos são realizados com a expectativa de que as bactérias resistentes ao metal selecionadas serão capazes de crescer e promover o crescimento de plantas na presença de níveis elevados de metais tóxicos. Embora poucos estudos tenha identificado o (s) mecanismo (s) exato (s) da promoção do crescimento de plantas na presença do metal, a totalidade dos dados está relacionada com a presença/produção de AIA, sideróforos e ACC-deaminase. Assim, todas ou alguma dessas atividades já é suficiente para elaborar o mecanismo (GLICK, 2010).

Além da presença/produção dos facilitadores acima citados, alguns pesquisadores associam a eficácia da fitoextração do metal, à presença de um

sistema de solubilização de fosfato ativo na bactéria. (SHENG et al., 2008a; GLICK, 2010).

Tabela 3: Combinações de plantas-bactérias em vários estudos de fitorremediação de metal (GLICK, 2010)

Bactéria	Planta(s)	Metal(is)	Efeito/Mecanismo	Referência
<i>Kluyvera ascorbata</i> SUD165	Canola (<i>Brassica napus</i>)	Níquel	Aumenta biomassa; ACC deaminase	BURD et al., 1998
<i>K. ascorbata</i> SUD165, SUD165/26	Canola, tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>), Mostarda Indiana (<i>Brassica juncea</i>)	Níquel, Chumbo, Zinco	Aumenta biomassa; ACC deaminase, sideróforos	BURD et al., 2000
Bactéria rizosférica	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zinco	Aumenta captação de zinco; mecanismo desconhecido	WHITING et al., 2001
<i>Enterobacter cloacae</i> CAL2	Canola	Arsênio	Aumento biomassa; ACC deaminase	NIE et al., 2002
<i>Brevibacillus</i> sp.	Trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>)	Chumbo	Diminui a captação de chumbo; AIA	VIVAS et al., 2003
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	<i>Alyssum murale</i>	Níquel	Aumenta a captação de níquel; mecanismo desconhecido	ABOU-SHANAB et al., 2003
Bactéria rizosférica e endofítica	<i>Thlaspi goesingense</i>	Níquel	ACC deaminase, sideróforos	IDRIS et al., 2004
<i>Pseudomonas aspleni</i> AC	Canola	Cobre	Aumenta biomassa; AIA	REED e GLICK, 2005
<i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp.	Mostarda indiana	Cádmio	Aumenta o comprimento da raiz; AIA, sideróforos, ACC deaminase	BELIMOV et al., 2005
<i>P. putida</i> KNP9	Feijão (<i>Vigna radiata</i>)	Cádmio, Chumbo	Aumenta biomassa e diminui a captação de metal; sideróforos	TRIPATHI et al., 2005
Bactéria rizosférica	<i>Graminaceae</i> grasses	Cádmio, Zinco, Níquel	AIA, sideróforos, ACC deaminase	DELL'AMICO et al., 2005
<i>Pseudomonas</i> sp. A4, <i>Bacillus</i> sp. 32	Mostarda indiana	Cromo	Aumento do comprimento da raiz e parte aérea; AIA, sideróforos, solubilização de fosfato	RAJKUMAR et al., 2006

Bactéria	Planta(s)	Metal(is)	Efeito/Mecanismo	Referência
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Arsênio	Aumento do desenvolvimento; mecanismo desconhecido	SHILEV et al., 2006
<i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>	Canola	Níquel	Aumenta germinação semente e desenvolvimento; mecanismo desconhecido	ASHOUR et al., 2006
<i>P. putida</i> 06909	Girassol	Cádmio	O aumento da absorção de cádmio e toxicidade diminuída; bactéria expressa um peptídeo de ligação a metais	WU et al., 2006a
<i>P. putida</i> UW4, <i>P. putida</i> HS-2	Canola	Níquel	Aumenta a biomassa no campo; AIA, ACC deaminase	FARWELL et al., 2006
<i>P. brassicacearum</i> AM3, <i>P. marginalis</i> Dp1	Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	Cádmio	Aumenta a biomassa e captação de nutrientes; ACC deaminase	SAFRANOV A et al., 2006
<i>Sinorhizobium</i> sp. Pb002	Mostarda indiana	Chumbo	Aumenta a sobrevivência da planta e captação de chumbo; ACC deaminase	DI GREGORIO et al., 2006
<i>Azotobacter chroococcum</i> HKN-5 + <i>B. megaterium</i> HKP-1 + <i>B. mucilaginosus</i> HKK-1	Mostarda indiana	Zinco, cobre, chumbo, cádmio	Aumenta a biomassa e a biodisponibilidade do metal	WU et al., 2006b
<i>B. subtilis</i> SJ-101	Mostarda indiana	Níquel	Aumenta a captação de níquel; AIA, solubilização de fosfato	ZAIDI et al., 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. RJ10, <i>Bacillus</i> sp. RJ16	Canola	Cádmio	Aumenta biomassa e captação de metal; AIA	SHENG e XIA, 2006
Nove diferentes cepas de bactérias resistentes ao níquel	<i>Alyssum murale</i>	Níquel	Aumenta a captação de metal; mecanismo desconhecido	ABOU-SHANAB et al., 2006
<i>P. diminuta</i> , <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Nitrobacteria iranicum</i> , <i>Ochrobacterum anthropi</i> , <i>B. cereus</i>	Aguapé (<i>Eichhornia crassipes</i>)	Cromo	Aumenta a captação de metal; mecanismo desconhecido	ABOU-SHANAB et al., 2007
<i>Mesorhizobium huakuii</i> subsp. <i>rengei</i> B3	<i>Astragalus sinicus</i>	Cádmio	Aumento da	IKE et al.,

Bactéria	Planta(s)	Metal(is)	Efeito/Mecanismo	Referência
			acumulação de metais; bactéria expressa fitoquelatina e metalotioneína	2007
<i>P. putida</i> ARB86	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Níquel	Aumenta biomassa e conteúdo de clorofila	SOMEYA et al., 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp. RM8	Feijão Mung (também conhecida como grama verde)	Níquel, zinco	Aumenta o número de nódulos e nutrição da planta; AIA, sideróforos	WANI et al., 2007
<i>Rhizobium</i> sp. RP5	Ervilha	Níquel, zinco	Aumenta o número de nodules e a nutrição da planta, AIA, sideróforos	WANI et al., 2008
<i>Burkholderia</i> sp. J62	Mostarda indiana, milho (<i>Zea mays</i>), tomate	Chumbo, cádmio	Aumenta a biomassa e captação metal; AIA, sideróforos, ACC deaminase	JIANG et al., 2008
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. biosubtyl</i> , <i>B. thurnigiensis</i>	Mostarda indiana	Selênio, cádmio, cromo	Maior captação de metal dependendo da combinação específica de metal-bactérias; mecanismo desconhecido	HUSSEIN, 2008
<i>Enterobacter</i> sp. NBRI K28	Mostarda indiana	Níquel, zinco, cromo	O aumento da biomassa e absorção de metais; AIA, sideróforos, ACC deaminase, solubilização de fosfato	KUMAR et al., 2008
<i>P. putida</i> HS-2	Canola	Níquel	Aumento da germinação de sementes e biomassa; sideróforos, AIA, deaminase ACC	RODRIGUEZ et al., 2008
<i>Bacillus</i> sp. J119	Canola, milho, capim sudão (<i>Sorghum vulgare</i> var. <i>sudanense</i>) tomate	Cádmio	Alguns aumento da biomassa e captação de cádmio, AIA, sideróforos, produção de biossurfactante	SHENG et al., 2008a
<i>P. aeruginosa</i> MKRh3	Grama preta (<i>Vigna</i>	Cádmio	Aumento da	GANESAN,

Bactéria	Planta(s)	Metal(is)	Efeito/Mecanismo	Referência
	<i>mungo</i>)		biomassa e enraizamento, e diminuição da absorção de cádmio; AIA, sideróforos, ACC deaminase, solubilização de fosfato	2008
<i>Pseudomonas</i> sp. 29C, <i>Bacillus</i> sp. 4C	Mostarda indiana	Níquel	Increased biomass; IAA, siderophores, ACC deaminase, phosphate solubilization	RAJKUMAR e FREITAS, 2008a
<i>Pseudomonas</i> sp. M6, <i>Pseudomonas jessenii</i> M15	Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	Níquel, cobre, zinco	Aumento da biomassa; AIA, sideróforos, ACC deaminase, solubilização de fosfato	RAJKUMAR e FREITAS, 2008b
<i>Proteus vulgaris</i> KNP3	Feijão guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	Cobre	Aumento da germinação, biomassa e clorofila, e diminui a absorção de metais; mecanismo desconhecido	RANI et al., 2008
10 diferentes bactérias rizosféricas	<i>Salix caprea</i>	Cádmio, zinco	Maior captação de metal; AIA, sideróforos, ACC deaminase não estão envolvidas	KUFFNER et al., 2008
<i>Pseudomonas</i> sp.	Grão de bico (<i>Cicer arietinum</i>)	Níquel	O aumento da biomassa e diminuição da absorção de metais; sideróforos	TANK e SARAF, 2008
<i>P. fluorescens</i> G10, <i>Microbacterium</i> sp. G16	Canola	Chumbo	O aumento da biomassa e absorção de metais; AIA, sideróforos, ACC deaminase, ambas as linhagens são endófitas	SHENG et al., 2008b
<i>Bacillus edaphicus</i> NBT	Mostarda indiana	Chumbo	Aumento da biomassa; AIA, sideróforos, ACC deaminase	SHENG et al., 2008c

Bactéria	Planta(s)	Metal(is)	Efeito/Mecanismo	Referência
<i>Pseudomonas</i> sp. RJ10, <i>Bacillus</i> sp. RJ16	Tomate	Cádmio, chumbo	Aumento do comprimento da raiz; sideróforos, AIA, ACC deaminase	HE et al., 2009
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Orychophragmus violaceus</i>	Zinco	Aumento do comprimento da raiz, da biomassa, a captação de metal; mecanismo desconhecido	HE et al., 2010
<i>Streptomyces tendae</i> F4	Girassol	Cádmio	Diminuição da absorção de metal e aumento do teor de ferro; sideróforos	DIMPKA et al., 2009
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> Ax10	Mostarda indiana	Cobre	Aumento da raiz e comprimento da parte aérea e biomassa; ACC deaminase, solubilização de fosfato, AIA	MA et al., 2009
<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Rahnella aquatilis</i>	Mostarda indiana	Níquel, cromo	Aumento da biomassa e absorção de metais; AIA, sideróforos, ACC deaminase, solubilização P	KUMAR et al., 2009

2.5 Bactérias produtoras de auxina (ácido 3-indol acético, AIA)

O fitormônio auxina (do grego "auxein", que significa crescer) regula todos os processos relacionados ao desenvolvimento da planta, como já descrito há anos por vários autores. Talvez menos conhecido, seja o fato de que alguns microorganismos também produzem auxina (COSTACURTA & VANDERLEYDEN 1995; PATTEN & GLICK, 1996). A produção de fitormônios (principalmente auxinas e citocininas) em culturas de vida livre é um marco para muitas bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas agglomerans*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P.*

syringae pv. *syringae*, *Rhodococcus solanacearum* e *R. fascians* (MORRIS, 1995; VANDEPUTTE et al., 2005; VALLS et al., 2006; SPAEPEN & VANDERLEYDEN 2011). A produção de AIA tem sido relatada para muitas bactérias, sendo assumido que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de sintetizar AIA (PATTEN & GLICK, 1996; KHALID et al., 2004). O principal precursor para a síntese de AIA é o triptofano e com sua adição ao meio de cultura ocorre uma maior produção da auxina, facilitando assim sua quantificação. A biossíntese de triptofano é codificada pelos genes *trp*. A partir do triptofano, pelo menos, cinco vias diferentes têm sido descritas para a síntese de AIA, e a maioria dos percursos mostram semelhança com as descritas em plantas, embora alguns intermediários possam diferir (PATTEN & GLICK 1996; WOODWARD & BARTEL 2005; SPAEPEN et al., 2007).

As vias biossintéticas do AIA vêm sendo identificadas utilizando vários métodos genéticos e bioquímicos. No entanto, nem todos os genes, enzimas codificadas e intermediárias foram caracterizados. O uso de experiências de alimentação com precursores marcados em combinação com a identificação de intermediários tem sido uma fonte principal para a identificação de vias biossintéticas. As vias descritas na literatura encontram-se ilustradas na Figura 2 e são nomeadas de acordo com o intermediário de determinada via. Em vários micro-organismos estudados, a redundância das vias biossintéticas do AIA foi observada, o que significa que múltiplas vias estão presentes e ativas em um único micro-organismo. Esta observação foi baseada principalmente em estudos de “knockout” (nocaute) onde alguma produção de AIA ainda pôde ser observada após a inativação de uma via (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

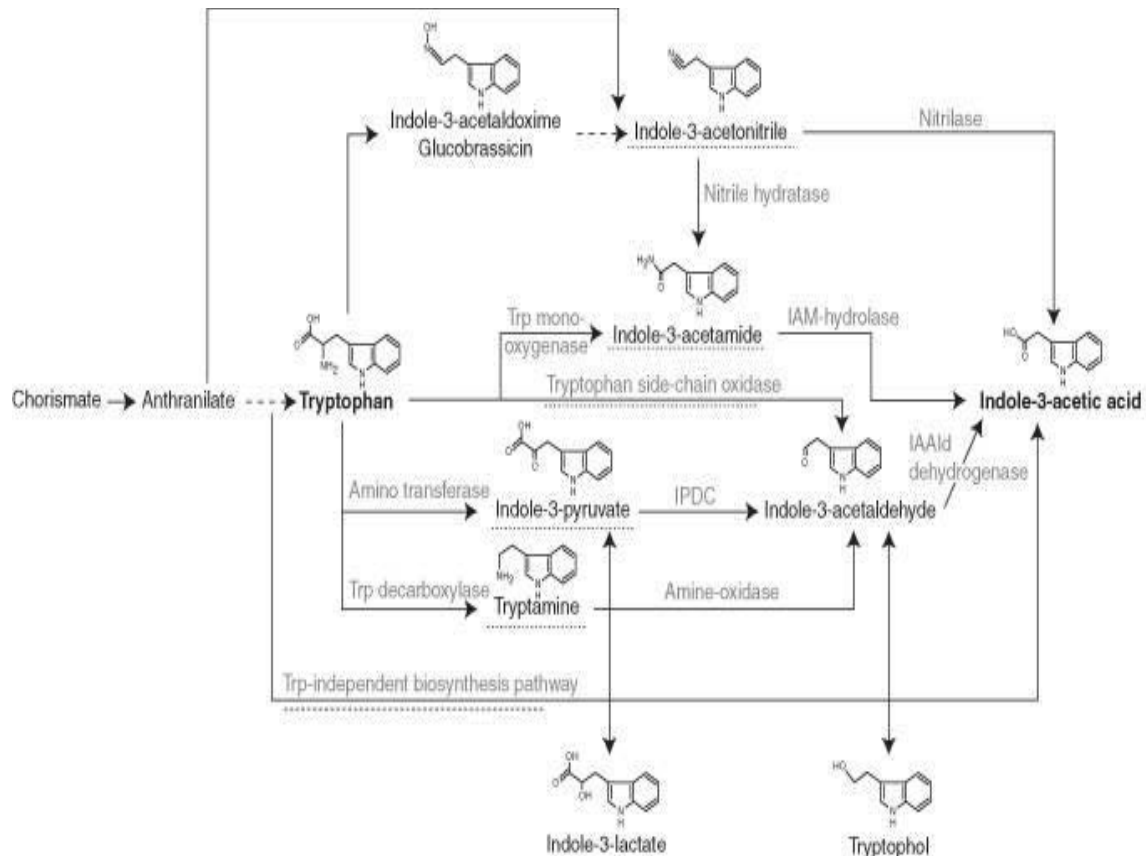


Figura 2: Visão geral das vias biossintéticas do AIA em bactérias. As linhas tracejadas referem-se às vias nomeadas a partir de um intermediário. IAAld, indol-3-acetaldeído; IAM (indol-3-acetamida), indol-3-acetamida; IPDC, indol-3-piruvato-descarboxilase; Trp triptofano. Adaptado de Spaepen & Vanderleyden (2011).

As análises de mutantes na via biossintética de triptofano, mostraram que as plantas são capazes de sintetizar o AIA sem o precursor triptofano, e o ponto de ramificação para esta via independente do triptofano surge em indol-3-glicerol fosfato ou indol (LAST et al., 1991; NORMANLY et al., 1993). No entanto, não há genes ou proteínas envolvidas nesta via identificados em plantas (WOODWARD & BARTEL, 2005). Em bactérias, uma via independente de triptofano foi sugerida em *Azospirillum brasilense* a partir do fornecimento de triptofano marcado (PRINSEN et al., 1993). No entanto, também neste caso, não houve evidência genética ou bioquímica consistente para esta via (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

A auxina está envolvida em muitos processos de formação de nódulos por rizóbios em leguminosas, como a especificação de células fundadoras (inibição do



transporte de auxina principalmente por flavonóides), iniciação nodular e diferenciação (acúmulo de auxina), formação de feixe vascular e números de nódulos (transporte da auxina de longa distância). Pelo fato de muitos rizóbios serem capazes de produzir AIA através de diferentes vias, admite-se que a auxina produzida por bactérias pode alterar o equilíbrio da auxina no interior da planta (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

Após a inoculação de plantas com bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP), uma mudança na arquitetura do sistema radicular foi observada, principalmente, como um aumento de pêlos radiculares e raízes laterais. Em geral, a superfície radicular aumenta, levando a uma maior absorção de minerais do solo e exsudados da raiz (estimulando ainda mais na colonização da raiz por BPCP). Há décadas, essas mudanças morfológicas da raiz têm sido atribuídas à produção de auxina bacteriana, e estudos com mutantes alterados na produção de AIA confirmam a importância do seu papel. O crescimento das plantas a partir do efeito promotor das bactérias, para o qual foi demonstrado que a auxina está envolvida, é conhecido como fitoestimulação (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

Na "hipótese de aditivo", foram sugeridos que vários mecanismos, tal como a solubilização de fosfato juntamente com a biossíntese de AIA são responsáveis pela promoção do crescimento de plantas e conseqüentemente pelo aumento da produtividade (BASHAN & HOLGUÍN, 1997; SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011).

2.6 Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF)

O fósforo (P) é um elemento chave mais importante na nutrição das plantas, ao lado do nitrogênio (N). Ele desempenha um papel importante em praticamente todos os principais processos metabólicos na planta, incluindo a fotossíntese, transferência de energia, transdução de sinal, a biossíntese de macromoléculas e respiração (KHAN et al., 2010) e fixação de nitrogênio em leguminosas (SABER et al., 2005). Embora o P seja abundante em solos em ambas as formas inorgânicas e orgânicas, ele se torna um importante fator limitante para o crescimento das plantas, pois aparece de uma forma indisponível para a absorção radicular. O P inorgânico

ocorre no solo, principalmente em complexos de minerais insolúveis, alguns deles aparecendo após a aplicação frequente de fertilizantes químicos. Essas formas insolúveis precipitadas não podem ser absorvidas pelas plantas (RENGEL & MARSCHNER, 2005). A matéria orgânica também é um importante reservatório de P imobilizado que é responsável por 20-80% do P em solos (RICHARDSON, 1994). Apenas 0,1% da quantidade total de P está numa forma solúvel disponível para a absorção pelas plantas (ZHOU et al., 1992). O termo fixação do P é utilizado para descrever as reações que removem o fosfato disponível a partir da solução do solo para a fase sólida do solo (BARBER, 1995). O uso de inoculantes microbianos (biofertilizantes) que possuem atividade solubilizadora de P em solos agrícolas é considerado como uma alternativa ambientalmente correta (SHARMA et al., 2013). Os microrganismos são componentes importantes do ciclo de P e para a transferência de P entre os diferentes “pools” de P no solo. Os micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSB), através de vários mecanismos de solubilização e mineralização são capazes de converter P inorgânico e orgânico do solo (KHAN et al., 2009) na forma biodisponível facilitando a absorção pelas raízes das plantas (SHARMA et al., 2013).

A solubilização de P insolúvel por micro-organismos foi relatada por Pikovskaya (1948). Durante as últimas duas décadas o conhecimento sobre MSP aumentou significativamente (RICHARDSON 2001; RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). Várias bactérias e fungos foram descritos e estudados quanto às capacidades de solubilização de fosfato (GLICK, 1995; HE, et al. 1997.). Esses micro-organismos foram isolados utilizando os procedimentos culturais já utilizados por espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* (ILLMER & SCHINNER, 1992). Esses organismos são ubíquos, mas variam em densidade, dependendo da solubilização do fosfato mineral (sfm), do solo ou do sistema de produção. No solo, as bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) constituem 1-50% e fungos 0,1-0,5% da população microbiana total. Esses micro-organismos geralmente são isolados da rizosfera, solos não rizosférico, rizoplano, filosfera, rochas fosfatadas e até mesmo de solos estressados, utilizando o método de diluição em série em placas ou pela técnica de enriquecimento de cultura de (ZAIDI et al., 2009). Desde 1948, quando Pikovskaya sugeriu que micro-organismos podem dissolver formas não disponíveis de P no solo e que esses

desempenham um papel importante no fornecimento de P às plantas, vários métodos e meios, tais como Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948), método do corante azul de bromofenol (GUPTA et al., 1994) e National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) meio (NAUTIYAL, 1999) têm sido propostos. Ambas as estirpes bacterianas e fúngicas que exibem atividade solubilizante de P são detectadas pela formação de um halo claro (um sinal de solubilização) em torno das suas colônias. A produção de um halo sobre um meio de cultura sólido não deve ser considerado como o único critério para avaliar a solubilização de P, outras técnicas devem ser adotadas na ausência do halo, bem como para dar maior credibilidade ao teste (BASHAN et al., 2013).

Um número substancial de espécies microbianas exibe a capacidade de solubilizar P; estes incluem bactérias, fungos, actinomicetos e até mesmo algas. Além de *Pseudomonas* e *Bacillus*, outras bactérias como *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Delftia* sp. (WANI et al., 2005; CHEN et al., 2006), *Azotobacter* (KUMAR et al., 2001), *Xanthomonas* (DE FREITAS et al., 1997), *Enterobacter*, *Pantoea*, e *Klebsiella* (CHUNG et al., 2005), *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* (VAZQUEZ et al., 2000), têm sido classificadas como BSF.

Tabela 4: Importantes micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSP), seus nichos ecológicos e ácidos orgânicos produzidos (SHARMA et al., 2013), doi:10.1186/2193-1801-2-587

Organismo	Nicho(s) ecológico	Ácido produzidos	Referências
BSF	Solos e rochas de fosfato	ND(não determinado)	PIKOVSKAYA 1948
BSF	Solo rizosférico	ND(não determinado)	GERRETSON 1948
<i>Escherichia freundii</i>	Solo	Láctico	SPERBER 1958a, b
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Solo	Cítrico, glicólico, succínico, glucónico,	SPERBER 1958a, b

Organismo	Nicho(s) ecológico	Ácido produzidos	Referências
		oxálico, láctico	
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Solo rizosférico	Láctico, Málico	TAHA et al. 1969
<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus firmus B-7650</i>	Rizosfera de trigo e feijão caupi	Láctico, cítrico	BAJPAI & SUNDARA RAO 1971
<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Chaetomiumnigricolor</i>	Solo laterítico	Oxálico, Succínico, Cítrico, 2- cetoglucônico	BANIK AND DEY 1983
<i>A. japonicus</i> , <i>A. foetidus</i>	Fosfato de rocha indiana	Oxálico, cítrico, glucônico succínico, tartárico	SINGAL et al. 1994
<i>P. radicum</i>	Rizosfera de raízes de trigo	Glucônico	WHITELAW et al. 1999
<i>Enterobacteragglomerans</i>	Rizosfera de trigo	Oxálico, cítrico	KIM et al. 1997
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>Penibacillus macerans</i> , <i>Vibrio proteolyticus</i> , <i>xanthobacter agilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i> , <i>Pseudomonas aerogenes</i> , <i>Chryseomonas Luteola</i>	Manguezal	Láctico, itacônico, isovalérico, isobutírico, acético	VAZQUEZ et al. 2000
<i>Penicillium rugulosum</i>	Rochas venezuelanas de fosfato	Cítrico, glucônico	REYES et al. 2001
<i>Enterobacter intermedium</i>	Rizosfera de capim	2-cetoglucônico	HWANGBO et al. 2003
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicilliumcanescens</i>	Grãos de trigo armazenados	Oxálico, cítrico, glucônico succínico	MALIHA et al. 2004

Organismo	Nicho(s) ecológico	Ácido produzidos	Referências
<i>P.fluorescens</i>	Fragmentos de raízes e rizosfera de dendezeiros	Cítrico, málico, tartárico, glucônico	FANKEM et al. 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Solo tropical e subtropical	Glucônico, oxálico	CHUANG et al. 2007
<i>P.trivialis</i>	Rizosfera de <i>Hippophae hamnoides</i> deserto gelado de Lahaul e Spiti no trans-Himalayas	Láctico, fórmico	VYAS & GULATI 2009
<i>B.pumilus</i> var.2; <i>B.subtilis</i> var.2; <i>Actinomadura oligospora</i> ; <i>Citrobacter</i> sp.	Cacto gigante (<i>P.pringlei</i>) crescimento na antiga lava	Glucônico, Propiônico, Isovalérico, Heptônico, Capróico, Isocapróico, Fórmico, Valérico, Succínico, Oxálico, Oxalacético, Malônico.	PUENTE et al. 2004a
<i>B.pumilus</i> CHOO8A; <i>B.fusififormis</i>	Cacto(<i>Opuntia Cholla</i>)		PUENTE et al. 2004a
<i>Bacillus</i> sp. SENDO 6 and	Cacto gigante (<i>P.pringlei</i>)	Glucônico, Propiônico, Isovalérico, Fórmico, Succínico, Láctico.	PUENTE et al. 2009a, b
<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA, <i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe, e <i>Bacillus megaterium</i> M1PCa	Cacto selvagem Mammillaria fraileana		LOPEZ et al. 2011

Além de tornar o P solúvel acessível para absorção pelas plantas, tem havido uma série de relatos sobre a capacidade de promover o crescimento vegetal por

esses micro-organismos (GAUR & OSTWAL 1972). Vários MSP foram utilizados para promover o crescimento de várias culturas (Tabela 5).

Tabela 5: Promoção do crescimento de plantas por micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) (PATIL et al., 2002; SHARMA et al., 2013)

MSF Bioinoculante	Cultura beneficiada
<i>B. firmus</i> NCIM 2636	“Paddy” em solos ácidos
<i>G. faciculatum</i>	Banana
<i>B. megaterium</i> + <i>G. faciculatum</i>	Banana
Phosphobacterium	Variedade de feijão espada SBS 1
<i>P. Striata</i>	Soja em solo arenoso de aluvião
<i>P. Striata</i>	Grão de bico

Dentre vários gêneros bacterianos citados nessa revisão, foi possível observar a enorme habilidade que o gênero *Pseudomonas* possui para o uso em fitorremediação, promoção do crescimento vegetal e solubilização de fosfato. A seguir, compreenderemos melhor as peculiaridades deste gênero.

2.7 A versatilidade do gênero *Pseudomonas*

Membros do gênero *Pseudomonas* (*stricto sensu*) mostram notável versatilidade metabólica e fisiológica, permitindo a colonização de diversos habitats terrestres e aquáticos (PALLERONI, 1992), e são de grande interesse devido à sua importância em doenças de plantas e humanas, e seu potencial de crescimento em aplicações biotecnológicas (Figura 3). Desde que o gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez, a atribuição às espécies dentro do gênero tem sido controverso (SILBY et al., 2011). Stanier et al. (1966) publicou um balanço completo da taxonomia de *Pseudomonas* spp., em grande parte determinado por fenótipos e

capacidades bioquímicas (SILBY et al., 2011). A resolução da sua estrutura intragenérica usando hibridação DNA-DNA (HDD), a análise das sequências de genes de rRNA e de “housekeeping” e sequenciamento multilocus (PALLERONI et al., 1973; MOORE et al., 1996; MAIDEN et al., 1998; GARDAN et al., 1999; ANZAI et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2000; GORIS et al., 2007) têm ajudado na definição taxonômica e reorganização das espécies (PALLERONI & MOORE, 2004). Baseados principalmente em dados de estudos moleculares as estirpes que se pensava pertencer a *Pseudomonas stricto sensu* (na subclasse *Gamma* de *Proteobacteria*) foram separadas do gênero e colocadas nos gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Comamonas* (*Betaproteobacteria*) (KERSTERS et al., 1996).

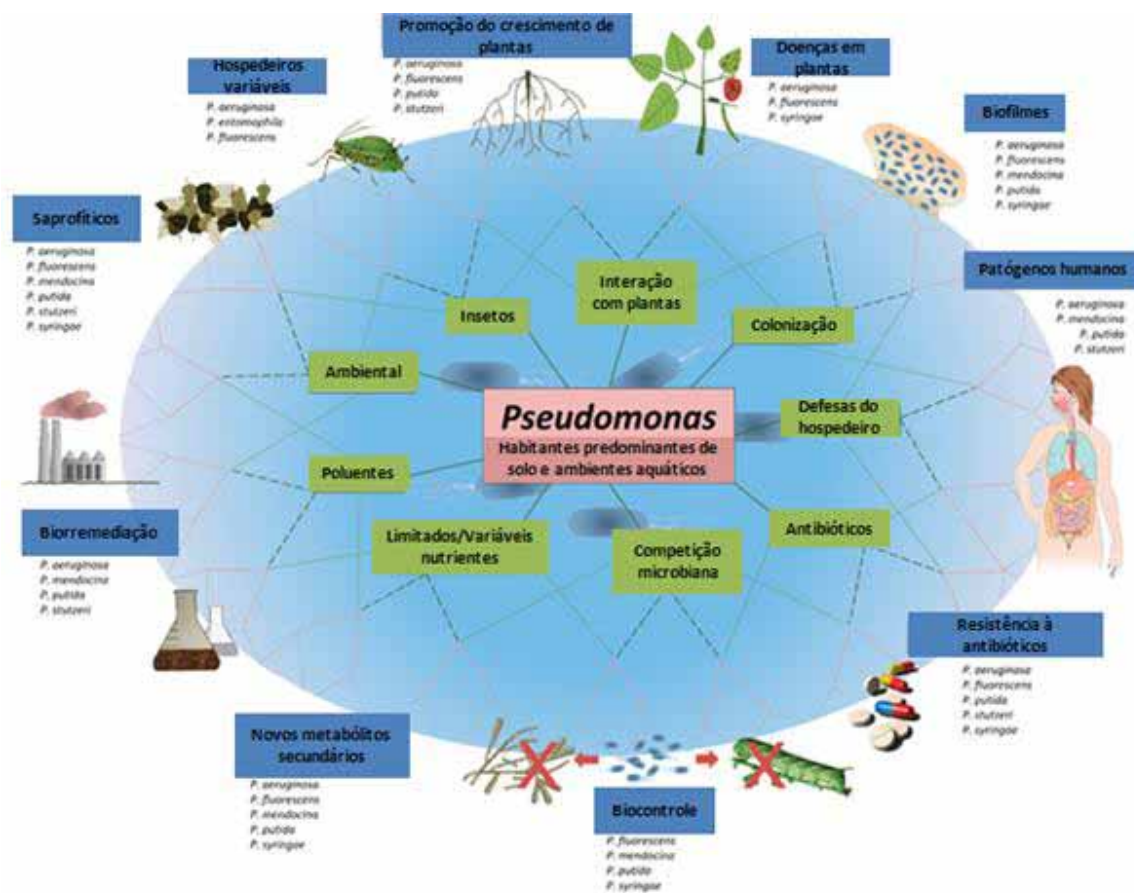


Figura 3: A variedade funcional e ambiental de *Pseudomonas* spp. O ancestral comum do *Pseudomonas* encontrou uma gama de ambientes abióticos e bióticos que levou à evolução de uma infinidade de traços e estilos de vida com uma sobreposição significativa entre as espécies (SILBY et al. 2011)

As pseudomonadas veem sendo relatadas devido sua capacidade de trocar informações genéticas através de transferência horizontal de genes (THG), através de fagos, plasmídeos, transposons e ilhas genômicas (IG), auxiliando na disseminação, bem como na evolução de novas vias metabólicas diversificadas (SILBY et al., 2011; PALIWAL et al., 2014). Estes processos permitem a sobrevivência prolongada de recursos genéticos. Destes elementos genéticos móveis (EGM), IG, especialmente, têm sido relatadas por codificar genes relacionados à versatilidade metabólica, patogenicidade e resistência a metais pesados pelos micro-organismos (BOIDY et al., 2009; JUHAS et al., 2009; PALIWAL et al., 2014). Essas capacidades poderiam ser exploradas através da bioaumentação genética na reprodução *in situ* da população nativa, que não só garante a sobrevivência de novos determinantes genéticos, mas também ajuda a melhorar a biorremediação (PALIWAL et al., 2014).

Muitas pseudomonadas interagem com plantas e diversas espécies contribuem para a saúde da planta antagonizando micro-organismos fitopatogênicos de plantas (controle biológico) e influenciando diretamente a resistência a doenças de plantas e crescimento (promoção de crescimento vegetal) - ambos como endófitos de plantas (RYAN et al., 2008.) e como colonizadoras rizosféricas (HAAS & DEFAGO, 2005). Muitos metabólitos secundários produzidos por diferentes linhagens de *Pseudomonas* foram detectados e investigados por causa de sua atividade antimicrobiana (LEISINGER & MARGRAFF, 1979; SILBY et al., 2011).

A biorremediação utiliza micro-organismos para degradar ou descontaminar áreas com metais pesados. A versatilidade nutritiva excepcional das pseudomonas, juntamente com a produção de biosurfactantes capazes de mobilizar hidrocarbonetos líquidos em fase não aquosa para uma fase aquosa (DESAI & BANAT, 1997), são fatores que as tornam excelentes candidatas para a biorremediação (SILBY et al., 2011).

Pseudomonas aeruginosa é freqüentemente isolada em solos e águas subterrâneas contaminadas por petróleo (RIDGWAY et al., 1990). *Pseudomonas putida* foi estudada extensivamente em biotecnologia ambiental por causa de suas capacidades na biorremediação de resíduos orgânicos tóxicos, incluindo compostos de hidrocarbonetos aromáticos (LOH & CAO, 2008). Outras espécies de

Pseudomonas identificadas com propriedades de biorremediação incluem *P. mendocina* (WHITED & GIBSON, 1991) e *P. stutzeri* (GRIMBERG, 1996). *Pseudomonas fluorescens* são geralmente consideradas como comensais de plantas e têm sido estudadas por suas propriedades de biocontrole e promoção de crescimento vegetal (HAAS & DEFAGO, 2005). *Pseudomonas putida* KT2440 é uma bactéria do solo que se associa às plantas, a qual despertou interesse biotecnológico devido suas propriedades de biodegradação (SILBY et al., 2011).

Devido às diversas propriedades benéficas apresentadas pelos microorganismos e pelo pouco conhecimento da microbiota habitante da torta de filtro, utilizamos o *gene 16S* que é atualmente, o alvo mais importante de estudo em ecologia bacteriana (VĚTROVSKÝ & BALDRIAN, 2013) e a isoenzima α -esterase para caracterizar e identificar os isolados bacterianos desse subproduto do setor agroenergético.

2.8 O uso do gene 16S rRNA e da isoenzima α -esterase na identificação bacteriana

Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS & BARTHA, 1998; PEDRINHO, 2009). Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Estas regiões conservadas estão alternadas entre 9 regiões variáveis (V1 a V9).

Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Os genes dos rRNA em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais, grandes porções nos genes rRNA são bem conservadas e suas sequências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. Variações nas sequências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises

do gene 16S rRNA revelaram separação dos domínios Bactéria, Archaea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionam uma ideia de evolução em grande escala; quando vista desta maneira mostram a importância dos micro-organismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (ATLAS & BARTHA, 1998; PEDRINHO, 2009).

O gene 16S rRNA é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos (WOESE et al. 1987; PAIXÃO, 2009). Esse gene vem sendo amplamente utilizado na elucidação da diversidade e filogenia dos microrganismos. Este marcador é tão seguro e aceito pela comunidade científica que um banco de dados específicos para o gene 16S rRNA, o Ribosomal Database Project (RDP) foi criado e encontra-se disponível para pesquisa e consulta no endereço: <http://rdp.cme.msu.edu/> (COLE et al. 2014)

Assim como o 16S, a utilização das isoenzimas tem desempenhado papel importante na caracterização e identificação de diversas espécies, principalmente dos indivíduos pertencentes a uma mesma espécie, como no caso das variedades. De maneira simplificada, as isoenzimas podem ser consideradas variações de uma dada enzima dentro de um organismo, que apresentam uma mesma especificidade de substrato. Assim sendo, a variação específica em número, composição e atividade das isoenzimas em cada sistema enzimático, permite a diferenciação entre variedades (LARSEN, 1969).

Várias são as enzimas utilizadas para caracterização e identificação de diversas espécies, tais como: *esterases*, *superóxido dismutase*, *álcool desidrogenase*, *glicose - 6 - fosfato desidrogenase*, entre outras. As funções de cada enzima variam, sendo as *esterases* enzimas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster de uma grande variedade de substratos, estas são classificadas em α -esterases, β -esterases e C-esterases (BASTOS, 2001).

A partir da inferência dada por essas e por outras técnicas moleculares, várias bactérias promotoras do crescimento de plantas, solubilizadoras de fosfato e resistentes a metais pesados, já foram descritas em diferentes ambientes. Nesse estudo, utilizamos esses marcadores moleculares para identificar bactérias isoladas da torta de filtro, um subproduto do setor agroenergético.

2.9 Feijão guandu (*Cajanus cajan*): uma planta multiuso

O feijão guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae, uma leguminosa arbustiva anual ou semiperene é uma cultura importante para diversos países dos trópicos e subtropicos, principalmente os países asiáticos e africanos. A sua origem ainda é motivo de controvérsia, divergindo entre o Continente Africano e a Índia (NENE & SHEILA, 1990; VAN DER MAESEN, 1990). Esta leguminosa foi introduzida no Brasil provavelmente pela rota dos escravos, nos navios negreiros procedentes da África, tornando-se largamente distribuída e seminaturalizada na região tropical (SEIFFERT & THIAGO, 1983).

O *Cajanus cajan* possui os seguintes nomes comuns nos mais variados lugares do globo: Guandul, paraguayo, sachacafé, falso café, arveja (Argentina), feijão guandu, guandu (Brasil), quinchoncho (Venezuela), frijol de árbol (México), cumandái (Paraguai), red gram, tur, arhar, dahl (Índia), pigeon pea (Austrália), pois d'angole (países de língua francesa), puerto rican bean, pigeon pea (Havaí) (Azevedo et al., 2007)

Encontrada com frequência em todo o Brasil, esta leguminosa pode ser observada principalmente nos quintais domésticos de muitas cidades do interior. Esta popularidade está relacionada com a palatabilidade de seus grãos verdes, podendo substituir ervilhas enlatadas. Seus grãos secos podem ser empregados da mesma forma que o feijão comum para o consumo humano, além de serem avidamente consumidos por aves domésticas (SEIFFERT & THIAGO, 1983).

Com utilização bastante diversificada, a cultura do feijão guandu pode ser usada para os mais diversos fins: como planta melhoradora de solos, na recuperação de áreas degradadas, como planta fitorremediadora, na renovação de pastagens, na alimentação de animais domésticos e da pecuária, também largamente utilizada na alimentação humana (AZEVEDO et al., 2007) por apresentar na sua composição um elevado teor proteico, semelhante a outras leguminosas e por sua composição ser rica em aminoácidos, semelhante ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

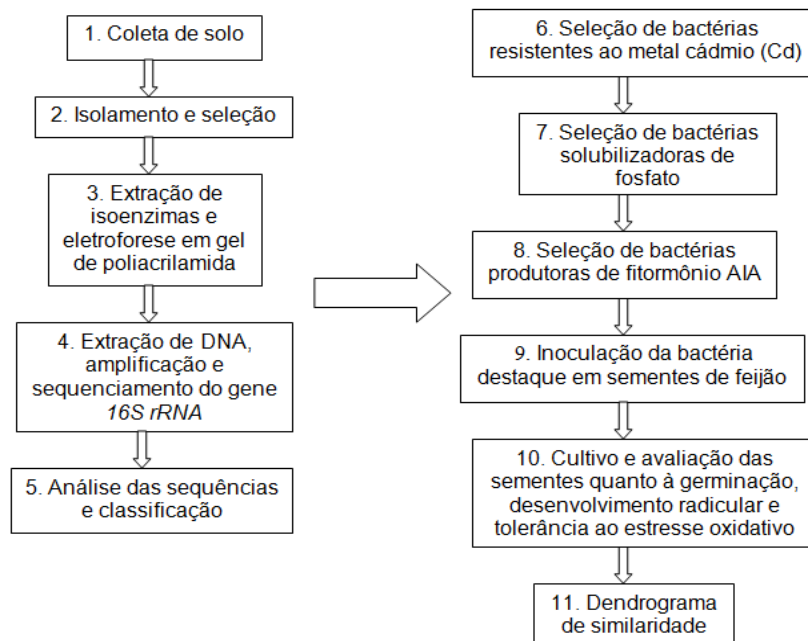
O feijão guandu constitui-se em uma das plantas de maior uso como adubação verde, por que além de possuir um sistema radicular profundo e

ramificado que, torna-o capaz de resistir ao estresse hídrico, possibilita-o romper camadas adensadas de solos, como “pé de arado”. Devido a isso, o guandu é chamado de arado biológico, e tem se destacado com relação às melhorias na fertilidade do solo (SEIFFERT & THIAGO, 1983; ALCÂNTARA et al., 2000; RODRIGUES FILHO et al., 1996; AZEVEDO et al., 2007).

Essa leguminosa tem sido uma opção promissora para a recuperação de áreas degradadas, sendo utilizada em diversos trabalhos, com resultados significativos (BELTRAME & RODRIGUES, 2007; FARIA & CAMPELLO, 2000; IBAMA, 1990; NASCIMENTO & SILVA, 2004), além de poder ser usada como fitorremediadora (PIRES, et al., 2003, 2006; PELEGRINI et al., 2003) e na alimentação humana por apresentar na sua composição um elevado teor proteico, semelhante a outras leguminosas. A sua composição em aminoácidos é semelhante ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (AZEVEDO et al. 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma Experimental:



3.1.1 Coleta de solo

A coleta foi realizada no dia 22 de janeiro de 2013, na Usina Santa Fé S.A., no município de Nova Europa-SP (Latitude: **-21.7783**, Longitude: **-48.5593** 21° 46' 42" Sul, 48° 33' 33" Oeste), em três diferentes pontos da torta de filtro que se encontrava a temperatura ambiente, sendo assim caracterizada como uma semi-compostagem. As amostras foram coletadas, identificadas, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo seco e encaminhadas ao Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP (FCAV), onde foram realizadas as análises.

3.2 Isolamento bacteriano

Inicialmente foi produzida uma suspensão de 10 g do composto em 90 mL de água destilada estéril que permaneceu sob agitação a 160 rpm, a 28°C, durante 1h. Em seguida, 1,0 mL desta mistura foi transferido para tubos estéreis, contendo 9,0 mL de solução salina (NaCl – 0,85%) e cicloheximida [300 µg/mL] (PANTHIER et al., 1979) agitados nas mesmas condições anteriores. Após agitação, foi realizada diluição seriada das células contidas na suspensão, transferindo-se 100 µL de cada diluição para placas de Petri, contendo meio sólido DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) que ficaram inoculadas em estufa tipo “BOD”, a 30°C, por 48 h. Após purificação, as colônias individuais foram suspensas em caldo nutriente contendo 20% de glicerol e armazenadas em ultrafreezer à -80°C.

3.3 Extração de isoenzima

Depois do crescimento em DYGS líquido, as células bacterianas foram lavadas com solução salina e, em seguida centrifugadas (centrifuga RC5C Sorvall Instruments), à temperatura de 4°C a 16.266 x g, durante 30 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com solução salina (NaCl - 0,85%) por duas vezes para remoção do meio de cultura, em seguida, ressuspendido em solução

salina novamente até se obter 400 Kletts de densidade óptica. Dessa suspensão bacteriana, alíquotas de 4 mL foram retiradas e centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos e as células foram ressuspensas em 0.5 mL de tampão de extração (temperatura ambiente) (Tabela 6), seguidas de centrifugação a 16.000 x g durante 5 minutos e novamente em 0.5ml do tampão, contendo 1 mg/ml de lisozima, ressuspensas. Em seguida, foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas a 16.000 x g durante 5 minutos e ressuspensas em 0,5ml de tampão de sonicação, onde novamente adicionou os componentes no Tris gelado (Tabela 7). As amostras foram sonicadas (banho de gelo) em *Sonicador Branson Sonifer mod. 250 acoplado de micro tip*, durante 5 minutos (com duty cycle 10 e output 5 (20W)). As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g à 4°C durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado (isoenzimas), para posterior análise eletroforética.

Tabela 6: Solução tampão de extração (quantidade suficiente para 100ml)

Componente	Quantidade
Acetato de Magnésio 5mM	0,1g
Glicerol a 15%	15g
2-Mercaptoetanol 0,1%	100µl
Tris - HCl 0,1M	1,21g
pH	7,2

Tabela 7: Solução tampão de sonicação (quantidade suficiente para 100ml)

Componente	Quantidade
Glicerol 15%	15g
Tris – HCl 0,1M	1,21g
pH	8,8

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a eletroforese das isoenzimas em gel de poliacrilamida, foram utilizados géis de separação (Tabela 8) a 10%, de concentração (Tabela 9) a 5%, preparados

e montados entre placas de vidro de 105 x 80mm, com espaçador de 1mm. No processo eletroforético, foi utilizado cubas especiais “Sigma – Chemical C.O.” preenchidas com tampão de corrida (Tabela 6). A eletroforese foi realizada em câmara fria sob corrente de 500 mA à 200V (Fonte Bio-Rad, Model 1000/500, Power Supply) durante aproximadamente cinco horas e no gel foi aplicado cerca de 25ul de isoenzima referente a cada amostra.

Tabela 8: Solução gel de separação a 10%

Componente	Quantidade
Tris – HCl 2,25 M	4,90 ml
Acrilamida: Bis Acrilamida	9,80 ml
Temed	40µl
Persulfato de Amônio a 10%	350µl
Água	14,95 ml
pH	8,8

Tabela 9: Solução gel de concentração a 5%

Componente	Quantidade
Tris 0,5 M	4,0ml
Acrilamida: Bis Acrilamida	2,66ml
Temed	30µl
Persulfato de Amônio a 10%	150µl
Água	9,20ml
pH	6,8

Tabela 10: Solução tampão de corrida (quantidade suficiente para um litro)

Componente	Quantidade
Glicina 0,096 M	7,1g
Tris – HCl 0,0125 M	1,5g
pH	7,9

3.4.1 Detecção isoenzimática

A revelação das bandas da isoenzima no gel foi realizada segundo as metodologias descritas por PASTEUR et al. (1988) e ALFENAS et al. (1991). Utilizando o seguinte revelador:

3.4.2 Alfa-esterase

- Tampão fosfato 0,1M – 100ml (pH 6,2)
- Fast Blue (0,12g) – 100ml
- Alfa – nafilacetato – 70mg

Ao tampão fosfato foram misturados o Fast Blue e o Alfa-nafilacetato e após agitação rigorosa foram adicionados ao gel. O tempo de coloração variou de 30 a 40 minutos (PASTEUR et al, 1988).

3.5 Extração e quantificação do DNA

A bactéria cresceu em meio DYGS durante 48 h, a 28° C, sob agitação constante de 160 rpm. Após este período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 15,294 x g durante 15 min à temperatura ambiente. O precipitado foi utilizado para extração de DNA de acordo com Marmur (1961), adaptado. O pellet celular (0.05g) foi ressuspenso em 400 µL de solução salina 0.85%. Adicionado 40 µL de solução liozima (20 mg/mL), o eppendorf agitado em vórtex e acrescentado 13 µL de solução RNase (10 mg/mL). Os eppendorfs foram deixados em banho maria a 37°C por 2 horas (agitados cuidadosamente por inversão do tubo, ocasionalmente). Ao serem retirados do banho, foram acrescentados 44 µL de SDS a 20% e agitados manualmente por 5 minutos. Acrescentado 158 µL de solução acetato de Sódio 3M e agitados manualmente por 5 minutos. Adicionado 650 µL de clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1) gelado, os eppendorfs agitados manualmente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15.294 x g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante coletado e a lavagem com clorofórmio, repetida. Após, foram coletada novamente a fase superior, acrescentados dois volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram misturados por inversão. As amostras foram incubadas a -80°C, por 20

minutos. Em seguida, centrifugadas a 15.294 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado, adicionado 1 mL de Etanol 70% onde fez-se uma lavagem do DNA. O etanol foi descartado e os eppendorfs invertidos sobre papel toalha e depois levados para o fluxo laminar, onde obteram uma total secagem. Após secos, o pellet foi ressuspensão em 100 µL de TE (10:1). A qualidade e integridade do DNA foram verificadas através da análise eletroforética em gel de agarose 0,8%.

3.6 PCR de amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Os DNAs foram amplificados pela reação em cadeia da *polimerase* (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA *pA* (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e *pc5b* (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3"), descritos por Kuske et al., (1997). As reações de PCR continham 10 mM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, MgCl₂ a 2 mM, Tampão de PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], 1,25 U de Taq DNA polimerase (Fermentas ®) e 60 ng de DNA genômico, q.s.p. (quantidade suficiente para) 20µl. A PCR foi realizada no Gene Amp PCR System 9700 termociclador (Applied Biosystems ®), utilizando um passo inicial de desnaturação a 94° C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94° C durante 30 segundos, hibridação a 50° C durante 30 segundos, seguidos de uma extensão final de 72°C, por 1 minuto.

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit "DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism" Versão 3. Utilizando-se: 1 µL dos terminadores Big Dye; 5 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores; 50 ng de DNA genômico; 4 µL de tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl₂); H₂O mili-Q estéril (qsp) 10 µL. A amplificação foi feita utilizando um passo inicial de desnaturação a 96° C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94° C durante 10 segundos, hibridação a 53° C durante 5 segundos, seguidos de uma extensão final de 60°C, por 4 minutos. As reações de sequenciamento foram purificadas por precipitação do etanol. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo

– P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento do DNA foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100 – Perkin Elmer.

3.7 Análise das sequências

A partir dos eletroferogramas gerados pelo sequenciamento, foi feita uma seleção das sequências adequadas a partir do programa Phred/Phrap (GORDON et al., 1998), o qual analisou a qualidade das sequências, gerando arquivos no formato “fasta”, onde o nível de exigência mínima foi de 300 bases com qualidade Phred maior ou igual a 20 (EWING et al., 1998). Os contigs das sequências foram submetidos à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A ferramenta utilizada para consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997).

3.8 Construção do dendrograma

Para a construção do dendrograma a partir da sequência (F) do isolado JAB-47, destaque nos testes de resistência ao Cd, solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético, o eletroferograma teve a qualidade avaliada pelo Phred e uma busca por estrutura quimérica foi realizada a partir do Dechipper (WRIGHT et al. 2012). A busca de sequências similares foi realizada com o Megablast (NCBI) (McGINNIS & MADDEN) e SeqMatch (RDP II) (MAIDAK et al. 2000) . A classificação taxonômica foi realizada com o Classifier (RDP II) utilizando corte de confiança de 95% para classificação em nível de gênero. O conjunto de sequências utilizadas para a comparação com a sequência JAB47(F), foram recuperadas a partir do GenBank (BENSON et al. 2006). Após o alinhamento no Clustal W disponível no BioEdit 7.0.9.0, a árvore foi construída utilizando o programa Mega 5.05. Para tanto, foi empregado o método de Neighbor-joining, bootstrap para 1.000 réplicas, matriz de substituição de nucleotídeos Jukes-Cantor e opção

Pairwise deletion. Nos ramos do dendrograma, foram considerados apenas valores de suporte acima de 70%.

3.9 Resistência ao metal pesado

Para a determinação de resistência ao MP, foi utilizada a técnica da concentração inibitória mínima (CMI). As bactérias foram inoculadas em meio DYGS sólido acrescidos de 0,1; 1,5 e 3,0 mM de CdCl_2 (cloreto de cádmio) (Symanski, 2005) e incubadas em BOD a 28° C, durante 96 h. Após esse período foi avaliada a capacidade de desenvolvimento das bactérias. Assim, as bactérias que se desenvolveram no meio sólido contendo CdCl_2 foram consideradas resistentes.

3.10 Efeito da presença de Cd nas curvas de crescimento

O efeito da presença de cádmio no crescimento bacteriano foi determinado medindo a densidade óptica a 600 nm. Uma colônia de 24 h foi inoculada em “erlenmeyer”, com capacidade para 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido DYGS, e incubado em agitador rotatório 140 rpm, 29 °C por 24 h, ou seja, até obtenção de uma suspensão com leitura de densidade óptica (DO 600) igual a 1,50. Alíquotas das culturas correspondentes a 0.2% (v/v) foram transferidas para “erlenmeyer” de 125 mL contendo 50 mL do meio líquido com e sem a presença do metal e incubadas a 29°C, sob agitação a 140 rpm. Para obter a taxa de crescimento, amostras de curso de tempo o meio de cultura foram retiradas em intervalos de tempo apropriados, e o crescimento celular foi monitorado através da medição da densidade óptica a 600 nm (DO 600). Os meios de cultivo foram centrifugados (16000 x g, 4° C, 20 min) e as amostras analisadas por DO antes da centrifugação. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em solução salina 0.85% e DO superiores a 1,0, foram diluídas (1:3) antes da leitura. As leituras de DO foram realizadas colocando a amostra (diluída ou não) num cuvete (1 ml), que foi digitalizada utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram apresentados como o crescimento relativo em comparação com o crescimento em meio isento de metal.

3.11 Avaliação da solubilização de fosfato

O teste de solubilização do fosfato foi realizado quanto à capacidade *in vitro* em solubilizar fosfato pelo uso do meio sólido NBRIP (NAUTIYAL, 1999) contendo fosfato insolúvel adicionado de azul de bromotimol ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ - $624,38 \text{ g.mol}^{-1}$) para indicação do pH. Os isolados foram incubados a 28°C por 7 dias e as medições do halo e da colônia foram realizadas a partir das 24h de incubação, todos os dias no mesmo horário até a colônia cessar crescimento ao sétimo dia. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Azospirillum brasiliense* Vi22 (Ambrosini et al, 2011). O halo de solubilização foi estimado subtraindo-se o diâmetro da colônia.

3.12 Determinação colorimétrica do AIA

A produção de ácido indol acético das estirpes bacterianas foi determinada segundo a metodologia colorimétrica em microplacas descrita por SARWAR & KREMER (1995). A produção de ácido indol acético das estirpes bacterianas foi determinada segundo a metodologia colorimétrica descrita por SARWAR & KREMER (1995). Dois mililitros de suspensão bacteriana com densidade óptica ajustada ($D.O.=0,5$) foram inoculadas em frascos erlenmeyer contendo 28 mL de meio de cultivo, acrescido de 1 mL de solução de triptofano (3 mg.mL^{-1}). Os frascos foram incubados a 30°C no escuro e sob agitação constante. A quantificação foi realizada 24, 48 e 72h após a inoculação. Uma alíquota de 150 μl de cada cultura e 100 μl do reagente de Salkowisk (1mL de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ 0,5M em 50 mL de HClO_4 35%) foram colocados em poços de microplacas de poliestireno e incubados no escuro por 30 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 492 nm e a concentração de AIA estimada através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de AIA. Foram utilizadas duas repetições para cada estirpe bacteriana além de um meio de cultura estéril como controle.

3.13 Inoculação e avaliação das sementes estressadas por Cd

Neste teste, somente a bactéria que obteve destaque nas avaliações anteriores foi submetida. A bactéria foi crescida em meio DYGS líquido, a 28° C, a 150 rpm, durante 48 h. Após esse período uma parte desse meio contendo células da bactéria foi misturada a três partes de PVP (polivinilpirrolidona). A essa mistura foi adicionadas sementes de feijão guandu desinfetadas com etanol 70% (três lavagens de 5 minutos cada) e hipoclorito de sódio 3% (três lavagens de 3 minutos cada). As sementes inoculadas foram colocadas para germinar em recipientes plásticos, sobre papel filtro. Os tratamentos com quatro repetições cada, constituíram-se de H₂O (controle) e solução a 1,0 mMol de CdCl₂, tanto para as sementes inoculadas, quanto para as não inoculadas. Foi aplicado um fotoperíodo de 12 h e a germinação foi avaliada a cada 24 h, durante 7 dias. Após 20 dias foram separadas a parte aérea e raiz das sementes. A seguir, os materiais acondicionados em sacos de papel e identificados foram levados à estufa com circulação de ar durante 72 h a 55° C.

3.14 Dosagem de Cd

Após as amostras estarem secas e moídas foi realizada uma digestão nitro perclórica, descrita por Griepink & Tolg (1989). A digestão total das amostras foi em seguida encaminhada para o Laboratório Central da FCAV, para que a leitura fosse realizada em um espectrofotômetro de absorção atômica – GBC 932 AA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta, Isolamento e identificação dos Isolados

O processo de isolamento das bactérias da torta de filtro foi eficiente. O número total de isolados rizosféricos obtidos pela metodologia adotada foi de 55 isolados, dos quais 46 apresentaram padrão de bandas para a isoenzima α -esterase (Figura 4). A partir da análise no perfil de bandas, 16 isolados foram descartados por

apresentarem alto grau de semelhança. Assim, os padrões mais diversificados e os que não apresentaram especificidade para esse substrato, foram submetidos à identificação pelo sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*.

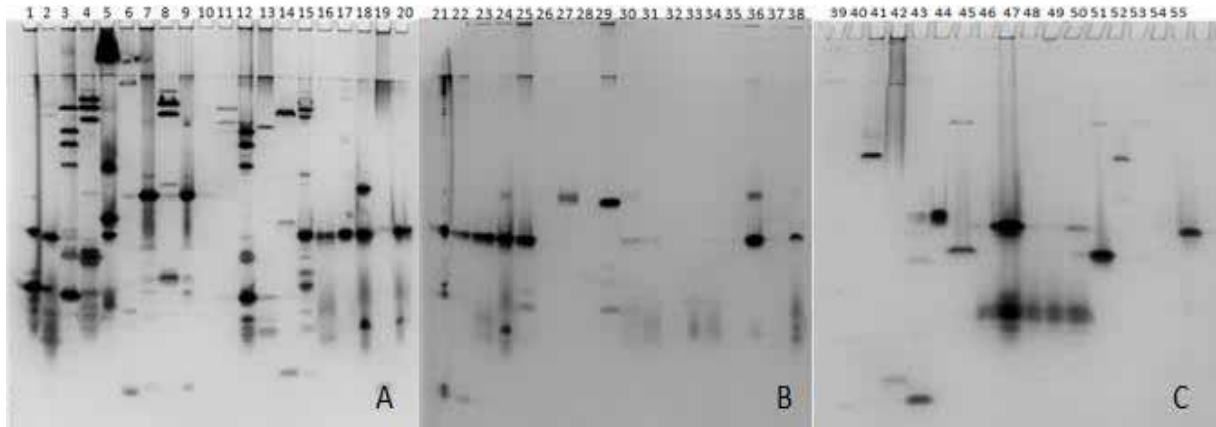


Figura 4: Sistema isoenzimático α -esterase em gel de poliacrilamida. Gel A: Isolados JAB-01 ao JAB-20. Gel B: Isolados JAB-21 ao JAB-42. Gel C: Isolados JAB-39 ao JAB-55. Mostrando as diferenças, semelhanças e ausência nos padrões de bandas.

O meio DYGS por ser um meio rico e de rápido crescimento, mostrou-se eficaz para o desenvolvimento de isolados bacterianos da torta de filtro.

O método de extração do DNA utilizado foi considerado adequado e gerou material genético de boa qualidade e bom rendimento para a maioria dos isolados (Figura 5)

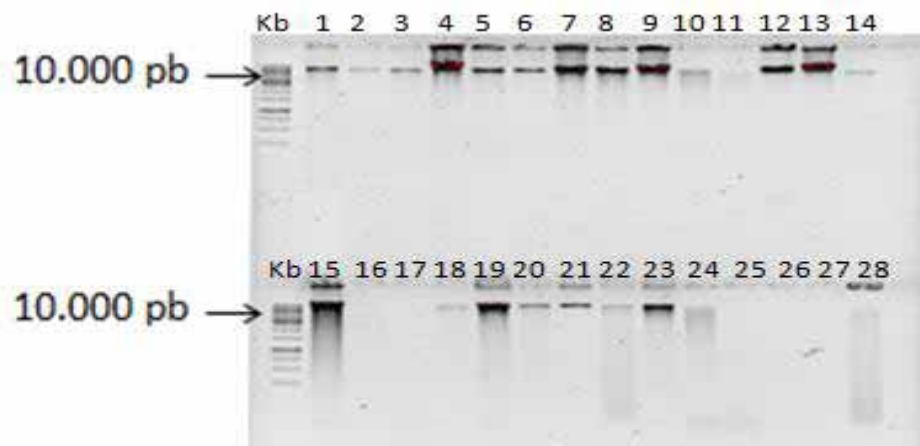


Figura 5: Perfil eletroforético de alguns dos isolados da torta de filtro, em gel de agarose 0,8% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/ μ L). Canaletas: Kb - padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder -

Fermentas). As demais canaletas correspondem aos isolados JAB-01 ao JAB-28.

A reação de PCR foi realizada com os DNAs obtidos juntamente com os oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, gerando fragmentos com 1500 pb, sendo adequado para o sequenciamento (Figura 6). As sequências obtidas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank para que pudessem ser identificadas e classificadas.

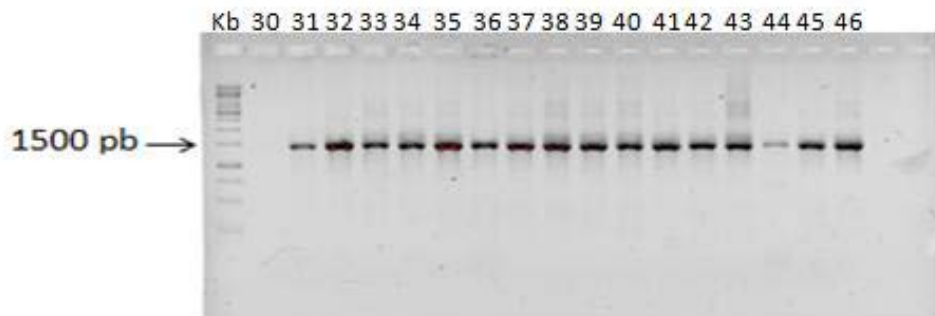


Figura 6: Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação do DNA de alguns dos isolados da torta de filtro, pelos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S r RNA pA e p65B, em gel de agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/μL). Canaletas Kb – padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder – Fermentas). Demais canaletas correspondem aos isolados JAB-30 ao JAB-46.

A análise pelo “Blast” permitiu que as sequências pudessem ser classificadas taxonomicamente. Os resultados entre as sequências obtidas em relação às do banco de dados apresentaram entre 90-96% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados (Tabela 11).

Tabela 11: Classificação dos isolados bacterianos

Sigla do isolado	"Blast"	Similaridade
JAB-01	<i>Bacillus</i> sp	92%
JAB-04	<i>Lysinibacillus</i> sp	95%
JAB-05	<i>Bacillus</i> sp	90%
JAB-06	<i>Brevibacillus</i> sp	95%
JAB-07	<i>Brevibacillus</i> sp	94%
JAB-08	<i>Brevibacillus</i> sp	94%
JAB-09	<i>Lysinibacillus</i> sp	91%
JAB-10	<i>Brevibacillus</i> sp	96%
JAB-11	<i>Paenibacillus</i> sp	91%
JAB-14	<i>Microbacterium</i> sp	94%
JAB-18	<i>Bacillus</i> sp	93%
JAB-19	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-20	<i>Staphylococcus</i> sp	93%
JAB-21	<i>Bacillus</i> sp	90%
JAB-24	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-26	<i>Bacillus</i> sp	92%
JAB-27	<i>Bacillus</i> sp	93%
JAB-28	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-29	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-33	<i>Bacillus</i> sp	91%
JAB-34	<i>Bacillus</i> sp	91%
JAB-35	<i>Bacillus</i> sp	91%
JAB-36	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-37	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-40	<i>Bacillus</i> sp	92%
JAB-44	<i>Bacillus</i> sp	91%
JAB-45	<i>Bacillus</i> sp	92%
JAB-46	<i>Pantoea</i> sp	91%
JAB-47	<i>Pseudomonas</i> sp	96%
JAB-48	<i>Bacillus</i> sp	91%
JAB-50	<i>Bacillus</i> sp	92%
JAB-51	<i>Acinetobacter</i> sp	93%
JAB-52	<i>Bacillus</i> sp	93%
JAB-53	<i>Bacillus</i> sp	94%
JAB-54	<i>Bacillus</i> sp	93%
JAB-55	<i>Bacillus</i> sp	92%

4.2 Dendrograma de similaridade

Para montagem do dendrograma de similaridade, utilizou-se apenas a sequência (F) do isolado JAB-47, que foi o utilizado para inoculação em sementes de feijão guandu. A partir deste foi possível confirmar que a sequência obtida a partir do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*, pertence ao gênero *Pseudomonas*, com 91% de similaridade com a bactéria *P. putida* S16 (TANG et al. 2012), uma bactéria com habilidade para degradar nicotina.

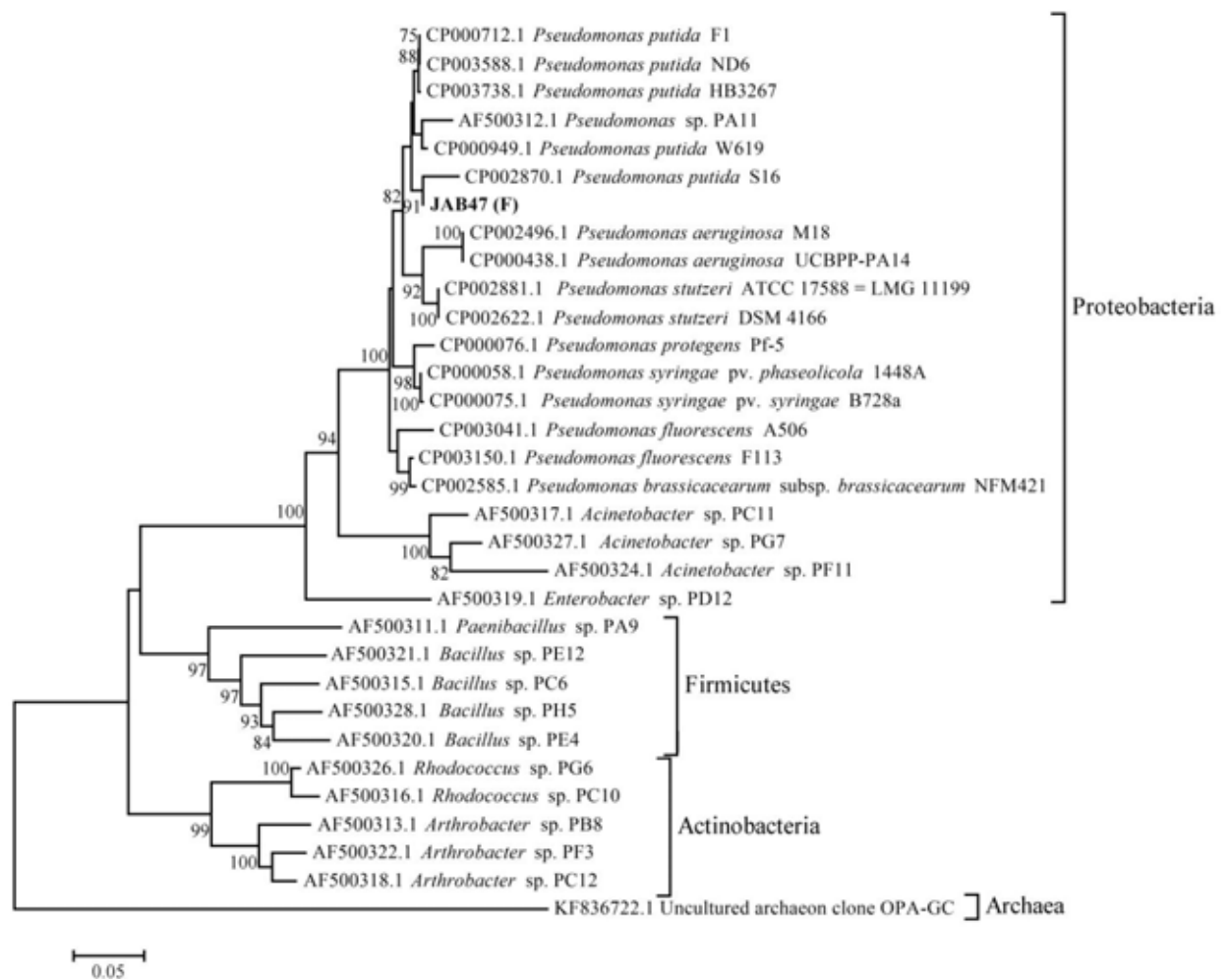


Figura 7: Dendrograma de similaridade a partir da sequência F do isolado JAB-47.

4.3 Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) do Cd para os isolados

A partir do meio sólido DYGS, acrescido de duas diferentes concentrações (1,5 e 3,0 mM) de CdCl_2 , o isolado *JAB47* mostrou bom desenvolvimento quando submetido à concentração de 1,5 mM (Figura 8A, 8C) e quando exposto a 3,0 mM seu crescimento foi inibido (Figura 8B, 8D). Essa inibição foi verificada para todos os isolados testados.

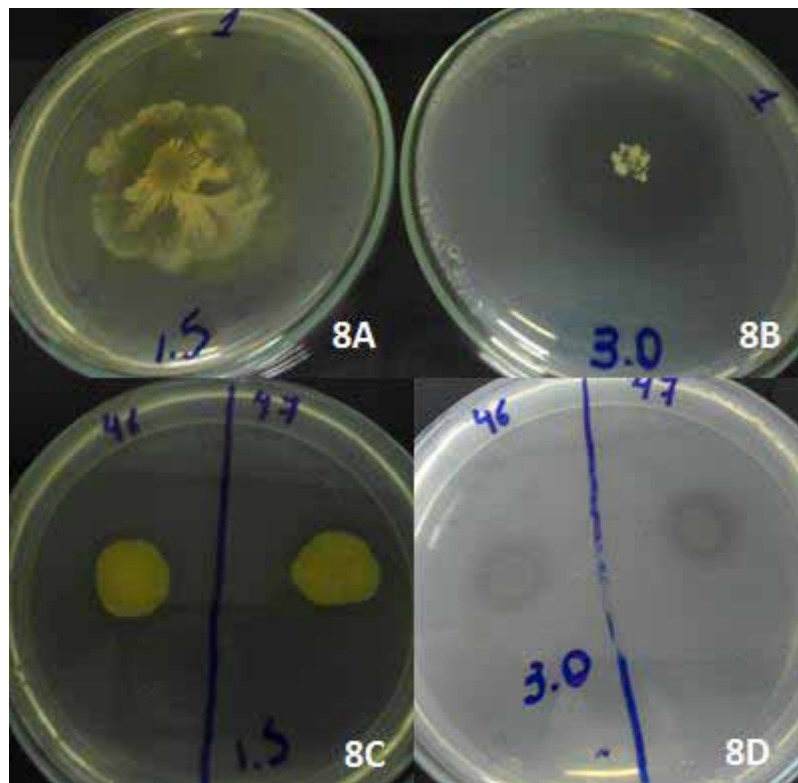


Figura 8: Desenvolvimento bacteriano em meio de cultura contendo Cd

Dourado et al. (2013), trabalhando com isolados rizosféricos de solo cultivado com árvores de café, contaminado artificialmente, selecionou em meio de cultivo, bactérias tolerantes a 5,0 mM de CdCl_2 , incluindo *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Mycobacterium*, *Methylobacterium*, *Bosea*, *Burkholderia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*.

Na literatura disponível, não foi encontradas referências para bactérias tolerantes ao cádmio que tenham sido isoladas da torta de filtro.

Tabela 12: Concentração mínima inibidora do desenvolvimento bacteriano

Isolado	CdCl ₂ 0,1 mM	CdCl ₂ 1,5 mM	CdCl ₂ 3,0 mM
JAB-01	+	+	-
JAB-04	+	-	-
JAB-05	+	+	-
JAB-06	+	-	-
JAB-07	+	+	-
JAB-08	+	-	-
JAB-09	+	+	-
JAB-10	+	-	-
JAB-11	+	-	-
JAB-14	+	-	-
JAB-18	+	-	-
JAB-19	+	-	-
JAB-20	+	-	-
JAB-21	+	+	-
JAB-24	+	+	-
JAB-26	+	+	-
JAB-27	+	+	-
JAB-28	+	-	-
JAB-29	+	-	-
JAB-33	+	-	-
JAB-34	+	-	-
JAB-35	+	-	-
JAB-36	+	-	-
JAB-37	+	+	-
JAB-40	+	-	-
JAB-44	+	-	-
JAB-45	+	+	-
JAB-46	+	+	-
JAB-47	+	+	-
JAB-48	+	-	-
JAB-50	+	+	-
JAB-51	+	+	-
JAB-52	+	-	-
JAB-53	+	-	-
JAB-54	+	+	-
JAB-55	+	-	-

* (+) presença de colônia (-) ausência de colônia

4.4 Efeito da presença do Cd nas curvas de crescimento

Os resultados obtidos nesta etapa, que teve como objetivo avaliar o efeito do metal no crescimento de células de *Pseudomonas*, isolado JAB-47, estão apresentados na Figura 9. Foi observado que na presença do Cd em meio líquido DYGS, suplementado com 0,15 mM de CdCl₂, houve uma inibição do crescimento, porém em meio DYGS solidificado, o isolado se desenvolveu em 1,5 mM de CdCl₂.

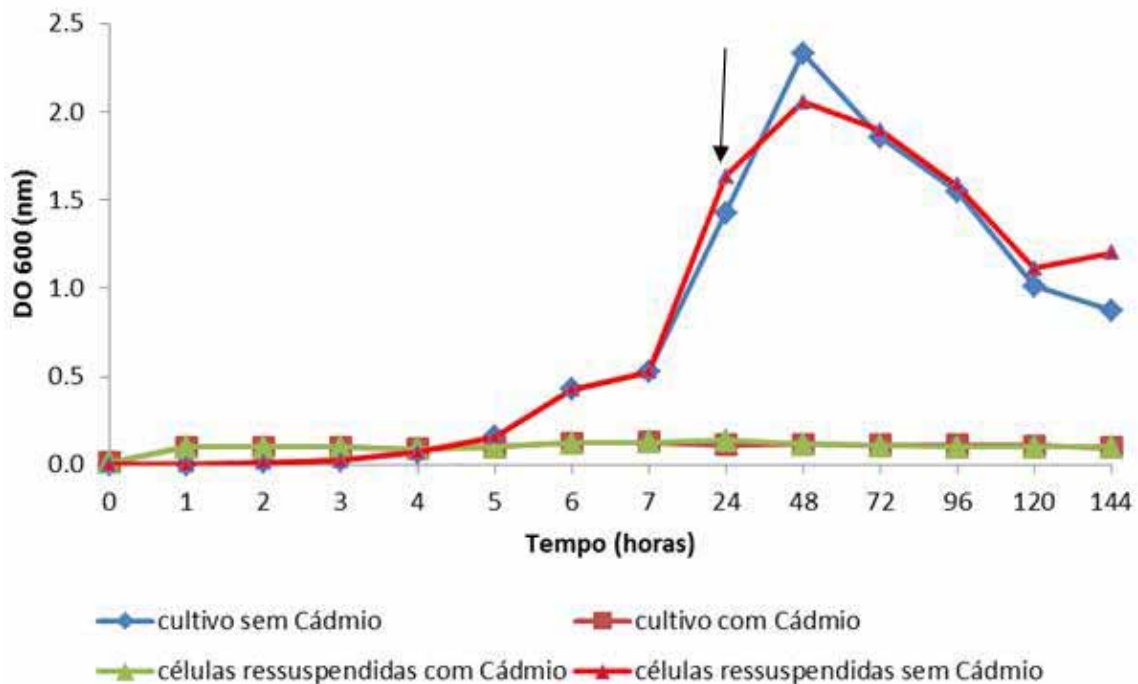


Figura 9: Curva de crescimento da bactéria *Pseudomonas* cultivada em meio líquido DYGS na presença e ausência de Cádmiio. Onde: → ponto início diluição da amostra (1:3).

Dourado et al. (2013), a partir de uma curva demonstrou que o crescimento da *Burkholderia* sp. SCMS54 foi mais lento quando suplementado com 0,3 mM de CdCl₂ e nenhum crescimento foi observado em tratamento com 1,28 mM, porém em meio sólido, foi observado crescimento com 5,0 mM de CdCl₂.

4.5 Seleção das bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

O *Pseudomonas* foi o que mais se destacou diante a solubilização desde as primeiras 24h, formando um halo em média de 37 mm (Figura 10A), bem evoluído em relação aos 4,0 mm do controle positivo (Figura 10B). Assim, o meio NBRIP foi útil para detectar a capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados, porém não favorecendo o *Azospirillum brasiliense* (controle). Outros isolados se destacaram para essa seleção, fato que pode estar relacionado aos altos níveis de fósforo (PRADO et al., 2013) que são encontrados na torta de filtro, local de onde estes foram isolados.

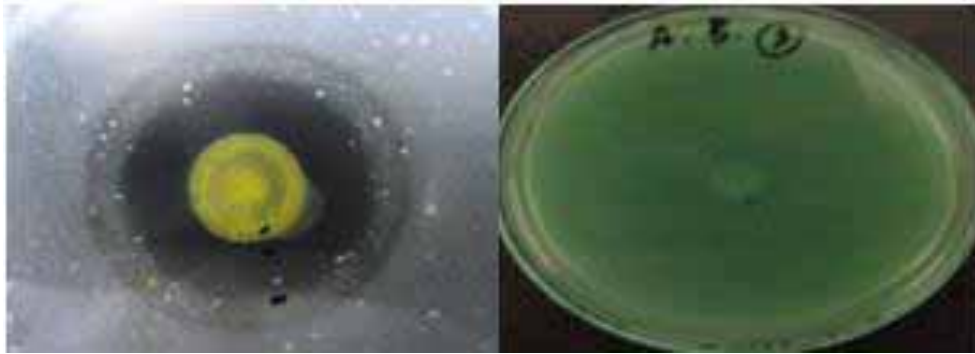


Figura 10: Formação do halo de solubilização no sétimo dia de crescimento bacteriano. Ao lado esquerdo pelo isolado JAB-47 e ao lado direito pelo controle positivo.

O meio NBRIP foi útil para detectar a capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados, uma vez que na sua presença os isolados positivos ao teste formaram um halo transparente que foi indicativo de solubilização (Figura 11). A coloração tanto da colônia, quanto do meio não foi alterada, o que comprova que a formação do halo não foi devido às mudanças no pH.

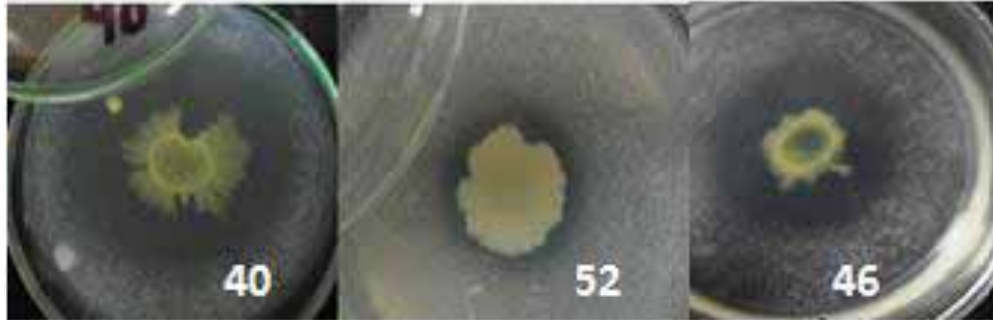


Figura 11: Outros isolados que foram destaque para o teste de solubilização de fosfato. Esses pertencentes aos gêneros *Bacillus* (JAB-40 e JAB-52) e *Pantoea* (JAB-46)

Dentre vários gêneros bacterianos capazes de solubilizar o fosfato, Park et al. (2009) e Meyer et al. (2011), destacaram a habilidade do *Pseudomonas*.

A presença dessas BSF na torta de filtro é de suma importância, uma vez que o fósforo existente nesse composto é orgânico e sua liberação, se dá gradativamente por mineralização e por ataque de micro-organismos no solo (SANTOS et al., 2011). Na mineralização da torta de filtro, assim como de outras fontes de matéria orgânica, os micro-organismos produzem substâncias quelantes e complexantes que reduzem a fixação do fósforo no solo e também podem produzir substâncias promotoras de crescimento radicular (DINARDO MIRANDA et al., 2010).

Tabela 13: Diâmetro da área solubilizada pelos micro-organismos em meio NBRIP

Isolado	Ø halo (24h) mm	Ø halo (48h) mm	Ø halo (72h) mm	Ø halo (96h) mm	Ø halo (120h) mm	Ø halo (144h) mm
Controle+	1,0	1,5	2,3	2,9	3,5	4,0
JAB-01	2,0	3,4	4,5	6,7	8,3	9,0
JAB-04	3,5	4,7	5,3	6,1	7,2	8,0
JAB-05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-06	2,3	2,6	3,4	4,1	4,9	5,0
JAB-07	2,7	3,1	3,5	3,8	3,8	4,0
JAB-08	3,5	4,0	5,1	7,9	6,0	6,0
JAB-09	5,0	5,3	6,7	10,0	11,0	11,0
JAB-10	5,0	6,2	7,4	8,8	9,1	10,0
JAB-11	4,0	4,7	5,8	6,7	7,8	9,0
JAB-14	3,2	4,3	5,2	6,0	6,3	7,0
JAB-18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-19	6,0	6,7	7,5	8,9	10,8	12,5
JAB-20	5,0	5,9	6,0	8,9	9,3	10,9
JAB-21	4,0	5,6	7,6	7,6	7,6	7,6
JAB-24	3,0	7,0	7,8	8,0	9,0	9,3
JAB-26	1,0	3,0	3,4	3,4	3,5	3,6
JAB-27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-28	1,3	1,9	2,1	2,6	2,7	2,8
JAB-29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-33	1,9	1,9	2,3	2,9	2,9	3,0
JAB-34	5,9	5,9	6,3	6,9	7,8	7,8
JAB-35	1,9	1,9	2,7	3,5	4,0	4,8
JAB-36	5,0	5,9	6,3	7,1	7,9	8,0
JAB-37	5,0	5,3	5,9	6,9	7,2	8,9
JAB-40	3,5	6,5	11,3	15,3	17,5	18,9
JAB-44	3,9	6,4	6,8	7,2	8,9	9,1
JAB-45	1,2	3,6	3,9	3,9	4,0	4,5
JAB-46	3,6	6,7	12,0	13,8	14,6	15,0
JAB-47	4,2	9,3	14,8	25,6	31,4	36,9
JAB-48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-52	1,3	2,3	3,0	3,9	4,3	5,0
JAB-53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-54	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
JAB-55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

4.6 Seleção das bactérias produtoras de AIA

A produção de AIA variou entre os isolados de acordo com a Tabela 14. O gênero *Pseudomonas* obteve destaque, mantendo a produção do fitormônio em torno de $7,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$, exceto nas primeiras 24h do seu crescimento. Isso pode ser porque nas primeiras horas a quantidade de

metabólitos secundários (SPAEPEN et al., 2007) que eleva a produção do hormônio é baixa ou até mesmo inexistente. Assim, foi essencial a realização de leituras em diferentes tempos.

Os resultados obtidos pelos isolados foram de encontro à técnica de quantificação de auxina pelo método de microplacas (Figura 12), proposta por Sawar & Kremer (1994), que obtiveram bactérias produzindo teores compreendidos entre 0,261 e 4,347 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de proteína.

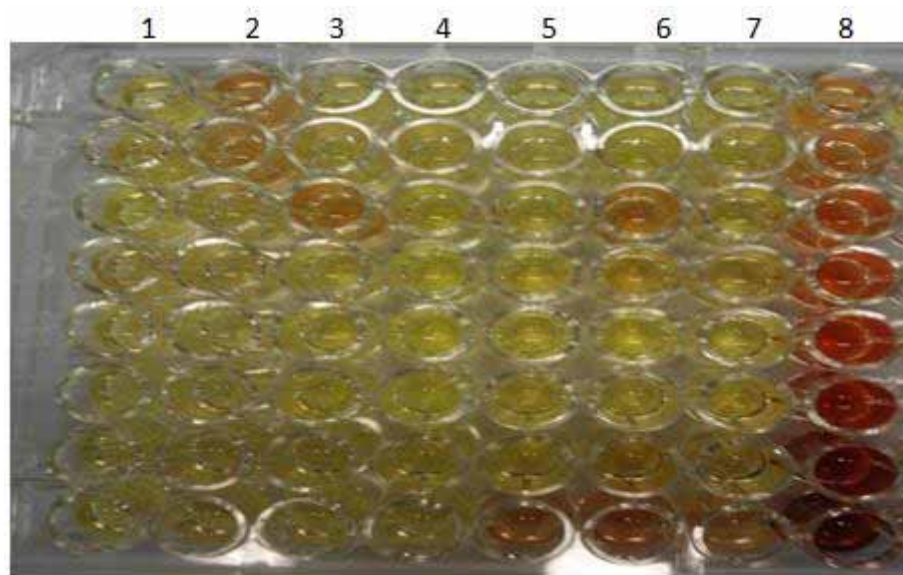


Figura 12: Produção de AIA pelos isolados (colunas de 1 a 7). A coluna 8 refere-se a curva padrão.

A tabela 14 demonstra a variação na produção de AIA pelos isolados, nas diferentes horas do desenvolvimento bacteriano.

Tabela 14: Dosagens colorimétrica do AIA em diferentes estágios de cultivo em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano)

Isolado	24h µg/mL ⁻¹	48h µg/mL ⁻¹	72h µg/mL ⁻¹
JAB-01	1,0	3,0	4,0
JAB-04	3,0	4,0	5,0
JAB-05	1,0	2,0	2,0
JAB-06	3,0	4,0	5,0
JAB-07	5,0	7,0	7,0
JAB-08	3,0	5,0	5,0
JAB-09	5,0	7,0	7,0
JAB-10	0,0	1,0	2,0
JAB-11	0,0	2,0	2,0
JAB-14	0,0	2,0	2,0
JAB-18	0,0	2,0	2,0
JAB-19	0,0	2,0	3,0
JAB-20	0,0	1,0	3,0
JAB-21	0,0	3,0	4,0
JAB-24	0,0	3,0	4,0
JAB-26	0,0	3,0	3,0
JAB-27	0,0	1,0	2,0
JAB-28	0,0	2,0	3,0
JAB-29	0,0	2,0	3,0
JAB-33	1,0	2,0	3,0
JAB-34	1,0	2,0	3,0
JAB-35	2,0	4,0	5,0
JAB-36	2,0	4,0	5,0
JAB-37	0,0	0,0	2,0
JAB-40	0,0	0,0	2,0
JAB-44	0,0	0,0	3,0
JAB-45	0,0	0,0	3,0
JAB-46	0,0	2,0	4,0
JAB-47	1,0	5,0	7,0
JAB-48	0,0	0,0	2,0
JAB-50	0,0	0,0	1,0
JAB-51	3,0	5,0	6,0
JAB-52	1,0	3,0	4,0
JAB-53	0,0	0,0	2,0
JAB-54	0,0	0,0	1,0
JAB-55	0,0	0,0	1,0

Vários estudos veem reportando a capacidade de diversos gêneros bacterianos promoverem o crescimento (GALDIANO-JUNIOR et al., 2011; INUI-KISH et al., 2012; GOPALAKRISHNAN et al., 2014), em diferentes espécies vegetais. Acerca da produção de AIA, sabe-se que o aminoácido L-triptofano (*LTrp*) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e micro-organismos, e

que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase-EC4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese deste fitormônio (LEBUHN & HARTMANN, 1993).

4.7 Inoculação bacteriana e acúmulo de Cd pelas plântulas

A desinfecção das sementes com etanol 70% e hipoclorito de sódio 3%, foi eficiente na eliminação de micro-organismos indesejáveis. O controle feito a partir do cultivo de algumas destas sementes em meio de cultura sólido foi importante para a inspeção da qualidade da desinfecção, uma vez que não foi observada a formação de colônias (fungos e bactérias).

O sistema de potes plásticos transparentes (Figura 13), adotado para o cultivo das sementes, foi considerado eficiente para germinação e desenvolvimento das plântulas. A Figura 14, mostra o sistema de fotoperíodo utilizado durante o experimento.



Figura 13: Germinação das sementes em sistema de potes plásticos



Figura 14: Sistema de fotoperíodo

A inoculação da cultura bacteriana líquida com as sementes de feijão guandu foi eficiente quando utilizado o polivinilpirrolidona (PVP), pois esse possui a capacidade de proteger as bactérias através da absorção de compostos polifenólicos dos exudatos das sementes Bushby & Marshall (1977) e formação de um filme protetor, impedindo perdas de água.

Tabela 15: Resultados obtidos a partir da germinação das sementes inoculadas e não inoculadas

	%Germinação	TMG*	IVG**
Inoculadas	28%	70%	0,22
Não inoculadas	24%	80%	0,16

*TMG= Tempo médio de germinação

**IVG= Índice de velocidade de germinação

$IVG = \sum(ni/ti)$, onde IVG é o índice de velocidade de germinação, ni é o número de sementes germinadas por dia e ti é o tempo de incubação (dias).

$TMG = \sum(ni \cdot ti/ns)$, onde TMG é o tempo médio de germinação, ni é o número de sementes germinadas por dia e ti é o tempo de incubação (dias).

$\%Gi = (N/ns) \times 100$; $\%Gi$ é a porcentagem de germinação por dia, ni é o número de sementes germinadas por dia e ns é o número de sementes incubadas.

Ao trabalhar com concentrações de Cd à $\mu\text{M/L}^{-1}$ Santos et al., (2013), evidenciaram que o aumento nas doses do metal afetam a porcentagem de emergência (%E) e o índice de velocidade de emergência das plantas. As plantas na presença de 50 μM (Palma et al. 2002) têm a atividade da catalase (CAT), enzima antioxidativa chave, presente principalmente nos peroxissomos, reduzida.

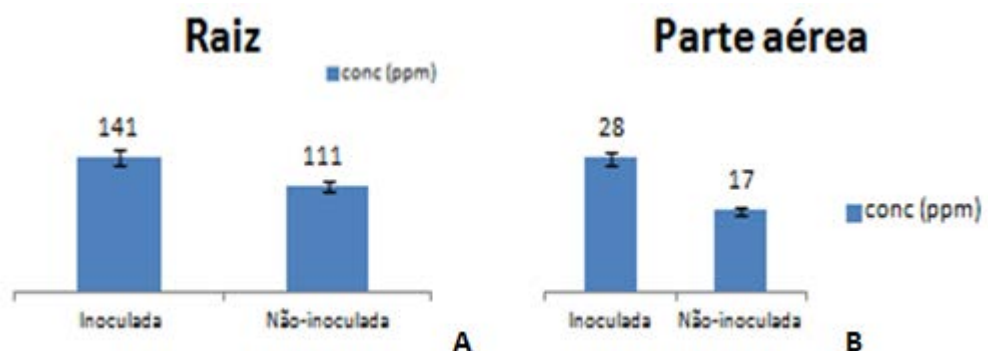


Figura 15: O gráfico A e B representam o acúmulo de cádmio nas raízes e parte aérea das sementes inoculadas e não inoculadas. Demonstrando que na presença do micro-organismo o acúmulo é maior.

A partir dos resultados inferidos pelo espectrofotômetro de absorção atômica, foi possível avaliar que a raiz inoculada acumulou 21% mais que a não inoculada e a parte aérea inoculada acumulou 39% mais Cd que a não inoculada. Quando comparadas raízes e parte aérea (inoculadas e não inoculadas), foi possível observar que as raízes acumularam 80% mais o MP.

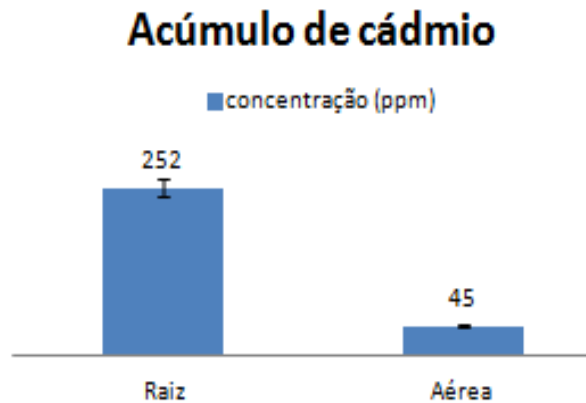


Figura 16:

Figura 16: O gráfico demonstra que o acúmulo de cádmio é maior nas raízes

Para Zacchini et al (2009), Tangahu et al (2011) e H. Ali et al (2013), a translocação do metal para a parte aérea é um processo bioquímico crucial e é desejável para uma fitoextração eficaz, porque a colheita da biomassa radicular, geralmente não é viável (ZACCHINI et al, 2009; TANGAHU et al, 2011; H. ALI et al. 2013). Mesmo sendo uma planta indicada como fitorremediadora (Pires, et al., 2003, 2006; Pelegrini et al., 2003), neste estudo as plântulas acumularam mais Cd na raiz do que na parte aérea (Figura 16).

Estudos mostraram que as raízes foram o principal local de acúmulo de metais pesados nas plantas devido à principal entrada de metais pesados ocorrerem por elas. Assim, às plantas tendem a concentrar as maiores concentrações de metais pesados nesse órgão (Orroño & Lavado, 2009; Santos et al., 2011). Além do mais, análises de localização de Cd em microscópio eletrônico mostraram que as paredes de células de raiz contém a maior parte do metal, quando comparado com o conteúdo do citoplasma (Arduini et al., 1996; Gallego et al., 2012).

Dependendo da variedade, o guandu pode ser uma planta anual ou perene de vida curta, apresentando caule lenhoso e uma raiz principal pivotante que pode penetrar um ou mais metros no solo. Sendo assim, a escolha por variedades de fácil colheita facilita o trabalho a campo. A Figura 17 demonstra as partes aéreas e sementes das plântulas inoculadas e não inoculadas.



Figura 17: À esquerda, parte aérea e sementes inoculadas e à direita, parte aérea e sementes não inoculadas).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi possível concluir que a torta de filtro pode ser uma fonte para prospecção de micro-organismos resistentes ao cádmio, solubilizadores de fosfato e promotores do crescimento vegetal; que o isolado bacteriano JAB-47, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, bioaumentou a capacidade de absorção de cádmio pelas plântulas de feijão guandu; que a raiz desse vegetal acumula 80% mais metal que a parte aérea.

6 REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R.A.; ANGLE, J.S.; DELORME, T.A.; CHANEY, R.L.; VAN BERKUM, P.; MOAWAD, H. et al. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. **New Phytologist**, v.158, p. 219–22, 2003
- ABOU-SHANAB, R.A.I.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 2882–2889, 2006.
- ABOU-SHANAB, R.A.I.; ANGLE, J.S.; VAN BERKUM, P. Chromate-tolerant bacteria for enhanced metal uptake by *Eichhornia crassipes* (Mart.). **International Journal of Phytoremediation**, v. 9, p. 91-105, 2007.
- ALCÂNTARA, F.A.; FURTINI NETO, A.E.; PAULA, M.B.; MESQUITA, H.A.; MUNIZ, J.A. . Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo vermelho-escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 277-288, 2000.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1991.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–81, 2013. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>>.
- ALKORTA, I., HERNÁNDEZ-ALLICA, J., BECERRIL, J., AMEZAGA, I., ALBIZU, I., GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Review in Environmental Science and Biotechnology**, v.3, p. 71–90, 2004.
- ALMEIDA, JR. As tortas das usinas de Açúcar. **Brasil Açucareiro**. Rio de Janeiro. v. 24, n. 2, p. 91-93, 1944.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-402, 1997.
- ANDRADE, J. M. F.; DINIZ, K. M. **Impactos Ambientais da Agroindústria da Cana-de-açúcar: Subsídios para a Gestão**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, 131 p. Monografia, 2007.

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1563–1589, 2000.

ARDUINI, I., GODBOLD, D.L., ONNIS, A. Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 111–117, 1996.

ASHOUR EH, EL-MERGAWI RA, RADWAN SMA. Efficiency of *Pseudomonas* to phytoremediate nickel by canola (*Brassica napus* L.). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, p. 375–382, 2006.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodeversity. In: ATLAS, M.; AUONCKELEN. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a nontryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interact.** v.6, p.609-615, 1993. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1993Articles/Microbe06_609.pdf>. Acessado em 14 de julho de 2014.

AZEVEDO, R., RIBEIRO, G.; AZEVEDO, C. Feijão guandu: uma planta multiuso. **Revista da FAPese**, p. 81–86, 2007. Disponível em: http://www.fapese.org.br/revista_fapese/v3n2/artigo8.pdf [Acessado em 30 de April de 2014].

AZEVEDO, R. A., GRATÃO, P. L., MONTEIRO, C. C., & CARVALHO, R. F. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? **Food and Energy Security**, v.1, n. 2, p. 133–140, 2012. Disponível em <doi:10.1002/fes3.10>

BAJPAI, P.D.; SUNDARA, RAO, W.V.B. Phosphate solubilizing bacteria III. Soil inoculation with phosphate solubilizing bacteria. **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 17, p. 46–53, 1971.

BANIK, S.; DEY, B.K. Phosphate solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. **Zentralblatt Microbiology** 138:17–23, 1983.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* plant relationships: Environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 103–121, 1997.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A.A.; DE BASHAN, L.E. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 1–2, 2013.

BASTOS, V. L. F. **Enzimas do Metabolismo de Xenobióticos em *Piaractus mesopotamicus* (Pacu)**. Dissertação de doutorado. UERJ, 2001.

- BELIMOV, A.A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V.I.; DEMCHINSKAYA, S.V.; PILUZZA, G.; BULLITTA, S., et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with the roots of *Indian mustard* (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 241–250, 2005.
- BELTRAME, T.P.; RODRIGUES, E. Feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) na restauração de florestas tropicais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 19-28, jan./mar. 2007.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 21–34, 2005.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, 34, D16–D20, 2006.
- BOYD, E.F., ALMAGRO-MORENO, S.; PARENT, M.A. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. **Trends in Microbiology**, v. 17, p. 47–53, 2009.
- BRITO FILHO, D. Toxicologia Humana e Geral, 2. ed., Rio de Janeiro e São Paulo: **Livraria Atheneu**, 678 p., 1988.
- BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in plant seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3663–8, 1998.
- BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237–245, 2000.
- BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on dissection. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p. 143-147, 1977.
- CETESB, 2012 - Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental. Cádmiu e seus compostos. Ficha de informação toxicológica – FIT. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cadmio.pdf>> Acessado em 03/02/2014.
- CHANEY, R.L. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr, J.F.E.A. (Ed.), Land Treatment of Hazardous Wastes. **Noyes Data Corporation**, Park Ridge, NJ, p. 50–76, 1983.
- CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33–41, 2006.
- CHUANG, C.C.; KUO, Y.L.; CHAO, C.C.; CHAO, W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 575–584, 2007.

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; SONG, J.; CHO H, S.A.T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p.1970–1974, 2005.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J.A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D.M.; SUN, Y.; BROWN, C.T., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C.R., TIEDJE, J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 41(Database issue): D633-D642, 2014; Disponível em: <doi: 10.1093/nar/gkt1244 [PMID: 24288368]>.

CONAB, 2013: Acompanhamento da safra brasileira. Safra 2013/04 - Segundo levantamento. Brasília, 11p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acessado em 23 de agosto de 2014.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Review in Microbiology**, v. 21, p. 1–18, 1995.

DE ANDRADE, J.M.F.; DINIZ, K.M. **Impactos Ambientais da Agroindústria da Cana-de-açúcar: Subsídios para a Gestão**. Monografia (Especialista em Gerenciamento Ambiental). ESALQ-USP, Piracicaba-SP, 2007.

DE FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 358–364, 1997.

DELL'AMICO, E., CAVALCA, L., ANDREONI, V. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 153–162, 2005.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 61, p. 47–64, 1997.

DI GREGORIO, S.; BARBAFIERI, M.; LAMPIS, S.; SANANGELANTONI, A.M.; TASSI, E.; VALLINI, G. Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. **Chemosphere**, v. 63, p. 293–299, 2006.

DI GREGORIO, S.; BARBAFIERI, M.; LAMPIS, S.; SANANGELANTONI, A.M.; TASSI, E.; VALLINI, G. Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. **Chemosphere**, v. 63, p. 293–299.

DIMPKA, C.O.; MERTEN, D.; SVATOS, A.; BÜCHEL, G.; KOTHE, E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and

sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1687–1696, 2009.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, G.A. Cana-de-açúcar. 01 ed. Campinas, SP: **Instituto Agrônômico**, 2010.

DOTY, S.L.; SHANG, Q.T.; WILSON, A.M.; MOORE, A.L.; NEWMAN, L.A.; STRAND, S.E. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian P450 2E1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 97, p. 6287–6291, 2007.

DOURADO, M.N.; MARTINS, P.F.; QUECINE, M.C.; PIOTTO, F.A.; SOUZA, L.A.; FRANCO, M.R.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R.A. *Burkholderia* sp. SCMS54 Reduces Cadmium Toxicity and Promotes Growth in Tomato. **Annals of Applied Biology**, v. 163, p. 494-507, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/aab.12066>>.

ERAKHRUMEN, A.A. Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. **Educational Research Review**, v. 2, p. 151–156, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FANKEM, H.; NWAGA, D.; DEUBE, A.; DIENG, L.; MERBACH, W.; ETOA, F.X. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2450–2460, 2006.

FARIA, S.M.; CAMPELLO, E.F.C. Algumas espécies de leguminosas fixadoras de nitrogênio recomendadas para revegetação de áreas degradadas. Seropédica: **Embrapa- Agrobiologia**, 8 p. (Recomendação Técnica, 7), 2000.

FARWELL, A.J.; VESELY, S.; NERO, V.; RODRIGUEZ, H.; SHAH, S.; DIXON, D.G., et al. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. **Plant and Soil**, v. 288, p. 309–18, 2006.

FIGUEIREDO, M.M. "Absorção – Colunas de Enchimento", **Cadernos de Engenharia Química**, v. 1, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 1987.

FRIBERG, L. Further investigations on chronic cadmium poisoning; a study on rabbits with radioactive cadmium. A.M.A. **Archives of Industrial Hygiene Occupational Medicine**, v. 5, p. 30–36

GALDIANO JUNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; MACEDO LEMOS, E. G. M. Bactérias produtoras de auxinas isoladas de raízes de *Cattleya walkeriana*, orquídea Brasileira ameaçada de extinção, e sua função na aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** [online], v.35, n.3, p. 729-737, 2011. ISSN 0100-0683.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E., et al., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p.33–46, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>>.

GANESAN, V. Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. **Current Microbiology**, v. 56, p. 403–407, 2008.

GARDAN, L.; SHAFIK, H.; BELOUIN, S.; BROCH, R.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 469–478, 1999.

GAUR, A.C., OSTWAL, K.P. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 10, p. 393–394, 1972.

GERRETSON, F.C. The influence of microorganisms on the phosphorus uptake by plant. **Plant and Soil**, v.1, p. 51–81, 1948.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.

GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology advances**, v. 28(3), p. 367–374, 2010. Disponível em: <[doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001)>.

GOPALAKRISHNAN, S.; VADLAMUDI, S.; BANDIKINDA, P.; SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; KUDAPA, H.; VARSHNEY, R.K. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 1199–1210, 2012. Disponível em: <[doi: 10.1016/j.micres.2013.09.008](https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008)>.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K.T.; KLAPPENBACH, J.A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J.M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.81–91, 2007.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 387–394, 2009.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481–494, 2005.

GREIPSSON, S. Phytoremediation. **National Educational Knowledge**, v. 2, p. 7, 2011.

GRIEPINK, B.; TOLG, G. Sample digestion for the determination of elemental traces in matrices of environmental concern. **Pure & Applied Chemistry**, v. 61 (6), p. 1139–1146, 1989.

GRIMBERG, S.J. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2387–2392, 1996.

GUIMARÃES, M.D.A.; DE SANTANA, T.A.; SILVA, E.V.; ZENZEN, I.L.; LOUREIRO, M.E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, n. 3, v.1, p.58–68, 2008.

GUPTA, R.R.; SINGAL, R.; SHANKER, A.; KUHAD, R.C.; SAXENA, R.K. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 40, p. 255–260, 1994.

HAAS, D.; DEFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Review Microbiology**, v.3, p. 307–319, 2005.

HE, C.Q.; TAN, G.E.; LIANG, X.; DU, W.; CHEN, Y.L.; ZHI, G.Y.; et al. Effect of Zn-tolerant bacterial strains on growth and Zn accumulation in *Orychopragmus violaceus*. **Applied Soil Ecology**, v. 44, p. 1–5, 2010.

HE, L.Y.; CHEN, Z.J.; REN, G.D.; ZHANG, Y.F.; QIAN, M.; SHENG, X.F. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. **Exotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1343–8, 2009.

HE, Z.L.; WU, J.; O'DONNELL, A.G.; SYERS, J.K. Seasonal responses in microbial biomass carbon, phosphorus and sulphur in soils under pasture. **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 421–428, 1997.

HENDERSON, A.P.; SEETOHUL, L.N.; DEAN, A.K.; RUSSELL, P.; PRUNEANU, S.; ALI, Z. “A Novel Isotherm, Modelling Self-Assembled Monolayer Adsorption and Structural Changes”. **Langmuir**, v. 25, n. 2, p. 931–938, 2009.

HUSSEIN, H.S. Optimization of plant-bacteria complex for phytoremediation of contaminated soils. **International Journal of Botany**, v. 4, p. 437–43, 2008.

HWANGBO, H.; PARK, R.D.; KIM, Y.W.; RIM, Y.S.; PARK, K.H.; KIM, T.H.; SUCH, J.S.; KIM, K.Y. 2-ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacterintermedium*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 87–92, 2003.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília: IBAMA, 96p., 1990.

ILLMER, P.A.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 389–395, 1992.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília: IBAMA, 96p., 1990.

IDRIS, R.; TRIFANOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the nickel hyperaccumulator *Thlapsi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2667–77, 2004.

IKE, A.; SRIPRANG, R.; ONO, H.; MUROOKA, Y.; YAMASHITA, M. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. **Chemosphere**, v. 66, p. 1670–6, 2007.

INUI - KISHI, R.N.; KISHI, L.T.; PICCHI, S.C.; BARBOSA, J.C.; LEMOS, M.T.O.; MARCONDES, J.; MACEDO LEMOS, E.G. de. Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 7, p. 1446-1454, 2012.

JIANG, C-Y; SHENG, X-F; QIAN, M.; WANG, Q-Y. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere**, v. 72, p. 157–64, 2008.

JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 23, n. 5, p. 783–92, 2010. Disponível em: <[http:// doi10.1007/s10534-010-9328-y](http://doi10.1007/s10534-010-9328-y)>.

JUHAS, M.; VAN DER MEER, J.R.; GAILLARD, M.; HARDING, R.M.; HOOD, D.W.; et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Review**, v. 33, p. 376–393, 2009.

KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; GILLIS, M. & SCHLEIFER, K.H. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 465–477, 1996.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 42, p. 921–926, 2004.

KHAN, A.A.; JILANI, G.; AKHTAR, M.S.; NAQVI, S.M.S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 1(1), p. 48–58, 2009.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, p. 73–98, 2010.

KIM, K.Y.; MCDONALD, G.A.; JORDAN, D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 347–352, 1997.

KUFFNER, M.; PUSCHENREITER, M.; WIESHAMMER, G.; GORFER, M.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. **Plant and Soil**, v. 304, p. 35–44, 2008.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 17, p. 6–15, 2004.

KUMAR, K.V.; SINGH, N.; BEHL, H.M.; SRIVASTAVA, S. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. **Chemosphere**, v. 72, p. 678–83, 2008.

KUMAR, K.V.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, N.; BEHL, H.M. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 51–7, 2009.

KUMAR, V.; BEHL, R.K.; NARULA, N. Establishment of phosphate solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. **Microbiological Research**, v. 156, p. 87–93, 2001.

KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. **Springer**, printed in India, p.146-181, 2004.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many

geographic regions. 1997, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3614-3621.

LARSEN, A.L. Isoenzymes and varietal identification. **Seed World**, Northwest Highway, v.25, p.5-6, 1969.

LAST, R.L.; BISSINGER, P.H.; MAHONEY, D.J.; RADWANSKI, E.R.; FINK, G.R. Tryptophan mutants in *Arabidopsis* - the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. **The Plant Cell**, v. 3, p. 345–358, 1991.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.629, p.255-266, 1993.

LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 43, p. 422–442, 1979.

LI, W.C.; YE, Z.H.; WONG, M.H. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn- hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 4173–82, 2007.

LOH, K.C.; CAO, B. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida* – a review of proteomics studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 1–12, 2008.

LOPEZ, B.R.; BASHAN, Y.; BACILIO, M. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the Southern Sonoran Desert. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 527–54, 2011.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 831–7, 2009.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, C.T.JR.; SAXMAN, P.R.; STREDWICK, J.M.; GARRITY, G.M.; LI, B.; OLSEN, G.J.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. **Nucleic Acids Res.**, 28, 173–174, 2000.

MAIDEN, M.C.J.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MALIHA, R.; SAMINA, K.; NAJMA, A.; SADIA, A.; FAROOQ, L. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms

under in vitro conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 187–196, 2004.

MARMUR, J. A. Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal Molecular Biology**, v. 3, p. 208-218, 1961.

MENCH, M.; SCHWITZGUEBEL, J.P.; SCHROEDER, P.; BERT, V.; GAWRONSKI, S.; GUPTA, S. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, p. 876–900, 2009.

MENDOZA-CÓZATL, D.; LOZA-TAVERA, H.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, A.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 653–671, 2005.

MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; NAKONIECZNY, M.; MIGULA, P.; AUGUSTYNIAK, M.; TARNAWSKA, M.; REIMOLD, W.U.; KOEBERL, C.; PRZYBYLOWICZ, W.; GLOWACKA, E. Uptake of cadmium, lead, nickel and zinc from soil and water solutions by the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii*. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 46, p. 75–85, 2004.

MEYER, J.B.; FRAPOLLI, M.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene *pqqC*, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. **Applied and environmental microbiology**, v. 77(20), p.7345–54, 2011. Disponível em: <[http://doi: 10.1128/AEM.05434-11](http://doi:10.1128/AEM.05434-11)>.

MOORE, E.R.B.; MAU, M.; ARNSCHEIDT, A.; et al. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) and estimation of the natural intrageneric relationships. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 478–492, 1996.

MORRIS, R.O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. **Plant hormones and their Role in Plant Growth and Development** (ed. Davies PJ), p. 318–339, 1995.

MUKHOPADHYAY, S.; MAITI, S.K. Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. **Global Journal of Environmental Research**, v. 4, p. 135–150, 2010.

NARDIN, R. R. **Filter cake applied in argissolo and agronomic effects in two varieties of sugar-cane at two times of harvest**. 39 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Produção Agrícola) – Pós-Graduação – IAC, 2007.

NASCIMENTO, J.T.; SILVA, I.F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para o uso como cobertura de solos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 947-949, 2004.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265–270, 1999.

NENE, Y.L.; SHEILA, V.K. *Pigeon pea*: geography and importance. In: NENE, Y.L.; HALL, S.D.; SHEILA, V.K (Eds.). *The Pigeon pea*. **Cambridge Journals Online**, p.1-14, 1990.

NIE, L.; SHAH, S.; BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 355–61, 2002.

NORDBERG, G.F. Historical perspectives on cadmium toxicology. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p.192–200, 2009. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.taap.2009.03.015>>.

NORMANLY, J.; COHEN, J.D.; FINK, G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 10355–59, 1993.

ORROÑO, D.I.; LAVADO, R. S. Heavy metal accumulation in *Pelargonium hortorum*: effects on growth and development. **International journal of experimental botany**, v. 78, p. 4-11, 2009.

PADMAVATHIAMMA, P.K.; LI, L.Y. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. **Water Air Soil Pollution**. 184, 105–126, 2007.

PAIXÃO, D. A. A. **Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel**. Dissertação (doutorado em microbiologia). FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, 2009.

PAL, D.; MISHRA, P.; SACHAN, N.; GOSH, A. K. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L) Millsp. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 207, 2011.

PALIWAL, V.; RAJU, S.C.; MODAK, A.; PHALE, P.S.; PUROHIT, H.J. *Pseudomonas putida* CSV86: A Candidate Genome for Genetic Bioaugmentation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.008400>.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriologic**, v. 23, p. 333–339, 1973.

PALLERONI, N.J. Introduction to the *Pseudomonadaceae*. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, Vol. III, 2nd edn (Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer KH, eds). **Springer**, p. 3071–3085, 1992.

PALLERONI, N.J. & MOORE, E.R.B. Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. *Pseudomonas*. I. Genomics, **Life Style and Molecular Architecture** (Ramos JL, ed), p. 3–44, 2004.

PANTHIER, J.J.; DIEM, H.G.; DOMMARGUES, Y. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 11, p. 443-445, 1979.

PARK, K.-H.; LEE, C.-Y.; SON, H.-J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in applied microbiology**, v. 49(2), p.222–8, 2009. Disponível em: <[http://doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x](http://doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x)>

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOME, F. Practical isozyme genetics. New York: **Haisted Press**, 215 p., 1988.

PATIL, M.G.; SAYYED, R.Z.; CHAUDHARI, A.B.; CHINCHOLKAR, S.B. Phosphate Solubilizing Microbes: A Potential Bioinoculant for Efficient Use of Phosphate Fertilizers. In: Reddy SM, Reddy SR, Grisham S (eds) Bioinoculants for Sustainable Agriculture and Forestry. **Scientific Publisher, Jodhpur**, p 107–118, 2002.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207–220, 1996.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Promotoras de Crescimento em Milho (*Zea mays* L.)** Dissertação (doutorado em microbiologia). FCAV- UNESP, Jaboticabal-SP, 2009.

PELEGRINI, R.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V. M.; CONEGLIAN, C. M. R; BRITO, N. N.; DRAGONI SOBRINHO, G.; TONSO, S. Fitorremediação. In: **III Fórum de Estudos Contábeis**, 2003. Disponível em : <<http://www.ceset.unicamp.br/lte/Artigos/3fec2407.pdf>>.

PENATTI, C.P; DONZELLI, J.L. **Uso da Torta de Filtro em cana-de-açúcar**. Piracicaba, 7 pg. 1991.

PIACENTE, F. J.; PIACENTE, E. A. **Desenvolvimento Sustentável na Agroindústria Canavieira: uma discussão sobre os resíduos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 13 p. Artigo.

PIKOVSKAYA, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Microbiology**, v. 17, p. 362–370, 1948.

- PILON-SMITS, E. **Phytoremediation**. Annual Review of Plant Biology, v. 56, p. 15–39, 2005.
- PING, P.; OPATRILOVA, R.; ADAM, V.; KIZEK, R. Sunflower plants as bioindicators of environmental pollution with lead (II) ions. **Sensors**, v. 9, p. 5040–5058, 2009.
- PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SANTOS, E. A.; CECON, P. R. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de tebuthiuron. **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, p.451-458, 2003.
- PIRES, F.R.; PROCÓPIO, S.O.; SOUZA, C. M.; SANTOS, J. B.; SILVA, G.P. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Revista Caatinga Mossoró**, v.19, n.1, p.92-97, 2006.
- PIZZAIA, D. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” **Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*)**, tese, 2013.
- PONIEDZIALEK, M.; SEKARA, A.; JEDRSZCZYK, E.; CIURA, J. Phytoremediation efficiency of crop plants in removing cadmium, lead and zinc from soil, **Folia Horticulturae**, v. 22/2, p. 25- 31, 2010.
- PLUNKETT, E.R. Handbook of Industrial Toxicology, 3a ed. **Chemical Publishing Company Incorporation**, 95 p., 1987.
- PRADO, R.D.M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C.N.S. Filter Cake and Vinasse as Fertilizers Contributing to Conservation Agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, p.8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>>.
- PRAPAGDEE, B.; CHANPRASERT, M.; MONGKOLSUK, S. 2013. Bioaugmentation with Cadmium-Resistant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Assist Cadmium Phytoextraction by *Helianthus Annuus*. **Chemosphere**, v. 92, p. 659-666. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.082>>.
- PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3- acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 6, p. 609–615, 1993.
- PUENT, M.E.; BASHAN, Y.; LI, C.Y.; LEBSKY, V.K. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. **Plant Biology**, v. 6, p. 629–642, 2004.
- PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 389–401, 2009a.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 402–408, 2009b.

RAFATI, M.; KHORASANI, N.; MOATTAR, F.; SHIRVANY, A.; MORAGHEBI, F.; HOSSEINZADEH, S. Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. **International Journal Environmental Research**, v. 5, p. 961– 970, 2011.

RAJKUMAR, M.; NAGENDRAN, R.; LEE, K.J.; LEE, W.H.; KIM, S.Z. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. **Chemosphere**, v. 62, p. 741–6, 2006.

RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3491–8, 2008a.

RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. **Chemosphere**, v. 71, p. 834–42, 2008b.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Floresta e Ambiente**, p.120–129, 2001.

RANI, A.; SHOUCHE, Y.S.; GOEL, R. Dechlorination of copper toxicity in *Pigeon pea* and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain. **Current Microbiology**, v. 57, p. 78–82, 2008.

RASKIN, I.; ENSLEY, B.D. Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. **Wiley-Interscience**, 2000.

REED, M.L.E.; GLICK, B.R. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth- promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1061–9, 2005.

RENGEL, Z.; MARSCHNER, P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. **New Phytology**, v. 168, p. 305–312, 2005.

REYES, I.; BAZIRAMAKENGA, R.; BERNIER, L.; ANTOUN, H. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild type strain and two UV induced mutants of *Penicillium regulosum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1741–1747, 2001.

RICHARDSON, A.E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C.E.; DOUBEAND, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. (eds) **Soil biota: management in sustainable farming systems**. CSIRO, Victoria, Australia, p 50–62, 1994.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p. 897–906, 2001.

RIDGWAY, H.F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline- degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3565–3575, 1990.

RODRIGUES FILHO, F. S.O.; GERIN, M. A. N.; FEITOSA, C. T.; IGUE, T.; SANTOS, R. R. Adubação verde e orgânica para o cultivo do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 88-93, 1996.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; VESSELY, S.; SHAH, S.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of nickel resistant *Pseudomonas* strains and their effect on the growth of non-transformed and transgenic canola plants. **Current Microbiology**, v. 57, p. 170–4, 2008.

RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I., SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; DEL RIO, L.A. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. **Free Radical Research**, London, v.31, p. 25-31, 1999.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant, cell and environment**, v.25, p. 677-686.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1–9, 2008.

SABER, K.; NAHLA, L.D.; CHEDLY, A. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. **Agronomy Sustainable Development**, v. 25, p. 389–393, 2005.

SAFRANOVA, V.I.; STEPANOK, V.V.; ENGQVIST, G.L.; ALEKSEYEV, Y.V.; BELIMOV, A.A. Root associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 267–72, 2006.

SANITÁ DI TOPPI, L.; GABRIELLI, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 41, p. 105-130, 1999.

SANTOS, D.H.; SILVA, M.A.; TIRITAN, C.S.; FOLONI, J.S.S.; ECHER, F.R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, PB, v.15, n.5, p.443–449, 2011.

SANTOS, L. F. P. **Avaliação dos teores de cádmio e chumbo em pescado proveniente de São Francisco do Conde, Bahia**. Dissertação de Mestrado em Nutrição, Universidade Federal da Bahia, 2013.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20 (5), p. 282-285, 1995.

SEIFFERT, N. F.; THIAGO, L. R. L. S. Legumineira cultura forrageira para produção de proteína: guandu (*Cajanus cajan*). **EMBRAPA-CNPQC**, 52p., (Circular Técnica 13), 1983.

SEKARA, A.; PONIEDZIALEEK, M.; CIURA, J.; JEDRSZCZYK, E. Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, p. 509–516, 2005.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2(1), p.587, 2013. Disponível em: <http://www.springerplus.com/content/2/1/587> [Acessado em 04 de junho de 2014].

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. **Springer**, printed in India, p.84-126, 2004.

SHENG, X-F; XIA, J-J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. **Chemosphere**, v. 64, p. 1036–42, 2006.

SHENG X-F, XIA J-J, JIANG C-Y, HE L-Y, QIAN M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. **Environmental Pollution**, v.156, p. 1164–70, 2008a.

SHENG, X-F; JIANG, C-Y, HE, L-Y. Characterization of plant growth-promoting *Bacillus edaphicus* NBT and its effect on lead uptake by Indian mustard in a lead-amended soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 417–22, 2008b.

SHENG, X.; HE, L.; WANG, Q.; YE, H.; JIANG, C. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in cadmium-amended soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, p. 17–22, 2008c.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A.; POONIA, P. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. **Criticals Review in Environmental Science and Technology**. v. 41, p. 168–214, 2011.

SHILEV, S.; FERNANDEZ, A.; BENLLOCH, M.; SANCHO, E.D. Sunflower growth and tolerance to arsenic is increased by the rhizospheric bacteria *Pseudomonas fluorescens*. In: Morel J-L, ECHEVARRIA, G.; GONCHAROVA N., editors. *Phytoremediation of Metal Contaminated Soils*. Netherlands: **Springer**, p. 315–26, 2006.

SILBY, M.W.; WINSTANLEY C.; GODFREY, S.A.; LEVY, S.B.; JACKSON, R.W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Review**, v. 35, p. 652–680, 2011.

SINGAL, R.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. Rock phosphate solubilization under alkaline conditions by *Aspergillus japonicus* and *A. foetidus*. *Folia Microbiology*, v. 39, p. 33–36, 1994.

SINGH, S. Phytoremediation: a sustainable alternative for environmental challenges. **International Journal of Green and Herbal Chemistry**. v.1, p.133–139, 2012.

SOMEYA, N.; SATO, Y.; YAMAGUCHI, I.; HAMAMOTO, H.; ICHIMAN, Y.; AKUTSU, K. Alleviation of nickel toxicity in plants by a rhizobacterium strain is not dependent on its siderophore production. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 38, p. 1155–62, 2007.

SOUZA, E.P. DE; FRANÇA, I. DE, FERREIRA, L.E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, p.167–173, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev** 31: 425–448, 2007.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3(4), p.1–13. Disponível em: <<http://doi:10.1101/cshperspect.a001438>>.

SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 778–781, 1958a.

SPERBER, J.I. Solubilization of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 782–787, 1958b

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, p. 159–271, 1966.

SYMANSKI, C.S. **Caracterização de bactérias mesófilas presentes em processo de compostagem**. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, Porto Alegre, RS, 2005.

TAHA, S.M.; MAHMOUD, S.A.Z.; EL-DAMATY, A.A.; ABD EL- HAFEZ, A.M. Activity of phosphate dissolving bacteria in Egyptian soil. **Plant Soil**, v. 31, p. 149, 1969.

TANG H., YAO, Y., WANG, L., YU, H., REN, Y., WU, G., XU, P. Genomic analysis of *Pseudomonas putida*: genes in a genome island are crucial for nicotine degradation, **Scientific Reports**, v. 2, p. 377, 2012.

TANGAHU, B.V., ABDULLAH, S.R.S., BASRI, H., IDRIS, M., ANUAR, N., MUKHLISIN, M. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/939161>>.

TANK, N.; SARAF, M. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 1-10, 2008

TRIPATHI, M.; MUNOT, H.; SHOUCHE, Y.; MEYER, J.M.; GOEL, R. Isolation and functional characterization of siderophore producing lead and cadmium resistant *Pseudomonas putida* KNP9. **Current Microbiology**, v. 50, p. 233–7, 2005.

VALLS, M.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. **Public Library of Science - PLOS**, v. 2, p. 798–807, 2006.

VAN DER MAESEN, L. J. G. Origin, History and Taxonomy of *Pigeon pea*. In: Pigeonpeas. **CAB International/ International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics, Oxford**, v.15, p. 46, 1990.

VANDEPUTTE, O.; ODEN, S.; MOL, A.; VEREECKE, D.; GOETHALS, K.; EL JAZIRI, M.; PRINSEN, E. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1169–1177, 2005.

VANGRONSVELD, J.; HERZIG, R.; WEYENS, N.; BOULET, J.; ADRIAENSEN, K.; RUTTENS, A.; THEWYS, T.; VASSILEV, A.; MEERS, E.; NEHNEVAJOVA, E.; VAN DER LELIE, D.; MENCH, M. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, p. 765–794, 2009.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of

mangroves in a semi-arid coastal lagoon. **Soil Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460–468, 2000.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 364–372, 2009.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PloS one**, v. 8, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://doi:10.1371/journal.pone.0057923>>.

VISHNOI, S.R.; SRIVASTAVA, P.N. Phytoremediation-green for environmental clean. In: **The 12th World Lake Conference**, p. 1016–1021, 2008.

VIVAS, A.; AZCÓN, R.; BIRÓ, B.; BAREA, J.M.; RUIZ-LOZANO, J.M. Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted oil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 577–88, 2003.

VYAS, P.; GULATI, A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 174, 2009.

WAGNER, G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances of Agronomy**. v. 51, p. 173-212, 1993.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. **Chemosphere**, v. 70, p. 36–45, 2007

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Effect of metal-tolerant plant growth-promoting *Rhizobium* on the performance of pea grown in metal-amended soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 33–42, 2008.

WANI, P.A.; ZAIDI, A.; KHAN, A.A.; KHAN, M.S. Effect of phosphate on phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) releasing potentials of rhizospheric microorganisms. **Annals of Plant Protection Sciences**, v.13, p. 139–144, 2005.

WHITED, G.M.; GIBSON, D.T. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1, **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3017–3020, 1991.

WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; HELYAR, K.R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 655–665, 1999.

WHITING, S.N.; DE SOUZA, M.P.; TERRY, N. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thiapsi caerulescens*. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 3144–50, 2001.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: Regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p. 707–735, 2005.

WRIGHT, E.S.; YILMAZ, L.S.; NOGUERA D.R. "DECIPHER, A Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences." **Applied and Environmental Microbiology**, 2012. Disponível em: <doi:10.1128/AEM.06516-11>.

WU, C.H.; WOOD, T.K.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1129–34, 2006a.

WU, S.C.; CHEUNG, K.C.; LUO, Y.M.; WONG, M.H. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. **Environmental Pollution**, v. 140, p. 124–35, 2006b.

WUANA, R.A.; OKIEIMEN, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **ISRN Ecology**, v. 1, p. 20, 2011.

YADAV, R.; ARORA, P.; KUMAR, S.; CHAUDHURY, A. Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1574–1588, 2010.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D.L.; JACKSON, R.W.; VIVIAN, A.; HARAYAMA, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385–2394, 2000.

YE, J.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T.L. BLAST: improvements for better sequence analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 6–9, 2006.

YOON, J.; CAO, X.; ZHOU, Q.; MA, L.Q. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 456–464, 2006.

YONG, X.; CHEN, Y.; LIU, W.; XU, L.; ZHOU, J.; WANG, S.; CHEN, P.; ZHENG, T. Enhanced cadmium resistance and accumulation in *Pseudomonas putida* KT2440 expressing the phytochelatin synthase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. **Letters in applied microbiology**, v. 58(3), p.255–61. Disponível em: <http://doi:10.1111/lam.12185>.

ZACCHINI, M.; PIETRINI, F.; MUGNOZZA, G.S.; IORI, V.; PIETROSANTI, L.; MASSACCI, A. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. **Water Air Soil Pollution**, v. 197, p. 23–34, 2009.

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHEMAD, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. In: Khan MS et al (eds) **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 23–50, 2009.

ZAIDI, S.; USMANI, S.; SINGH, B.R.; MUSARRAT, J. Significance of *Bacillus subtilis* SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. **Chemosphere**, v. 64, p. 991–7, 2006.

ZHOU, K.; BINKLEY, D.; DOXTADER, K.G. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. **Plant and Soil**, v. 147, p. 243–250, 1992.