

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

**ACÚMULO DE CÁDMIO, CRÔMIO E NÍQUEL E  
ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIAIS  
PARA BIORREMEDIAÇÃO EM ÁREA AGRÍCOLA**

**Guilherme Deomedesse Minari  
Tecnólogo em Biocombustíveis**

**2016**

**D  
I  
S  
S.**

**/**

**M  
I  
N  
A  
R  
I**

**G.  
D.**

**2  
0  
1  
6**

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

**ACÚMULO DE CÁDMIO, CRÔMIO E NÍQUEL E  
ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIAIS  
PARA BIORREMEDIAÇÃO EM ÁREA AGRÍCOLA**

**Guilherme Deomedesse Minari**

**Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves**

**Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Maria Saran**

**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 Microbiologia Agropecuária**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M663 Minari, Guilherme Deomedesse  
a Acúmulo de cádmio, crômio e níquel e isolamento de micro-organismos potenciais para biorremediação em área agrícola / Guilherme Deomedesse Minari. -- Jaboticabal, 2016  
vi, 87 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves  
Banca examinadora: Luciana Maria Saran, Mariana Carina Frigieri, David Luciano Rosalen  
Bibliografia

1. Contaminação do solo. 2. Distribuição Espacial. 3. Resistência. 4. Fitorremediação I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:631.461

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



# CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ACÚMULO DE CÁDMIO, CRÔMIO E NÍQUEL E ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIAIS PARA BIORREMEDIAÇÃO EM ÁREA AGRÍCOLA

**AUTOR. GUILHERME DEOMEDESSE MINARI**

**ORIENTADORA. LUCIA MARIA CARARETO ALVES**

COORIENTADORA: LUCIANA MARIA SARAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN

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

Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI

Centro Est. de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC Jaboticabal/SP

Prof. Dr. DAVID LUCIANO ROSALEN

Departamento de Engenharia Rural / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Jaboticabal 03 de fevereiro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Guilherme Deomedesse Minari** – nascido em Jaboticabal, estado de São Paulo, em 21 de novembro de 1991. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis em março de 2010 pelo Centro Paula Souza – Faculdade de Tecnologia (FATEC) de Jaboticabal, Jaboticabal – SP, obtendo o título de Tecnólogo em Biocombustíveis em dezembro de 2012. Durante sua graduação foi estagiário dos Laboratórios de Nematologia e Saneamento Ambiental, Departamentos de Fitossanidade e Engenharia Rural, respectivamente, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal. Seu trabalho de conclusão de curso foi realizado no laboratório de microbiologia da FATEC Jaboticabal, tendo como objetivo avaliar o controle de contaminantes bacterianos na fermentação etanólica, adotando como antimicrobianos naturais óleo de orégano e extrato de lúpulo. Em agosto de 2013 ingressou no programa de Pós-Graduação, curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), sob orientação das Professoras Dra. Lucia Maria Carareto Alves e Dra. Luciana Maria Saran, ambas do Departamento de Tecnologia.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

Aos meus pais, Cristiano e Liliane, por me apoiarem e acreditarem em mim.

**Dedico**



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, pois em todos os momentos Ele esteve ao meu lado, me capacitando.

Aos meus pais, Cristiano e Liliane, por confiarem e acreditarem em mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, pela orientação, apoio e transferência de conhecimentos.

À coorientadora Profa. Dra. Luciana Maria Saran, pelos ensinamentos, dedicação e acima de tudo pela amizade.

Ao Dr. João Carlos Campanharo e ao José Carlos de Freitas, que atuam como Assistentes de Suporte Acadêmico II junto ao Departamento de Tecnologia da FCAV (UNESP), por não medirem esforços para colaborar no desenvolvimento da pesquisa.

À equipe do Núcleo de Geomática e Agricultura de Precisão - NGAP, sob supervisão do Prof. Dr. David Luciano Rosalen.

À Profa. Dra. Mara Cristina Pessôa da Cruz, por ter contribuído desde o início e por sempre estar disponível.

A toda equipe da FEPE (Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da FCAV/UNESP).

Ao Prof. Dr. Wanderley José de Melo e ao técnico Danilo Olandino de Souza por todo suporte oferecido.

Ao Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta por ter cedido seu laboratório para realização de algumas análises.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, que juntamente com a Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves cedeu o laboratório, equipamentos e reagentes para a realização de toda a pesquisa microbiológica.

À Dra. Camila Cesário Fernandes, Dra. Silvana Pompeia do Val de Moraes e ao Dr. Luciano Kishi, por toda ajuda na parte de sequenciamento e interpretação dos dados de bioinformática e biologia molecular.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas e do Laboratório de Química Analítica e Ambiental: Amanda Schmidt Célico, Géssica Aparecida Silveira, Ruth Helena Giansante e Laís Postai Sacco, pelos momentos de companheirismo.

Aos estagiários Leonardo de Freitas Zechin e Maria Rosa Soares, pelo apoio e dedicação na coleta e processamento dos dados experimentais.

A toda minha família.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

**A vocês, meu singelo agradecimento!**

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	v
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais .....	1
1.1. Introdução .....	1
1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
1.2.1. Solo e uso agrícola .....	2
1.2.2. Contaminação do solo por metais pesados.....	4
1.2.3. Uso de bactérias para a diminuição do teor ou remoção de metais pesados	7
1.3 Referências .....	9
CAPÍTULO 2 - Uso agrícola como fator de acumulação de metais pesados em Latossolo .....	17
2.1 Introdução .....	22
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Amostragem.....	24
2.2.2 Atributos químicos do solo .....	25
2.2.3 Elaboração dos mapas de distribuição espacial.....	26
2.2.4 Análise estatística .....	26
2.3 Resultados e discussão.....	27
2.3.3 Análise de componentes principais.....	29
2.4 Conclusões .....	38
2.5 Referências .....	38
CAPÍTULO 3 – Isolamento e identificação de bactérias resistentes a cádmio, cromo e níquel com potencial para biorremediação .....	43
3.1 Introdução .....	44
3.2 Metodologia.....	46
3.2.1 Amostras de solo .....	46
3.2.2 Determinação de Cd, Cr e Ni em amostras de solo.....	48
3.2.3 Isolamento de bactérias resistentes a Cd, Cr e Ni.....	48

3.2.4	Solubilização de fósforo .....	49
3.2.5	Produção de ácido indolacético (AIA).....	49
3.2.6	Identificação de bactérias.....	49
3.3	Resultados e discussão.....	51
3.3.1	Características do solo.....	51
3.3.2	Bactérias resistentes a metais pesados .....	53
3.3.3	Índice de solubilização de fosfato (MSP) e produção de AIA por bactérias resistentes a metais .....	55
3.3.4	Identificação dos isolados .....	59
3.4	Conclusões .....	66
3.5	Referências .....	66
4	Considerações Finais .....	75
ANEXO	.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média para Cd, Cr e Ni nas diferentes sub-áreas que compõem a área experimental. ....	28
Tabela 2. Concentrações limites de Cd, Cr e Ni para qualidade do solo, de acordo com o CONAMA e a CETESB. ....	28
Tabela 3. Valores das áreas classificadas segundo os critérios adotados para os metais pesados na área experimental.....	29
Tabela 4. Valores dos componentes principais encontrados na respectiva análise..	30
Tabela 5. Coordenadas plano-retangulares (Projeção UTM) .....	47
Tabela 6. Concentrações de níquel (Ni), cádmio (Cd) e cromo (Cr) nas amostras de solos utilizadas para isolar bactérias resistentes a metais pesados; número total de bactérias por grama de solo (UFC/ g solo) e número de isolados morfológicamente diferentes obtidos.....	52
Tabela 7. Produção de ácido indolacético (AIA), índice de solubilização de fosfato e resistência a 5 mmol L <sup>-1</sup> por 13 isolados bacterianos de solo agrícola. ....	56
Tabela 8. Análise, comparação e identificação das sequencias do gene 16SrRNA. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Projeção espacial e biplot das componentes principais (Relação: variáveis/amostras).....	31
Figura 2. Variabilidade espacial de matéria orgânica (MO) em Latossolo vermelho Eutroférico. ....	34
Figura 3. Variabilidade espacial de cádmio (Cd) em Latossolo vermelho Eutroférico. ....	35
Figura 4. Variabilidade espacial de cromo (Cr) em Latossolo vermelho Eutroférico. ....	36
Figura 5. Variabilidade espacial de níquel (Ni) em Latossolo vermelho Eutroférico.	37
Figura 6. Número de isolados bacterianos resistentes às concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L <sup>-1</sup> de Cd, Cr e Ni em meio DYGS. ....	53
Figura 7. Análise filogenética molecular pelo método <i>Maximum Likelihood</i> (baseado no modelo Tamura-3) com bootstrap de mil repetições e análises evolutivas realizadas no MEGA v.6. ....	62

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

- pH:** potencial hidrogeniônico
- MO:** matéria orgânica
- MN:** mata nativa
- PC:** plantio convencional
- PL:** plantio com lodo de esgoto
- PD:** plantio direto
- Cd:** cádmio
- Cr:** cromo ou crômio
- Ni:** níquel
- AIA:** ácido indol acético
- mm:** milímetro
- Mg:** megagrama
- mg kg<sup>-1</sup>:** miligrama por quilograma
- mL:** mililitro
- °C:** grau Celsius
- min:** minuto
- h:** horas
- ha:** hectare
- µL:** microlitro
- g:** grama
- mmol L<sup>-1</sup>:** milimol por litro
- rpm:** rotação por minuto
- nm:** nanometro
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- VR:** valor de referência
- VRQ:** valor de referência de qualidade
- VP:** valor de prevenção
- CP:** componente principal
- ACP:** análise de componentes principais
- UFC:** unidade formadora de colônias

**CaCl<sub>2</sub>**: cloreto de cálcio

**HNO<sub>3</sub>**: ácido nítrico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrogênio

**HCl**: ácido clorídrico

**NaCl**: cloreto de sódio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: dihidrogenofosfato

**MgSO<sub>4</sub>**: sulfato de magnésio

**VI**: valor de intervenção

**CV**: coeficiente de variação

**UTM**: universal transverso de mercator

**PCR**: reação da cadeia da polimerase

**MSP**: micro-organismos solubilizadores de fosfato

**PGP**: plant growth promoting bacteria

**EPS**: exopolissacarídeos



## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **1.1. Introdução**

Estima-se que a população mundial está em torno de 7,3 bilhões de pessoas com crescimento pré-determinado para 10 bilhões em 2050. Esse aumento populacional acentua a demanda por alimentos e, portanto, práticas agrícolas aplicadas sucessivamente nos solos e, de maneira errônea, têm causado severos danos aos ecossistemas (OLIVEIRA e PEREIRA, 2014).

Um dos principais bens naturais, o ecossistema solo, exerce diversas funções como: proteger e manter o ciclo das águas subterrâneas; conservar nutrientes; possibilitar a prospecção de micro-organismos e fornecer condições necessárias para a produção de alimentos (CETESB, 2015). O solo deveria ser visto, pela sociedade, como um bem natural que fornece condições para sua existência; entretanto, devido ao uso impróprio está sendo local para descarte de contaminantes (CAI et al., 2015). Sua contaminação está relacionada à disposição inadequada de resíduos industriais e domésticos, produtos químicos, fertilizantes e insumos agrícolas, dentre outros (ANDRADE et al., 2013).

No caso de áreas agrícolas, a área de solo destinada a agropecuária é estimada em cerca de 224 milhões de hectares (FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2011), sendo no Brasil aproximadamente 68 milhões de hectares (OLIVEIRA, 2012). A contaminação dos solos destinados à agricultura está relacionada à práticas agrícolas como o uso de fertilizantes minerais, agroquímicos e lodo de esgoto (COSTA et al., 2010; BONO et al., 2013; ENSINAS et al., 2014), sendo que o uso excessivo de qualquer um dos materiais citados afeta diretamente a qualidade do meio (FERREIRA, 2001).

Um dos meios de contaminação do solo é a fertilização (MORTVEDT, 1996; RIBERIRO, 2013), sendo que, segundo Mortvedt e Beaton (1995), em alguns países, os fertilizantes fosfatados representam a principal fonte de contaminação dos solos por cádmio (Cd) e por outros elementos, como arsênio (As), cromo (Cr), chumbo (Pb), cobre (Cu), cobalto (Co), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e níquel (Ni), que podem causar impactos negativos ao ambiente (AMARAL SOBRINHO et al., 2009). Esterco animal, lodo de esgoto e até mesmo fertilizantes

minerais, quando aplicados sucessivamente no solo, podem contaminá-lo com metais pesados (McBRIDE, 2003).

Mediante ao exposto, o objetivo com este trabalho foi caracterizar e avaliar a distribuição espacial de Cd, Cr e Ni em solo agrícola submetido a atividades agrícolas consecutivas como: fertilização a base de aplicação de lodo de esgoto (por 17 anos) e aplicação de fertilizantes minerais (há 80 anos), bem como isolar, caracterizar e identificar bactérias resistentes a estes metais que possam ser úteis em processos de fitorremediação ou que tenham aplicação biotecnológica.

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1. Solo e uso agrícola**

O solo é constituído de matéria viva, partes sólidas, líquidas e gasosas, materiais minerais e orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do planeta. É formado por alteração da rocha-mãe, ocasionada pela interação de processos de natureza física, química e biológica que levam a degradação da rocha (SANTOS e BATISTA, 2015). Esse importante recurso ambiental tem como funções oferecer proteção e manter o ciclo das águas subterrâneas; conservar de nutrientes; possibilitar a prospecção dos micro-organismos e ainda, ser condição necessária para a produção de alimentos (CETESB, 2015).

Os solos classificados como Latossolos são solos minerais, profundos, com coloração homogênea e apresentam distribuição mais ou menos uniforme de argila ao longo do perfil. São bem drenados, com baixa capacidade de troca de cátions, com textura média ou mais fina (argilosa, muito argilosa) e pouco férteis (KER, 1997).

Práticas inadequadas de manejo causam diminuição dos estoques de matéria orgânica do solo, sendo a matéria orgânica de extrema importância para o fornecimento de nutrientes às plantas, retenção de cátions, complexação de elementos tóxicos e micronutrientes (COSTA et al., 2010; ENSINAS et al., 2014). O sistema convencional de manejo ou cultivo é responsável por provocar inversão da

camada arável do solo, sendo indicado quando há necessidade de incorporação de corretivos ou rompimento de camadas compactadas. Silva et al. (2000) relatam que áreas agrícolas com maiores perdas de solo são as que adotam manejo de sistema convencional, pois ele favorece a compactação do solo causada pelo tráfego de máquinas por ocasião da semeadura, tratos culturais, colheita e transporte.

A diminuição da concentração de matéria orgânica tem sido observada em sistema convencional de cultivo que adota operações com intenso revolvimento do solo, sendo a taxa de saída de carbono e nitrogênio, normalmente, maior que a taxa de entrada, o que contribui na redução da fertilidade do solo (ENSINAS et al., 2014). Em seu estudo, Ensinas et al. (2014) relataram que solo sob vegetação nativa apresentou as maiores concentrações de carbono orgânico total e que sob plantio direto houve menor acidificação do solo, e os maiores teores de cálcio, magnésio, potássio e fósforo. Relataram também que o sistema plantio direto promoveu aumento nos estoques de (C) do solo, o que indica aumento da concentração de matéria orgânica, sendo diferente do sistema convencional de manejo.

O manejo por sistema de plantio direto proporciona melhor qualidade do solo, pois reduz a erosão, favorece a reciclagem de nutrientes, a atividade biológica e o manejo de resíduos culturais, além de contribuir para o aumento do teor de matéria orgânica (CERETTA et al., 2002). Este sistema consiste no não revolvimento do solo, mantendo-o coberto com resíduos vegetais e, segundo Smeda e Weller (1996), a ausência de revolvimento do solo e a cobertura morta podem eliminar a aplicação de herbicidas.

Sistemas com aplicação de lodo de esgoto ainda não estão amplamente difundidos no Brasil, mas vários estudos comprovaram a eficácia da utilização deste resíduo em sistemas agrícolas (SILVA et al., 2002) e florestais (DE MARIA et al., 2007). Por ser rico em matéria orgânica e em nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), seu uso é direcionado, depois de devidamente tratado (MELO et al., 2001), para fertilização de culturas, proporcionando aumento na produtividade (TRANNIN et al., 2008). Entretanto, a possível presença de poluentes, como metais pesados, patógenos e compostos orgânicos persistentes são fatores que podem provocar impactos ambientais negativos (FYTILI e ZABANIOTOU 2008; LIMA, 2011). Os metais pesados presentes no lodo de esgoto podem movimentar-se no

perfil dos solos mediante processos físico-químicos ou biológicos, atingindo águas subterrâneas e superficiais. Tal movimento está relacionado ao equilíbrio entre as formas químicas encontradas no solo após a sua adição (FILIZOLA et al., 2006).

Em área agrícola após aplicação de lodo de esgoto por sete anos consecutivos, Coscione et al. (2014) relataram a importância do efeito residual da degradação da matéria orgânica e que aplicações sucessivas de lodo de esgoto proporcionaram aumento de C e N no solo.

### **1.2.2. Contaminação do solo por metais pesados**

Metal pesado é todo elemento com alto caráter tóxico, densidade maior que  $6 \text{ g cm}^{-3}$  e que apresenta relação direta com poluição (SANTOS et al., 2015). Podem ser divididos em essenciais e não essenciais. Os essenciais estão presentes naturalmente em todos os organismos; porém, quando em concentrações elevadas podem ser tóxicos. Os considerados não essenciais são prejudiciais em concentrações mínimas e não apresentam efeitos benéficos aos organismos (CHANDRASEKARAN et al., 2015).

Devido ao fato de metais pesados estarem presentes em fertilizantes e corretivos, estes, quando utilizados, favorecem a entrada de metais no solo, no qual eles permanecem por tempo indeterminado, evidenciando risco ao meio. Qualquer solo submetido a sistemas de cultivo por longos períodos tendem a apresentar concentrações mais elevadas de metais, já que fertilizantes minerais contêm metais pesados, sendo, portanto, fontes desses elementos para o ambiente (FILIZOLA et al., 2006).

A forma e a ligação do metal nas superfícies reativas dos vários compostos do solo podem originar diferentes espécies com distintas energias de ligação. Os metais estão associados às frações do solo por meio de ligações mais fortes ou mais fracas, conforme a fração em que eles se encontram, podendo ser: solúveis; trocáveis; ligados aos carbonatos, à matéria orgânica, aos óxidos de Al, Fe e Mn ou aos silicatos (LIMA, 2011).

Apesar da mobilização destes metais no solo, normalmente a região de maior concentração é o horizonte superficial, onde se encontra também a maior

concentração de matéria orgânica, que possibilita a formação de quelatos, deixando-os imobilizados (FILIZOLA et al., 2006).

A água, o pH e a presença de ligantes orgânicos são fatores que propiciam a solubilização dos metais no solo, sendo estes os mais importantes em relação à disponibilidade e mobilidade desses elementos. O pH do solo é um dos seus atributos mais importantes no que se refere à capacidade de adsorção de metais, pois afeta diretamente a solubilidade (GARG et al., 2007; SANTOS e SANTOS, 2008; GARG et al., 2009). Portanto, contaminações ocorrem quando os metais pesados provenientes de atividades antrópicas somam-se aqueles de origem natural, causando efeitos adversos. Esses elementos interferem nos processos enzimáticos e, em consequência de sua baixa mobilidade, exercem efeitos acumulativos nos seres vivos. Isso faz com que provoquem alterações no metabolismo, podendo levar até mesmo a morte de organismos (SOUZA, 2014). A exposição do ser humano e dos animais a metais pesados pode ocorrer por diversas vias, especialmente pela cadeia alimentar (HARMANESCU et al., 2011).

Alguns metais despertam grande interesse por serem prejudiciais à microbiota e aos seres humanos. Neste trabalho serão destacados o Cd, o Cr e o Ni.

O Cd é encontrado naturalmente nos solos pelo desgaste da rocha de origem, sendo as rochas sedimentares as que apresentam o maior teor deste metal. É constituinte dos fertilizantes fosfatados, os quais são fontes de contaminação para solos agrícolas (RIBEIRO, 2013). Sua adsorção e mobilidade dependem do pH do solo, da matéria orgânica e dos óxidos de ferro e manganês (ATSDR, 2012). Nos seres humanos pode induzir à disfunção renal, hipertensão e até mesmo o câncer (HARMANESCU et al., 2011). Por outro lado, o cádmio pode causar danos irreversíveis às células bacterianas, pois se liga a proteínas respiratórias e produz oxigênio reativo, além de reduzir a taxa de crescimento, diminuir a densidade celular e, até mesmo, levar a morte (LEE et al., 2001).

O Cr é encontrado nos solos associado com óxidos de elementos como Pb e Fe. Sua forma trivalente, Cr(III), é a forma natural e mais estável no ambiente, enquanto que sua forma hexavalente, Cr(VI), provém de atividades antrópicas poluidoras sendo 500 vezes mais tóxica do que a forma trivalente (GUPTA et al., 2010; RIBEIRO, 2013). A oxidação de Cr(III) para Cr(VI) ocorre em função do pH, da

disponibilidade de óxidos de manganês, da presença de compostos orgânicos com baixa massa molecular e da presença de água no solo. Já a redução de Cr(VI) para Cr(III) dependerá de fatores físico-químicos como o pH, a presença de matéria orgânica e de íons ferrosos, e a quantidade de oxigênio no solo, além da ação microbiana que por meio da diminuição da concentração de oxigênio e do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> pode reduzir Cr(VI) à Cr(III) (CCME, 1999c). Algumas bactérias apresentam capacidade para reduzir Cr(VI) à Cr(III), forma menos tóxica (MAQBOOL et al., 2015).

Em seres humanos, o Cr pode causar problemas na artéria tireóide, que é responsável por irrigar a glândula tireóide; policitemia sobre a produção de glóbulos vermelhos (hemácias) e danos na artéria coronária direita (KHAN et al., 2013)

O Cr(VI) e suas formas reduzidas como o (III) podem causar, dentro de células bacterianas, ligação cromo-DNA (ligação do Cr com bases nitrogenadas ou grupamento fosfato, resultando em erros de pareamento de bases e de replicação). Pode também formar ligação cruzada entre proteínas-cromo-DNA, prejudicando a síntese protéica (CONCEIÇÃO, 2006).

Um outro metal que desperta interesse é o Ni. Em solos, o teor de Ni tem aumentado muito devido a atividades antrópicas como descarte incorreto de resíduos, aplicação de fertilizantes e pesticidas agrícolas e aplicação de lodo de esgoto. Mesmo sendo considerado um micronutriente de plantas, devido ser constituinte do sítio ativo da enzima urease, que é responsável por hidrolisar ureia em amônia e bicarbonato, é considerado um poluente de solos (LOPEZ e MAGNITSKI, 2011). Porém, quando em quantidades excessivas pode causar em plantas, por exemplo, desenvolvimento insuficiente (SOUZA, 2014). Sua disponibilidade está diretamente relacionada com características de plantas e do solo, como: pH, potencial redox, textura, capacidade de troca catiônica (CTC), matéria orgânica e presença de outros metais pesados.

A ingestão de Ni pode causar alguns problemas graves de saúde para humanos, incluindo erupções cutâneas, tonturas, parada cardíaca fatal, fadiga, dentre outros (KHAN et al., 2013). Em micro-organismos este íon pode provocar hipometilação (que aumenta a susceptibilidade à quebra dos cromossomos) ou hipermetilação (que causa instabilidade dos cromossomos) e inibe a transcrição e

síntese de novos compostos como proteínas. Portanto, a genotoxicidade deste metal pode ser devida a danos no DNA, formação de ligação cruzada de DNA-proteína e interações com proteínas da cromatina (proteínas histonas que envolvem o DNA favorecendo o seu enovelamento) (ROSSMAN, 1995; ANJUM et al., 2015).

A compreensão da variabilidade dos metais no solo permite avaliar riscos ambientais, proporcionando uma gestão mais eficiente do uso de resíduos, como lodo de esgoto e agroquímicos para fins agrícolas (LIN et al., 2002).

### **1.2.3. Uso de bactérias para a diminuição do teor ou remoção de metais pesados**

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos, sendo alguns necessários tanto para a manutenção do crescimento e desenvolvimento de plantas, como também para o crescimento microbiano. Entretanto, tanto elevadas como baixas concentrações de metais necessários limitam o crescimento e desenvolvimento tanto de plantas como de micro-organismos, por interferirem em processos metabólicos (ANJUM et al., 2015). Os metais considerados micronutrientes para plantas são: Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn (DECHEN e NACHTIGALL, 2006).

Mesmo os metais pesados sendo altamente tóxicos para a maioria dos micro-organismos, existem bactérias resistentes a eles. Devido a vários mecanismos essas bactérias são capazes de transformar formas tóxicas do metal em produtos com menor toxicidade (SOTERO-MARTINS et al., 2014). Os mecanismos de resistência são codificados por genes cromossômicos e incluem: bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal dentro da célula e redução química do contaminante a uma forma menos tóxica (ABDELATEY et al., 2011). Destaca-se que a resistência a metais pesados é devida aos mecanismos intrínsecos e a exposição prolongada a esses metais favorece a seleção e proliferação de micro-organismos tolerantes ao estresse causado por eles (HUTCHINSON e SYMINGTON 1997). Espécies bacterianas resistentes podem viver no solo independentemente dos níveis de contaminação. Algumas bactérias se adaptam a presença desses metais em concentrações superiores a 1 ppm, se proliferam e se tornam dominantes no ambiente (SOUZA, 2013).

Os micro-organismos resistentes a metais pesados são úteis como indicadores de contaminação. Os metais, portanto, podem atuar como importantes agentes seletivos influenciando a dinâmica da evolução das comunidades bacterianas de um solo (NITHYA et al., 2011).

A capacidade dos micro-organismos em converter substâncias tóxicas em compostos menos nocivos é a base do processo conhecido como biorremediação. Este processo consiste na utilização de agentes biológicos na remoção de resíduos tóxicos ambientais (KRASTANOV et al., 2013). A biorremediação está fundamentada na capacidade de organismos vivos, principalmente dos micro-organismos, em degradar ou desintoxicar áreas contaminadas por transformação das substâncias poluentes em compostos não tóxicos (KUMAR et al., 2011).

A utilização de organismos do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas (biorremediação intrínseca ou natural), adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) são algumas das principais estratégias de biorremediação (TONINI et al., 2010).

Dentre as técnicas de biorremediação pode-se citar a fitorremediação, que utiliza espécies vegetais tolerantes a metais pesados visando à remoção destes poluentes do solo. Vários estudos utilizam espécies vegetais tolerantes, em conjunto com bactérias capazes de sintetizar hormônios promotores de crescimento, auxinas, em especial o ácido indol acético (AIA); bactérias capazes de absorver metais, graças à produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ou bactérias capazes de solubilizar fosfato (WILSON et al., 2006; JACQUES et al., 2007; PAL e PAUL, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre os hormônios promotores de crescimento sintetizados por bactérias encontram-se as auxinas, em especial o ácido indol acético (AIA). Este fitormônio atua no crescimento das raízes, que resulta no aumento do comprimento, do número de raízes laterais e de pêlos radiculares (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998). Este hormônio pode ser gerado pelos tecidos vegetais, por produção endógena ou por produção exógena, pela ação de micro-organismos, sendo esta última muito difundida entre bactérias do solo e bactérias associadas com plantas (BACA e ELMERICH, 2007).



A produção de EPS, por bactérias, está relacionada à resistência a metais pesados por meio da alta capacidade de adsorção de metais por estes compostos. Esta adsorção está associada aos grupos funcionais presentes nos EPS (SCOTT e PALMER, 1988; SAHOO et al., 1992; CRINI, 2005; GUPTA et al., 2006; WANG e CHEN, 2006; PAL e PAUL, 2008). Estes compostos são biodegradáveis, podem permanecer eficazes em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, e apresentam grupos funcionais como: carboxila, hidroxila, amina e ácido urônico, que possibilitam a captura de metais por interação eletrostática. Portanto, essas propriedades conferem a estes compostos uma aplicabilidade em diversas áreas biotecnológicas, incluindo a biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados (COLIN et al., 2013).

O P é um elemento importante na nutrição das plantas, pois estimula o crescimento do sistema radicular, elevando a eficiência de absorção de água pelas plantas. Isso garante menores perdas e melhor utilização de outros nutrientes e promove maior sobrevivência das plantas durante períodos de estresse hídrico (SANTOS et al., 2013). O P também tem funções importantes em alguns processos metabólicos na planta, como: fotossíntese, transferência de energia, biossíntese de macromoléculas e respiração (KHAN et al., 2010). Embora em alguns solos o P total seja relativamente alto, a fração disponível é, de modo geral, pequena nos solos brasileiros. Os principais fatores que afetam a disponibilidade de P nos solos e interferem na sua absorção pelas plantas são: textura, teor de matéria orgânica, capacidade de tamponamento, cálcio, alumínio e ferro, o que leva à necessidade de aplicação de altas quantidades de adubos fosfatados, ocasionando acúmulo de metais pesados no solo (SANTOS et al., 2013).

Como consequência de frequentes aplicações de fertilizantes fosfatados, obtêm-se formas inorgânicas deste elemento nos solos, principalmente em complexos de minerais insolúveis, que não podem ser absorvidas pelas plantas (RENGEL e MARSCHNER, 2005).

### **1.3 Referências**

ABDELATEY, L. M.; KHALIL, W. K. B.; ALI, T. A.; MAHROUS, K. F. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in Gram-positive

and Gram-negative bacteria present in Egyptian soils. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, Surabaya, v.6, n.2, p. 201–211, 2011.

AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; BARRA, C.M.; LÃ, O.R. XVI- Química dos metais pesados no solo. In: MELO, V.F.; ALLEONI, L.R.F. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: Ed. SBCS, 2009.

ANDRADE, L. C. R.; FELICORI, T. C.; MARQUES, E. A. G.; CHAGAS, C. S. Avaliação da Qualidade do Solo na Bacia do Córrego Palmital, Viçosa – MG. **Revista de Geografia**, Juiz de Fora, v. 9, p. 7-22, 2013.

ANJUM, N. A.; SINGH, H. P.; KHAN, M. I. R.; MASOOD, A.; PER, T. S.; NEGI, A.; BATISH, D. R.; KHAN, N. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. **Environmental Science Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, p. 3361–3382, 2015.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta, 2012. p. 487f.

BACA, B. E.; ELMERICH, C. Microbial production of plant hormones. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 113-143.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 24, p. 7-11, 1998.

BONO, J.A.M.; MACEDO, M.C.M.; TORMENA, C.A. **Qualidade física do solo em um latossolo vermelho da região sudoeste dos cerrados sob diferentes sistemas de uso e manejo**. Viçosa, MG. fev. 2012/ mar.2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01006832013000300021&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01006832013000300021&script=sci_arttext)>. Acesso em: 15 ago. 2013.

CAI, L.; XU, Z.; BAO, P.; HE, M.; DOU, L.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; ZHU, Y. Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and source of arsenic and heavy metals in the agricultural soils in Shunde, Southeast China. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 148, p. 189-195, 2015. doi: 10.1016/j.gexplo.2014.09.010

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. **Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health**. Winnipeg, 1997.

CERETTA, C.A.; BASSO, C.J.; FLECHA, A.M.T.; PAVINATO, P.S.; VIEIRA, F.C.B.; MAI, M.E.M. Manejo da adubação nitrogenada na sucessão aveia preta/milho, no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.26, p.163-171, 2002.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade do solo** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/qualidade-do-solo/42-qualidade-do-solo>>. Acesso em: 8 ago. 2015.

CHANDRASEKARAN, A.; RAVISANKAR, R.; HARIKRISHNAN, N.; SATAPATHY, K.K.; PRASAD, M.V.R.; KANAGASABAPATHY, K.V. Multivariate statistical analysis of heavy metal concentration in soils of Yelagiri Hills, Tamilnadu, India – Spectroscopical approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 137, p. 589-600, 2015. doi: 10.1016/j.saa.2014.08.093

COLIN, V. L.; CASTROA, M. F.; AMOROSOA, M. J.; VILLEGASA, L. B. Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 261, p. 577– 583, 2013.

CONCEIÇÃO, D. P. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus* sp. ES29**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

COSCIONE, A. R.; SILVA, L. F. M.; MARIA, I. C.; ANDRADE, C. A.; FERRACINI, V. L. Solução do solo e análise de componentes principais para monitoramento da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 38, p. 1654-1662, 2014.

COSTA, F. X. X.; BELTRÃO, N. M. E. M.; SILVA, F. E. A. A.; FILHO, J. S. M. M.; SILVA, M. A. S. Disponibilidade de nutrientes no solo em função de doses de matéria orgânica no plantio da mamona. **Revista Verde**, Mossoró, v.5, p. 204 – 212, 2010.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, **Progress in Polymer Science**, Oxford, v. 30, p. 38–70, 2005.

DE MARIA, I. C. ; KOCSSI, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 291-298, 2007.

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos essenciais e benéficos às plantas superiores. In: Fernandes, M.S. (ed.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.1-5.

ENSINAS, S.C.; MARCHETTI, M.E.; SILVA, E.F.; POTRICH, D.C.; MARTINEZ, M.A. Atributos químicos, carbono e nitrogênio total em latossolo submetido a diferentes sistemas de uso do solo. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 7, p. 24-36, 2014.

FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B.V.; ABREU, C.A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2001.

FILIZOLA, H. F.; MANOEL, D.; GOMES, M.A.F. Amostragem de solos para análises de metais pesados. Cap. 3. In: \_\_\_\_\_. **Manual de procedimentos de coletas de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE - United States Department of Agriculture. July 2011. Disponível em: <<http://fundamentos.mz-ir.com/?c=28&f=113&cc=1&u=1&idm=0>>. Acesso em: 8 ago. 2013.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v. 154, p. 145-150, 1993.

FYTILI, D.; ZABANIOTOU, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 12 p. 116–140, 2008.

GARG, U. K.; KAUR, M. P.; GARG, V. K.; SUD, D. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 140, p. 60–68, 2007.

GARG, U. K.; KAUR, M. P.; SUD, D.; GARG, V. K. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by adsorption on treated sugarcane bagasse using response surface methodological approach. **Desalination**, Amsterdam, v. 249, p. 475–479, 2009.

GUPTA, V. K.; RASTOGI, A.; NAYAK, A. Adsorption studies on the removal of hexavalent chromium from aqueous solution using a low cost fertilizer industry waste material. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 342 , p. 135–141, 2010.

GUPTA, V. K.; RASTOGI, A.; SAINI, V. K.; JAIN, N. Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Spyrogyra* species, **Journal Colloid Interface Science**, San Diego, v. 296, p. 59–63, 2006.

HARMANESCU M; LIANA M.A.; DESPINA, M.B.; IOAN, G.; IOSIF, G. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County,Romania. **Chemistry Central Journal**, London, v. 5, p.1-10, 2011.

HUTCHINSON T.C.; SYMINGTON M.S. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 58, p. 323-330, 1997.

KER, J. C. Latossolos do Brasil: Uma revisão. **Geonomos**, Pampulha, v. 5, n. 1, p. 17-40, 1997.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.37, p.1192-1201, 2007.

KHAN, K.; LU, Y.; KHAN, H.; ISHTIAQ, M.; KHAN, S.; WAQAS, M.; WEI, L.; WANG, T. Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 58, p.449–458, 2013.

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**, Abingdon, v. 56, p. 73–98, 2010.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 13, n.1, p. 76-87, 2013.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. **International Journal of Environmental Sciences**, Jaipur, v.1, n.6, p. 1079-1093, 2011.

LEE, S-W.; GLICKMANN, E.; COOKSEY, D. A. Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1437–1444, 2001.

LIMA, A.S.T. **Variabilidade espacial de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco em um Latossolo tratado como lodo de esgoto por treze anos consecutivos**. 2011. 56f. Tese (Doutorado em Agronomia- Ciência do Solo)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

LIN, Y.P.; CHANG, T.K.; SHIH, C.W.; TSENG, C.H. Factorial and indicator kriging methods using a geographic information system to delineate spatial variation and pollution sources of soil heavy metals. **Environmental Geology**, Berlin, v. 42, p. 900–909, 2002.

LOPEZ, M. Á.; MAGNITSKI, S. Nickel: the last of the essential micronutrients. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 29, p. 49-56, 2011.

MAQBOOL, Z.; ASGHAR, H. N.; SHAHZAD, T.; HUSSAIN, S. RIAZ, M.; ALI, S.; ARIF, M. S.; MAQSOOD, M. Isolating, screening and applying chromium reducing bacteria to promote growth and yield of okra (*Hibiscus esculentus* L.) in chromium contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 114, p. 343–349, 2015.

McBRIDE, M.B. **Toxic metals in sewage sludge-amended soils**: has promotion of beneficial use discounted the risks. New York: Advances in Environmental Research, Elsevier Science, 2003. Disponível em: <[http://www.sourcewatch.org/images/2/22/McBride\\_Toxic\\_Metals\\_in\\_Sludge.pdf](http://www.sourcewatch.org/images/2/22/McBride_Toxic_Metals_in_Sludge.pdf)>. Acesso em: 16 ago. 2015.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALEM SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. (Ed.). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Sabesp, 2001. p. 289-363.

MORTVEDT, J.J. Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. **Fertilizer Research**, The Hague, v.43. p.55-61, 1996.

MORTVEDT, J.J.; BEATON, J.D. Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. In: TIESSEN, H. (Ed.). **Phosphorus in the global environment**. 1995. Disponível em: <<http://www.scopenvironment.org/downloadpubs/scope54/6mortvedt.htm>>. Acesso em: 16 ago. 2015.

NITHYA, C.; GNANALAKSHMI, B.; PANDIAN, S. K. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. **Marine Environmental Research**, New York, v. 71, p. 283-294, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, Mossoró, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, A. G.S.; PEREIRA, H. F. Proposta didática de conscientização ambiental em ambiente não formal. In: SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO PARA CIÊNCIAS E MATEMÁTICA, 2.; SEMANA DE LICENCIATURA, 11., 2014, Jataí. **Anais...** Disponível em: <[http://www.jatai.ifg.edu.br/semlic/seer/index.php/anais/article/view/339/pdf\\_95](http://www.jatai.ifg.edu.br/semlic/seer/index.php/anais/article/view/339/pdf_95)>. Acesso em: 4 nov. 2015

OLIVEIRA, N. **Área cultivada no Brasil cresce mais de 4% e chega a 68 milhões de hectares**. 2012. Disponível em: <<http://agenciabrasil.etc.com.br/noticia/2012-10-26/area-cultivada-no-brasil-cresce-mais-de-4-e-chega-68-milhoes-de-hectares>>. Acesso em: 9 ago. 2013.

PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation, **Indian Journal Microbiology**, New Delhi, v. 48, p. 49-64, 2008.

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

RIBEIRO, M. A. C. **Contaminação do solo por metais pesados**. 2013. 249f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

ROSSMAN TG. Metal mutagenesis. In: GOYER, R. A.; CHERIAN, G. C. (Ed.). **Toxicology of metals**. New York: Springer, 1995. p 373–430.

SAHOO, D. K.; KAR, R. N.; DAS, R. P.. Bioaccumulation of Heavy Metal ions by *Bacillus circulans*, **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 177–179, 1992.

SANTOS, A. P. A; BATISTA, S. B. Isolamento e caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de solo poluído por resíduos sólidos do bairro carrapicho município de Várzea Grande – Mato Grosso. **Connection Line**, Várzea Grande, v. 12, p. 29-43, 2015.

SANTOS, A. L. F.; BORGES, L. O. S.; BOAVENTURA, G. R.; GONÇALVES, L. P. Metais pesados no ribeirão piacó, anápolis-go e suas implicações ambientais. **Revista Mirante**, Anápolis, v. 8, n. 1, jun. 2015.

SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P. Estudo da mobilização de metais e elementos traços em ambientes aquáticos do semiárido Brasileiro aplicando análises de componentes principais. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1107-1111, 2008.

SANTOS, D. H.; TIRITAN, C. S.; FOLONI, J. S. S.; FABRIS, L. B. Effects of mineral and organic-mineral phosphate fertilizers on soil fertility parameters. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 9, n.1, p. 10-17, 2013.

SCOTT, J.A.; PALMER S. J. Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide, **Biotechnology Letters**, London, v. 10, p. 21–24, 1988.

SILVA, V. R.; REINERT, D. J.; REICHERT, J. M. Densidade do solo, atributos químicos e sistema radicular do milho afetados pelo pastejo e manejo do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p.191-199, 2000.

SILVA, J.E.; RESCK, D.V.S.; SHARMA, R.D. Alternativa agronômica para o bioossólido produzido no Distrito Federal – I: efeito na produção de milho e na adição de metais pesados em latossolo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 487-495, 2002.

SMEDA, R. J.; WELLER, S. Potential of rye (*Secale cereale*) for weed management in transplant tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). **Weed Science**, Champaign, v. 44, p. 596-602, 1996.

SOTERO-MARTINS, A.; VIANA, M. O.; CARVAJAL, E. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 36-42, 2014.

SOUZA, A. F. C. **Caracterização molecular e avaliação de resistência a chumbo e cádmio em bactérias isoladas de rizosferas de plantas coletadas em Santo Amaro (BA)**. 2013. 213f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.

SOUZA, F. V. P. **Crescimento, teores, acúmulo e disponibilidade de níquel em gramíneas forrageiras**. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Bacterial degradation and biorremediation of petroleum compounds: A review. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n.4, p. 1027-1035, 2010.

TRANNIN, I. C. DE B.; SIQUEIRA, J. O. ; MOREIRA, F. M. S. Atributos químicos e físicos de um solo tratado com biossólido industrial e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 3, p. 223–230, 2008.

WANG, J. L.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review, **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 427–451, 2006.

WILSON, C.; BRIGMON, R. L.; KNOX, A.; SEAMAN, J.; SMITH, G. Effects of Microbial and Phosphate Amendments on the Bioavailability of Lead (Pb) in Shooting Range Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 76, p. 392-399, 2006.



## **CAPÍTULO 2 - Uso agrícola como fator de acumulação de metais pesados em Latossolo**

**RESUMO:** A contaminação do solo pode ser decorrente do descarte inadequado de substâncias com potencial poluente ou do uso agrícola prolongado com aplicação de materiais corretivos de acidez, fertilizantes e defensivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição espacial de cádmio (Cd), cromo (Cr) e níquel (Ni) em Latossolo sob plantio direto, convencional e convencional com aplicação de lodo de esgoto, em áreas com exploração agrícola há mais de 80 anos. As concentrações dos metais em 422 amostras de solo foram mensuradas por espectroscopia de absorção atômica com chama ar-acetileno, sendo os extratos obtidos por extração com HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HCl em sistema aberto (USEPA-3050B). As variáveis pH e matéria orgânica também foram determinadas. Os mapas de distribuição espacial foram elaborados a partir do software Spring v. 5.2.7 e auxiliaram na visualização da dispersão dos metais na área de estudo, indicando níveis de contaminação. A análise estatística multivariada por componentes principais diferenciou as amostras de solo de mata nativa das que estão sob atividade agrícola, apontando a uma mesma fonte de contaminação para Cr e Ni, como também para a correlação da matéria orgânica com Cd. Conclui-se que a área estudada apresenta contaminação, em larga escala, por Cd e Cr, e contaminações pontuais por Ni, estando alguns valores dentro da faixa de intervenção.

**Palavras-chave:** contaminação do solo, cádmio, cromo, níquel, distribuição espacial

**ABSTRACT:** Soil contamination may result from inappropriate use of substances with pollution potential or from the prolonged agricultural use with application of acidity corrective materials, fertilizers and pesticides. The aim of this work was to evaluate the spatial distribution of cadmium (Cd), chromium (Cr) and nickel (Ni) in latosol under no tillage, conventional tillage and conventional with sewage sludge application, in agricultural exploration areas for over 80 years. Metals concentration in 422 soil samples were measured by atomic absorption spectroscopy with acetylene-air flame, obtaining the extracts by extraction with HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HCl in open system (USEPA-3050B). The variables pH and organic matter were obtained. Maps of spacial distribution were elaborated by software Spring v. 5.2.7 and assisted in the visualization of the metals dispersion in the study area, indicating contamination levels. The statistical multivariate by main components differentiated the native forest soil samples from those under agricultural activity, pointing to a same contamination source to Cr and Ni, and to the organic matter correlation to Cd as well. It can be concluded that the studied area presents contamination in large scale by Cd and Cr and pontual contamination by Ni, being some of the values into the intervention group.

**Keywords:** soil contamination, cadmium, chromium, nickel, spacial distribution.

## 2.1 Introdução

Metais pesados são componentes de ocorrência natural nos solos porque estão presentes no material de origem, as rochas. A concentração natural dos metais nos solos depende da natureza das rochas e de processos de adição e de perda que ocorrem durante a formação do solo. Em condições naturais, o principal processo de adição é a deposição atmosférica. A lixiviação e a erosão são os principais processos de perda, que resultam, na verdade, na transferência dos metais de um ponto da paisagem para outro. De acordo com Zhang et al. (2002), o material de origem é o principal fator que determina os teores de metais pesados nos solos, mas a vegetação e a atividade humana também interferem. No que diz respeito à relação entre atividade humana e entrada de metais pesados no solo, a exploração agrícola participa principalmente devido à aplicação de corretivos de acidez, fertilizantes e defensivos agrícolas.

Calcários são rochas moídas e muitos fertilizantes são também produzidos a partir de rochas e, assim, contêm metais pesados. Nos calcários comercializados no Brasil a concentração de metais é pequena e, na maior parte das situações, está abaixo do que rege a legislação, no que diz respeito aos teores de Cd, Cr e Ni

(AMARAL SOBRINHO et al., 1992; CARVALHO, 2011; SOARES et al., 2015). Entre os fertilizantes, os fosfatados são os que têm merecido maior atenção devido às concentrações altas de Cd nas rochas fosfatadas. Essas rochas são consideradas a principal fonte de contaminação com Cd em solos agrícolas (JIAO et al., 2012). No entanto, a concentração de Cd é maior ou menor dependendo da natureza da rocha, se sedimentar ou ígnea. No Brasil, os fertilizantes fosfatados são produzidos principalmente a partir de rochas ígneas (CARVALHO, 2011), o que faz com que os teores de Cd sejam menores do que os relatados em outros países e torna o produto nacional mais seguro. Em avaliações feitas por Campos et al. (2005) os teores de Cd nos fertilizantes industriais fosfatados importados foram nove vezes maiores do que nos nacionais.

Além dos fertilizantes, esterco animal, composto de lixo e lodo de esgoto, aplicados sucessivamente ao solo, podem contaminá-lo com metais pesados. A utilização agrônômica destes resíduos é importante do ponto de vista da reciclagem de nutrientes, oferecendo oportunidade de autogestão com o seu uso na fertilização. Entretanto, a presença de metais pesados como Cd, Cr e Ni em sua composição é motivo de preocupação ambiental e de saúde pública, pois podem causar danos aos micro-organismos e seres humanos (McBRIDE, 2002; NOGUEIRA et al., 2008).

A presença dos metais torna necessário o monitoramento do uso dos corretivos e fertilizantes, sem perder de vista alguns aspectos importantes: calcário e adubos (industriais e orgânicos) são imprescindíveis para manter ou aumentar a produção de alimentos; as quantidades de metais que chegam ao solo com uma única aplicação de ambos é muito pequena, de modo que alterações nos teores naturais devido à sua aplicação são observadas somente após décadas de uso (JIAO et al., 2012). A maior parte dos metais contidos nos calcários e fertilizantes, ao ser solubilizada, reage com a matriz do solo (particularmente óxidos de Fe e Al e matéria orgânica) e passa para formas não biodisponíveis; os metais têm baixa mobilidade no solo e tendem a acumular (ALI e MALIK, 2011). O último aspecto justifica particularmente a necessidade de acompanhamento da evolução dos teores de metais em solos adubados, de modo a que se assegure a qualidade do solo particularmente para a produção de alimentos. Há vários estudos na literatura relatando a presença de concentrações elevadas de metais em solos, agrícolas e

urbanos, com comprometimento da qualidade do solo (MICÓ et al., 2006; FAGBOTE e OLANIPEKUN, 2010; ZHENG et al., 2010; ALI e MALIK, 2011; GHREFAT et al., 2011; HARMANESCU et al., 2011; CHANDRASEKARAN et al., 2015). No entanto, não há trabalhos sobre o nível de poluição e fontes de Cd, Cr e Ni em solos agrícolas sob diferentes tipos de manejo no Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição espacial de Cd, Cr e Ni em Latossolo sob plantio direto, convencional e convencional com aplicação de lodo de esgoto, em áreas com exploração agrícola há mais de 80 anos.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Amostragem**

Foi realizada coleta de amostras de solo em uma área de 37 ha da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, totalizando 422 pontos de coleta. A área amostral está localizada em torno da latitude de 21°14'47" S e da longitude de 48°17'00" W, com altitude e declividade médias de 560 m e 6%, respectivamente. O clima da região é tropical, com temperatura e precipitação médias nos últimos cinco anos de 22,64 °C e 1.257,6 mm, respectivamente. O solo da área amostrada, Latossolo Vermelho Eutroférico (LVef), é cultivado há mais de 80 anos, com parte destinada à pesquisa nos últimos 50 anos. As coletas foram realizadas no período de 19 a 21 de fevereiro de 2014, com trado holandês, na profundidade de 0 – 20 cm. A malha amostral possui um espaçamento de 30 m x 30 m. Sua locação em campo foi realizada com receptor GNSS Trimble R6 no método de posicionamento relativo cinemático em tempo real (*Real Time Kinematic* - RTK), adotando-se como estação base marco geodésico pertencente ao Sistema Geodésico Brasileiro - SGB. Destaca-se que esse método propicia qualidade de posicionamento planimétrico na ordem de centímetros (MONICO, 2008).

As coletas foram realizadas em locais com cultivo de milho destinado à alimentação de animais sob os sistemas de plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos (PD) há 25 anos; plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais (PC) há mais de 50 anos e plantio convencional

com aplicação de lodo de esgoto (PL) há 17 anos. O lodo de esgoto é procedente da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP, unidades de Barueri-SP, Monte Alto-SP e Franca-SP, e vem sendo aplicado anualmente nas doses de 0,0 Mg ha<sup>-1</sup> (testemunha com fertilização mineral baseada na análise química do solo); 5,0 Mg ha<sup>-1</sup>; 10,0 Mg ha<sup>-1</sup> e 20,0 Mg ha<sup>-1</sup> (base seca).

Como referencial de solo não cultivado, portanto sem interferência antrópica direta, realizou-se amostragem de solo de mata nativa (MN) adjacente às áreas cultivadas.

### 2.2.2 Atributos químicos do solo

Os solos amostrados foram secos ao ar e a sombra, destorroados e passados em peneira de 2 mm. Nas amostras, o valor de pH em CaCl<sub>2</sub> e o teor de matéria orgânica (MO) foram determinados segundo Raij et al. (2001).

Para a extração de Cd, Cr e Ni foi usado o método 3050B da USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), em que são empregados HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HCl, com aquecimento da amostra em sistema aberto (USEPA, 1996). Em bquer de 100 mL foram adicionados 4 g de solo e 10 mL de solução de HNO<sub>3</sub> 1:1. Vedou-se o bquer com vidro de relógio e aqueceu-se o mesmo em chapa, a 100°C durante 15 min. Na sequência, foram adicionados 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e prosseguiu-se o aquecimento a 100°C por mais 2 h. Subsequentemente foram adicionados 2 mL de H<sub>2</sub>O deionizada e 10 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % gradativamente (de 2 mL em 2 mL) com posterior aquecimento a 100°C por 2 h. Após, foram adicionados 10 mL de HCl concentrado e dado prosseguimento ao aquecimento a 100°C por mais 15 min. Os extratos obtidos foram quantitativamente transferidos para balões de 100 mL, cujo volume foi completado com H<sub>2</sub>O deionizada e a solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo o filtrado armazenado em frascos de polietileno.

Os metais foram quantificados nos extratos por espectroscopia de absorção atômica com chama ar-acetileno em espectrofotômetro GBC Avanta. As variáveis pH em CaCl<sub>2</sub> e MO também foram determinadas segundo Raij et al., (2001). Os

resultados de pH, MO, Cd, Cr e Ni obtidos para cada ponto amostrado estão apresentados no ANEXO.

### 2.2.3 Elaboração dos mapas de distribuição espacial

A malha amostral e seus respectivos resultados relativos às concentrações de MO, Cd, Cr e Ni foram inseridos no *software* Spring versão 5.2.7 (64 bits) para fins de elaboração da distribuição espacial desses elementos na área de estudo.

A partir dos valores dos dados amostrais foi gerado um modelo digital de superfície para cada um dos elementos. O método de interpolação utilizado para a geração da superfície foi o Inverso do Quadrado da Distância (INPE, 2014).

A partir dos modelos digitais de superfícies gerados, foi realizada a classificação dos teores nos mapas. Os teores de MO receberam a seguinte classificação: muito baixo, baixo, médio, alto e muito alto, segundo Lopes e Guilherme (1999). Para Cd, Cr e Ni a classificação adotada foi: teores de referência, de prevenção, de intervenção agrícola, solo contaminado e teores críticos e não críticos, de acordo com valores de prevenção do CONAMA (BRASIL, 2009).

Todos os mapas de distribuição espacial foram elaborados utilizando o sistema de projeção Universal Transverso de Mercator - UTM (Fuso 22, Hemisfério Sul) e sistema de referência geodésico SIRGAS2000.

### 2.2.4 Análise estatística

As variáveis pH, MO e teores de Cd, Cr e Ni foram submetidas à análise exploratória de dados por métodos de estatística multivariada, sendo a padronização de valores realizada com auxílio do *software* Statistica (STATSOFT, 2004), de acordo com a seguinte fórmula de padronização (Equação 1):

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{S_j}$$

Equação 1

Na equação 1:  $j = 1, 2, \dots, p$  atributos;  $i = 1, 2, \dots, n$  objetos;  $Z_{ij}$  é o valor padronizado de  $X_{ij}$ ;  $X_j$  e  $S_j$  são a média e o desvio padrão da coluna  $j$ , respectivamente. As variáveis assim padronizadas têm média nula e variância unitária.

Para interpretar e identificar a relação entre as variáveis realizou-se a análise de componentes principais (ACP). Foram mantidas no sistema apenas as componentes relacionadas aos autovalores  $\lambda_i \geq 1$  (critério de Kaiser), ou seja, as combinações lineares que conseguem explicar pelo menos a quantidade de variância de uma variável original padronizada.

### **2.3 Resultados e discussão**

As concentrações médias de Cd, Cr e Ni nas 422 amostras de solo (Tabela 1) foram comparadas com as concentrações destes metais em solo de mata nativa; com Valores de Prevenção (VP) e de intervenção (VI) estabelecidos na resolução 420/2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), assim como, com Valores de Referência de Qualidade (VRQ) para Cd, Cr e Ni estipulados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), pois segundo o CONAMA cabe a cada estado da federação estipular os VRQs (BRASIL, 2009; CETESB 2014) (Tabela 2).

O valor de referência de qualidade é a concentração de determinada substância que define a qualidade natural do solo e o valor de prevenção. Tanto segundo o CONAMA como de acordo com a CETESB, é a concentração máxima de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. O valor de intervenção é a concentração máxima de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que quando ultrapassada ocasiona riscos potenciais, diretos ou indiretos à saúde humana (BRASIL, 2009; CETESB 2014).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média para Cd, Cr e Ni nas diferentes sub-áreas que compõem a área experimental.

Metais	Sub-áreas			
	M.N	P.C	P.D	P.L
<b>Cd (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	0,97±0,01	1,01±0,01	1,22±0,01	1,32±0,01
<b>Cr (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	56,67±0,39	64,28±0,58	69,89±0,31	70,07±0,41
<b>Ni (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	14,17±0,09	17,54±0,22	21,35±0,13	25,96±0,11

MN - solo de mata nativa; PC – solo sob plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais; PD – solo sob plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos; PL – solo sob plantio convencional com aplicação de lodo de esgoto

Tabela 2. Concentrações limites de Cd, Cr e Ni para qualidade do solo, de acordo com o CONAMA e a CETESB.

METAIS	CONAMA (mg kg <sup>-1</sup> )			CETESB (mg kg <sup>-1</sup> )	
	VP	INVESTIGAÇÃO AGRÍCOLA	VRQ	VP	INTERVENÇÃO AGRÍCOLA
<b>Cromo</b>	75	150	40	75	150
<b>Níquel</b>	30	70	13	30	70

VP – valor de prevenção; VRQ – valor de referência de qualidade.

O coeficiente de variação (CV) para os metais Cd, Cr e Ni variou de 13 a 17 %. O CV para Cd foi o mais alto (17 %) dos três elementos, sugerindo que o Cd tem a maior variação entre as amostras de solo e apresentando, portanto, a maior possibilidade de ser influenciado por atividades humanas (CHEN et al., 2008; CAI et al., 2015). O menor CV foi para Cr (13 %), o que também foi encontrado por Cai et al. (2015) em 238 amostras de solos agrícolas da China.

A Tabela 3 exibe os valores das áreas classificadas segundo os critérios adotados para os metais pesados na área experimental. Em uma área com 37 ha foi possível mensurar Cd, Cr e Ni em 34,7 ha (93,8 %); 34,7 ha (93,8 %) e 34,8 ha (94 %), respectivamente. Para Cd 1,9 % da área apresentaram valores dentro do VRQ; 81,1 % dentro do VP e 10,8 % apresentaram valores na faixa de intervenção. O Cr em 78,7% da área apresentou valores não críticos e em 15,1 % apresentou valores



críticos. Para Ni, 93,8 % da área apresentaram valores não críticos e 0,3 % valores críticos, sendo os valores não críticos concentrações de metais maiores ou iguais ao VRQ e menores ou iguais ao VP, enquanto que os valores críticos excedem o VP.

Tabela 3. Valores das áreas classificadas segundo os critérios adotados para os metais pesados na área experimental

Metal	Referência	Prevenção		Intervenção Agrícola	Total
		(ha)			
Cd	0,7	30,0	4,0		34,7
Cr	Não Crítico		Crítico		
	(ha)				
		29,1	5,6		34,7
Ni		34,7	0,1		34,8

### 2.3.3 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para identificar as principais fontes de poluição do solo na área selecionada. Esta análise originou um novo conjunto de variáveis (Tabela 4) com dois autovetores (CP1 e CP2 que representam 57,41% da variância total dos dados), sendo os autovetores com valores discriminatórios os que apresentam coeficientes de seus atributos acima de 0,5 e - 0,5 (maior importância linear) e estes foram destacados. Vale ressaltar que em todos os autovetores foram destacados valores discriminatórios.

O grupo obtido no CP1 (Tabela 4) que envolve as variáveis Ni e Cr também foi encontrado por Lado et al. (2008) em estudo de solos da Europa, que associou a ocorrência de atividades sísmicas e processos de mineralização ao aumento destes metais no solo. No presente estudo, a relação direta dos maiores pesos no CP1 (- 0,8796 e - 0,8227 para Ni e Cr, respectivamente) mostra que a fertilização mineral contribuiu da mesma forma que a fertilização com lodo de esgoto, para maior acúmulo de Ni e Cr no solo.

A correlação observada na CP2 envolve as variáveis MO e Cd, e estas apresentam os maiores pesos negativos. Esta informação mostra que, quando há

aumento do teor de MO há também aumento da concentração de Cd, sendo esta interação explicada pela capacidade complexante da MO, que pode afetar a solubilidade, a biodisponibilidade e a mobilidade dos metais, retendo-os e diminuindo assim a mobilidade do poluente (QUENEA et al., 2009).

O pH é uma importante variável quando se estuda metais pesados no solo porque quando há elevada acidez no meio, pode ocorrer solubilização desses elementos, disponibilizando-os para as plantas. Tal informação se faz importante à correção do pH do solo (MOURA et al., 2006). No entanto, neste estudo, a variável pH não apresentou importância discriminatória e não mostrou correlação com as demais variáveis (Tabela 4). Este fato pode estar associado ao extrator empregado que contém ácido em sua composição e é usado para obtenção de teores pseudototais, os quais não sofrem efeito do pH do solo.

Tabela 4. Valores dos componentes principais encontrados na respectiva análise.

Variáveis	CP1	CP2
<b>MO (g dm<sup>-3</sup>)</b>	0,2018	<b>-0,7276*</b>
<b>pH CaCl<sub>2</sub></b>	0,1067	0,4476
<b>Ni (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>-0,8796*</b>	-0,0208
<b>Cd (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	-0,4753	<b>-0,5934*</b>
<b>Cr (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>-0,8227*</b>	0,2447

CP1 – componente principal 1; CP2 – componente principal 2; MO – matéria orgânica; \*valores discriminatórios.

O CP1 é característico por representar em 34,6 % a originalidade das amostras enquanto que o CP2 representa 22,8%, totalizando uma representatividade de 57,4 % da variabilidade original (Figura 1).

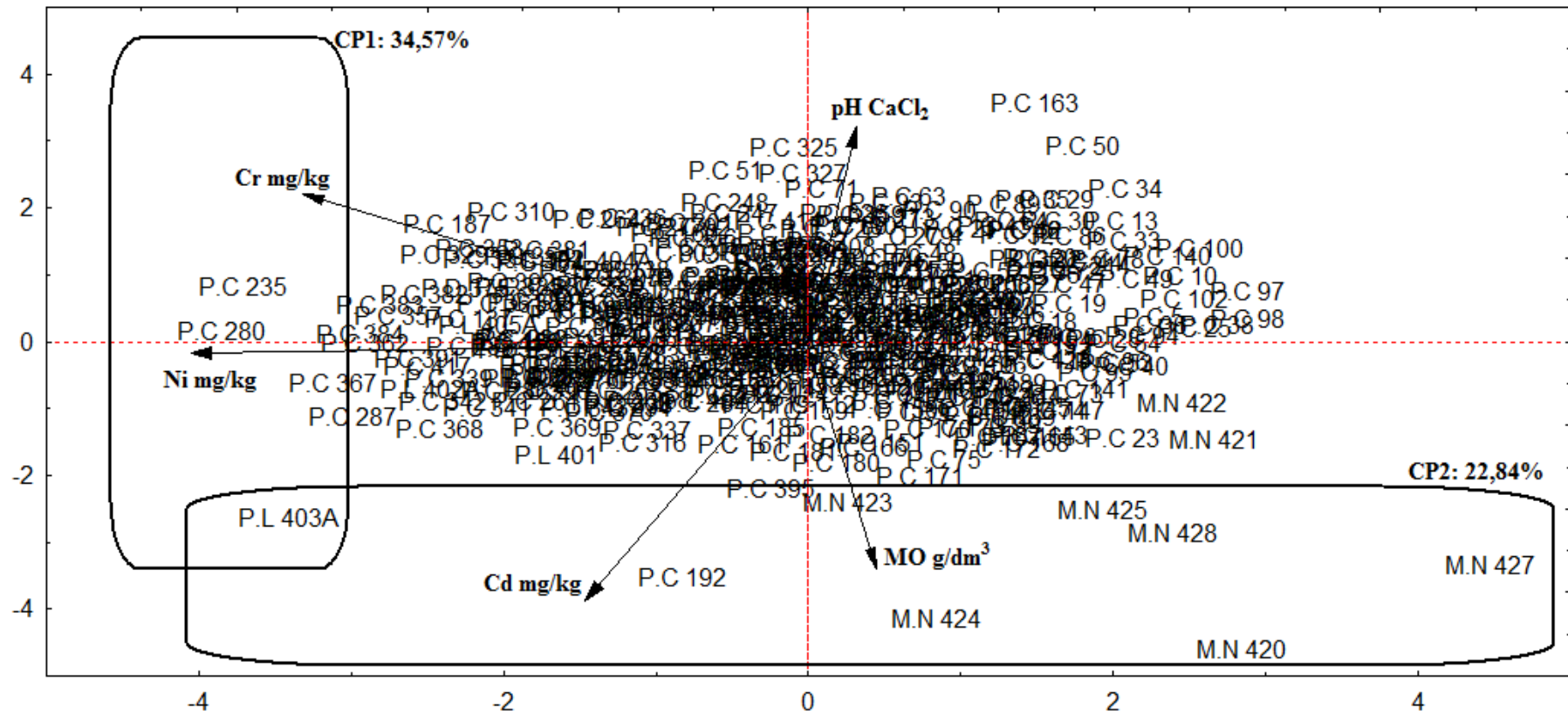


Figura 1. Projeção espacial e biplot das componentes principais (Relação: variáveis/amostras).

A dispersão estatística dos pontos (Figura 1) mostra distribuição heterogênea dos metais nas áreas sob diferentes manejos (PC, PL e PD). Esta dissipação é notada pelo posicionamento dos pontos no plano – pontos aglomerados a esquerda do eixo central e pontos aglomerados a direita do eixo central, indicando que os tipos de manejo (PC, PL e PD) não diferiram na retenção dos metais no solo.

Os pontos amostrados em área de mata nativa estão distribuídos de forma homogênea, pois se localizam a direita do plano e apresentaram elevados valores apenas para MO e para Cd quando comparado com os demais pontos. A elevada concentração de MO indica boa qualidade do solo, o que é justificável por esta área nunca ter sofrido atividades antrópicas (SOUZA et al., 2010), enquanto que a elevada concentração de Cd pode ser explicada pelo material de origem da área (CAI et al., 2015).

Foi possível observar que 87 % da área apresentaram teores de MO classificados como médios e 13 % como baixos (Figura 2). Destaca-se que maiores teores de MO auxiliam no fornecimento de nutrientes às plantas, na complexação de elementos tóxicos e micronutrientes e na retenção de cátions (LIMA et al., 2009; COSTA et al., 2010). No presente estudo, os menores teores de MO foram encontrados em áreas com sistema convencional de cultivo. Cardoso et al. (2010) e Santos et al. (2008) relatam que em solos em plantio direto há maior concentração de MO na superfície, o que pode indicar maior acúmulo de carbono, do que em sistemas convencionais de cultivo, os quais adotam operações com intenso revolvimento do solo.

A distribuição espacial dos metais Cd e Cr (Figuras 3 e 4) indica que a área de estudo aponta à poluição ambiental, pois apesar da maior parte da área apresentar faixa de concentração dos metais dentro do limite de prevenção, estes se acumulam no solo e ocasionam poluição (QUENEA et al., 2009). Também mostram que, em pequenas áreas, as concentrações de Cd, Cr e Ni já ultrapassaram os valores de prevenção, estando dentro da faixa de valores de intervenção agrícola e valores críticos, os quais indicam poluição. Esta contaminação tem como origem a acumulação destes elementos no solo por meio de práticas agrícolas intensivas, uma vez que fertilizantes fosfatados e lodo de esgoto são fontes de contaminação (MORTVEDT, 1996; NOGUEIRA et al., 2008; CAI et al., 2015).

As concentrações de Ni foram inferiores ao VP (Figura 5), o que significa que as entradas de metais pesados através do uso de calcário, fertilizantes e defensivos agrícolas foi baixa ao longo do período de exploração agrícola do solo. Destaca-se que a contaminação de áreas agrícolas por metais pesados apresenta grandes riscos à saúde e ao ambiente, pois estes componentes podem chegar ao ser humano através da ingestão de alimentos e águas contaminadas, visto serem absorvidos pelas plantas e poderem chegar aos lençóis freáticos (HARMANESCU et al., 2011).



Figura 2. Variabilidade espacial de matéria orgânica (MO) em Latossolo vermelho Eutroférico.

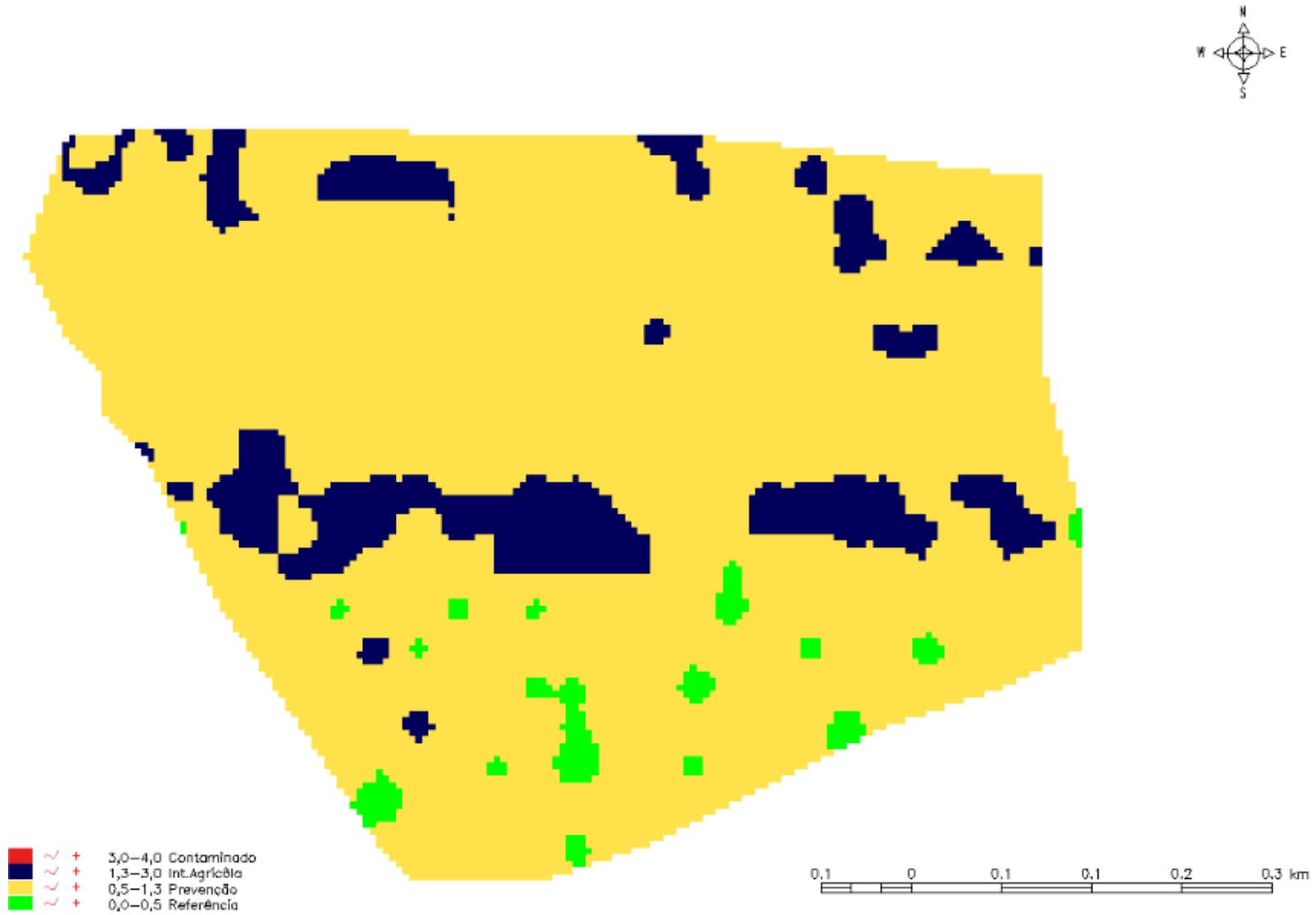


Figura 3. Variabilidade espacial de cadmio (Cd) em Latossolo vermelho Eutroférico.

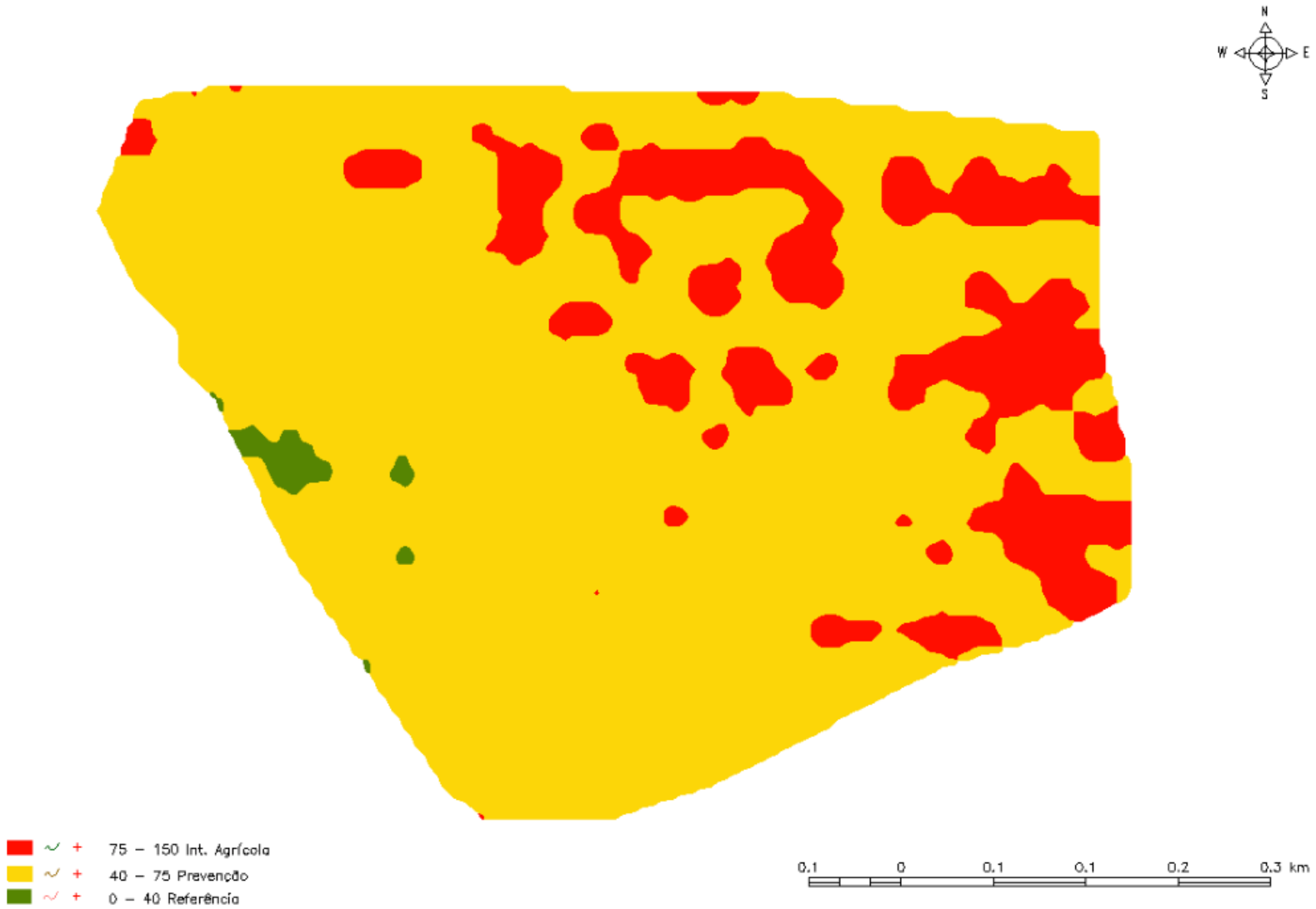


Figura 4. Variabilidade espacial de crômio (Cr) em Latossolo vermelho Eutroférico.



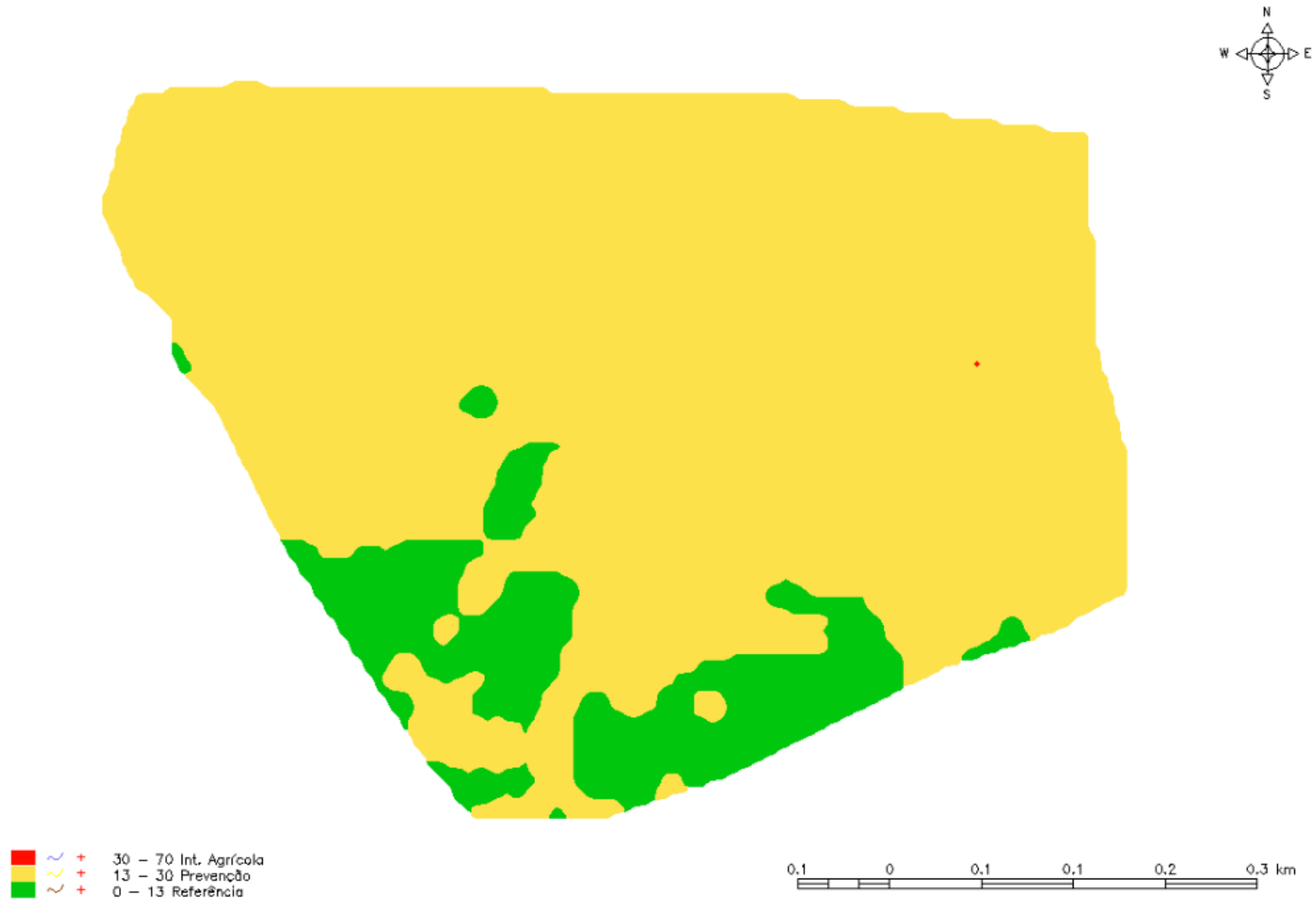


Figura 5. Variabilidade espacial de níquel (Ni) em Latossolo vermelho Eutroférico.

## 2.4 Conclusões

A área destinada a práticas agrícolas sob diferentes tipos de manejo apresentou, em larga escala, contaminação do solo por Cd e Cr e contaminação pontual por Ni. Mesmo o Cd apresentando concentração elevada em solo de mata nativa, podendo ser devida ao material de origem da área, este, também apresentou concentrações elevadas em área agrícola indicando sua acumulação.

O Cr, metal com os maiores teores médios na área total, se encontra acumulado tanto em área com aplicação de lodo de esgoto, a qual o contém em sua composição, como também em área com aplicação de fertilizantes minerais.

A análise de componentes principais (CP1) mostrou que tanto a fertilização mineral quanto a aplicação de lodo de esgoto contribuíram no acúmulo de Ni e Cr no solo (PC 235, PC 280 e PL 403A). Também mostrou que os manejos sob sistemas de plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos, plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais e plantio convencional com aplicação de lodo de esgoto, em relação à retenção dos metais no solo, não apresentaram diferença. Uma das formas de remover e/ou reduzir quantidades de metais pesados em solos é o uso de técnicas de biorremediação, como a fitorremediação.

## 2.5 Referências

ALI, S.M.; MALIK, R.N. Spatial distribution of metals in top soils of Islamabad City, Pakistan. **Environmental Monitoring Assessment**, Dordrecht, v. 172, p. 1-16, 2011. doi: 10.1007/s10661-010-1314-x

AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; COSTA, L. M.; OLIVEIRA, C.; VELLOSO, A. C. X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 16, p. 271-276, 1992.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 420, de 28 de dezembro de 2009. Brasília, DF: Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

CAI, L.; XU, Z.; BAO, P.; HE, M.; DOU, L.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; ZHU, Y. Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and source of arsenic and heavy metals in the agricultural soils in Shunde, Southeast China. **Journal of Geochemical**

**Exploration**, Amsterdam, v. 148, p. 189-195, 2015. doi: 10.1016/j.gexplo.2014.09.010

CAMPOS, M. L.; SILVA, F. D.; FURTINI NETO, A. E.; GUILHERME L. R. G.; MARQUES. J. J.; ANTUNES, A. S. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 361-367, 2005.

CARDOSO, E.L.; SILVA, M.L.N.; SILVA, C.A.; CURI, N.; FREITAS, D.A.F. Estoques de carbono e nitrogênio em solo sob florestas nativas e pastagens no bioma Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1028-1035, 2010.

CARVALHO, V. G. B. **Teores de elementos tóxicos e micronutrientes em fertilizantes e corretivos comercializados no nordeste do Brasil**. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Decisão de Diretoria nº 045-2014-E-C-I**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; 2005. Disponível em: <<http://solo.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/34/2014/12/DD-045-2014-P53.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

CHANDRASEKARAN, A.; RAVISANKAR, R.; HARIKRISHNAN, N.; SATAPATHY, K.K.; PRASAD, M.V.R.; KANAGASABAPATHY, K.V. Multivariate statistical analysis of heavy metal concentration in soils of Yelagiri Hills, Tamilnadu, India – Spectroscopical approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 137, p. 589-600, 2015. doi: 10.1016/j.saa.2014.08.093

CHEN, T.; LIU, X.M.; ZHU, M.Z.; ZHAO, K.L.; WU, J.J.; XU, J.M.; HUANG, P.M. Identification of trace element sources and associated risk assessment in vegetable soils of the urban–rural transitional area of Hangzhou, China. **Environmental Pollution**, Dordrecht, v. 151, p. 67-78, 2008. doi:10.1016/j.envpol.2007.03.004

COSTA, F.X.X.; BELTRÃO, N.M.E.M.; CRUZ, O.; SILVA, F.E.A.A.; FILHO, J.S. M. M.; SILVA, M.A.S. Disponibilidade de nutrientes no solo em função de doses de matéria orgânica no plantio da mamona. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró. v.5, p.204-212, 2010.

FAGBOTE, E.O.; OLANIPEKUN, E.O. Evaluation of the Status of Heavy Metal Pollution of Soil and Plant (*Chromolaena odorata*) of Agbabu Bitumen Deposit Area, Nigeria. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 5, n. 4, p. 241-248, 2010.

GHREFAT, H.A.; RUKAH, Y.A.; ROSEN, M.A. Application of geoaccumulation index and enrichment factor for assessing metal contamination in the sediments of Kafra Dam, Jordan. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 178, p. 95-109, 2011. doi: 10.1007/s.10661.010.1675.1

HARMANESCU, M.; LIANA, M.A.; DESPINA, M.B.; IOAN, G.; IOSIF, G. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. **Chemistry Central Journal**, London, v. 5, p. 1-10, 2011. doi: journal.chemistrycentral.com.content.5.1.64

INPE. **SPRING** (Sistema para Processamento de Informações Georeferenciadas), version 5.2.7. 2014. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/spring/portugues/download.php>>. Acesso em: 25 out. 2015.

JIAO, W.; CHEN, W.; CHANG, A. C.; PAGE, A. L. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 168, p. 44-53, 2012.

LADO, L.R.; HENGL, T.; REUTER, H.I. Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. **Geoderma**, Amsterdam, v. 148, p. 189-199, 2008. doi:10.1016/j.geoderma.2008.09.020

LIMA, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; ALBUQUERQUE, R.C.; FERREIRA, G.B.; SAMPAIO, L.R.; BELTRÃO, N.E.M. Capacidade da cinza de madeira e do esterco bovino para neutralizar o alumínio trocável e promover o crescimento da mamoneira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.13, p.9-17, 2009.

LOPEZ, M.Á.; MAGNITSKI, S. Nickel: the last of the essential micronutrients. **Agromía Colombiana**, Bogotá, n. 9. v. 1, p.49-56, 2011.

LOPES A. S.; GUILHERME, L. R. G. **Interpretação de análise de solo. Conceitos e aplicação**. Viçosa: ANDA, 2004. (Boletim Técnico, 2).

MCBRIDE, M.B. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 5-19, 2003. doi: 10.1016/S1093.0191.(02).00141.7

MICÓ, C.; PERIS, M.; SÁNCHEZ, J.; RECATALÁ, L. Heavy metal content of agricultural soils in a Mediterranean semiarid area: the Segura River Valley (Alicante, Spain). Spanish **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, p. 363-372, 2006.

MONICO, J.F.G. **Posicionamento pelo NAVSTAR – GPS**. Descrição, fundamentos e aplicações. Presidente Prudente: UNESP, 2.ed., 2008. 480 p.

MORTVEDT, J.J. Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. **Fertilizer Research**, Dordrecht, v. 43, p. 55-61, 1996.

MOURA, M.C.S.; LOPES, A.N.C.; MOITA, G.C.; NETO, J.M.M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina. **Química Nova**, São Paulo, n. 29. v. 3, p. 429-435, 2006.

NOGUEIRA, T.A.R.; OLIVEIRA, L.R.; MELO, W.J.; FONSECA, I.M.; DE MELO, G.M.P.; DE MELO, V.P.; MARQUES, M.O. Cádmiu, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, p. 2195-2207, 2008.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant Science**, Leimerick, v. 199–200, p. 79–90, 2013.

QUENEA, K.; LAMY, I.; WINTERTON, P.; BERMOND, A.; DUMAT, C. Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. **Geoderma**, Amsterdam, v. 149, p. 217-223, 2009. doi:10.1016/j.geoderma.2008.11.037

RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001.

SANTOS, H. P.; SPERA, S. T.; TOMM, G. O.; KOCHANN, R. A.; ÁVILA, A. EFEITO DE SISTEMAS DE MANEJO DE SOLO E DE ROTAÇÃO DE CULTURAS NA FERTILIDADE DO SOLO, APÓS VINTE ANOS. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.2, p.441-454, 2008.

SOARES, A. P.; WEBER, O. L. S.; ESPÍRITO SANTO, O. Metais pesados em calcários do Estado de Mato Grosso. **Geociências**, Rio Claro, v. 34, p. 465-474, 2015.

SOUZA, E.D.; COSTA, SEVGA.; ANGHINONI, I.; CARVALHO, P.C.F.; OLIVEIRA, E.V.F.; MARTINS, A.P.; CAO, E.; ANDRIGHETTI, M. Soil aggregation in a crop-livestock integration system under no-tillage. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, p. 1365-1374, 2010.

STATSOFT. **STATISTICA (data analysis software system), version 7**. 2004. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 25 maio 2015.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **3050B**. Revision 2. 1996. Disponível em: <<http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

ZHANG, X. P.; DENG, W.; YANG, X. M. The background concentrations of 13 soil trace elements and their relationships to parent materials and vegetation in Xizang (Tibet), China. **Journal of Asian Earth Sciences**, Amsterdam, v. 21, p. 167-174, 2002.

ZHENG, L.G.; LIU, G.J.; KANG, Y.; YANG, R.K. Some potential hazardous trace elements contamination and their ecological risk in sediments of western Chaohu

Lake, China. **Environmental Monitoring Assessment**, Dordrecht, v. 166, p. 379-386, 2010. doi: 10.1007/s.10661.009.1009.3

### **CAPÍTULO 3 – Isolamento e identificação de bactérias resistentes a cádmio, cromo e níquel com potencial para biorremediação**

**RESUMO:** Atividades antrópicas alteram a qualidade do solo e afetam a microbiota local, sendo a contaminação por metais pesados uma das atividades que mais causam danos ao solo. Visando a descontaminação, desintoxicação ou recuperação do solo contaminado, técnicas que associam plantas a micro-organismos, biorremediação, como a fitorremediação, vem sendo aplicadas. Portanto o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bactérias resistentes a cádmio (Cd), cromo (Cr) e níquel (Ni), bem como caracterizá-las para o uso em processos biotecnológicos e/ou biorremediação de solo contaminado com esses metais. Foram obtidos 592 isolados de 19 amostras de solo de área cultivada há 80 anos sob diferentes tipos de manejos. Todos os isolados foram submetidos a teste de resistência a cádmio, cromo e níquel. Os isolados resistentes a esses metais em maiores concentrações foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético (AIA). Os isolados foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA. Os isolados 209/16, 395/8, 395/10 e 395/18 apresentaram resistência a Cr e Cd em concentrações de até 5 mmol L<sup>-1</sup>. Esses isolados foram identificados como *Paenibacillus sp.*, *Burkholderia sp.* e os dois últimos como *Cupriavidus sp.* O isolado 185/9 foi identificado como *Ensifer sp.* e apresentou resistência a Cd, Cr e Ni, simultaneamente, na concentração de 2,5 mmol L<sup>-1</sup>. Todas as bactérias isoladas apresentam potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação ou fitorremediação em amostras contaminadas com os metais pesados Cd, Cr e Ni, considerando suas características como solubilizadoras de fosfato e produtoras de ácido indolacético (AIA).

**Palavras-chave:** *Burkholderia sp.*, *Cupriavidus sp.*, *Ensifer sp.*, fitorremediação, *Paenibacillus sp.*, resistência.

**ABSTRACT:** Anthropogenic activities change the soil quality and affect the local microbiota, being the contamination by heavy metals one of the activities that most damage soil. Aimed at contaminated soil decontamination, detoxification or regeneration, techniques that associate plants with microorganisms, bioremediation, as phytoremediation, have been applied. However the objective of this work was to isolate and identify cadmium (Cd), chromium (Cr) and nickel (Ni) resistant bacteria, as well to characterize them to biotechnology process use and/or contaminated soil bioremediation. From 19 soil samples were obtained 592 bacteria isolates from cropland cultivated during 50 years under different types of management. All isolates were submitted to resistance tests to Cd, Cr and Ni. The resistant isolates to Cd, Cr and Ni, at higher concentrations, were evaluated for ability to phosphate solubilization and indole-acetic-acid (IAA) production. The isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing. The isolates 209/16, 395/8, 395/10 and 395/18 presented resistance to Cr, and Cd at up 5 mmol L<sup>-1</sup> concentration. These isolates were identified as *Paenibacillus* sp., *Burkholderia* sp. and the last two as *Cupriavidus* sp. The isolate 185/9 was identified as *Ensifer* sp. and presented resistance to Cd, Cr and Ni, simultaneously, at 2,5 mmol L<sup>-1</sup> concentration. All isolated bacteria presented potential to be used in bioremediation or phytoremediation process in contaminated samples with heavy metal, Cd, Cr and Ni, considering their phosphate solubilizing and IAA production characteristics.

**Keywords:** *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp., *Ensifer* sp., phytoremediation, *Paenibacillus* sp., resistance.

### 3.1 Introdução

O solo é um dos principais componentes do ambiente, não sendo apenas um local para descarte de contaminantes, atua como tampão natural, controlando o transporte de substâncias e elementos químicos para atmosfera, biosfera, etc (CAI et al., 2015). Várias atividades humanas, especialmente as industriais e agrícolas, contribuem para a poluição de solos, principalmente a contaminação por metais pesados (CHEN et al., 2015).

A presença, o comportamento e a distribuição de metais pesados no solo estão associados a diferentes fontes, como intemperismo, erosão de rochas-mães, mineração, fundição, agricultura intensiva, aplicação de lodo de esgoto, emissões veiculares, bem como incineração de resíduos urbanos e industriais, que aumentam a concentração de metais no ambiente e conseqüentemente no solo (GU GUANG et al., 2014; POLETTI et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2011).



Os micronutrientes são normalmente estudados em solos, pois seus teores podem ser interpretados como índices confiáveis de fertilidade, concentrações necessárias para a manutenção das plantas, ou poluição ambiental, quando esses elementos estão presentes no solo em concentrações que podem impactar negativamente o ambiente. O elemento níquel (Ni) colabora com o desenvolvimento das plantas, porém sua escassez não é considerada um fator limitante, no entanto o seu excesso afeta o crescimento das raízes e parte aérea das plantas e também pode causar clorose (redução da produção de clorofila). Os elementos crômio (Cr) e cádmio (Cd) são considerados não essenciais e até mesmo tóxicos para plantas em quantidades mínimas (HARMANESCU et al., 2011; DE MOURA et al., 2006).

Estes elementos também podem trazer riscos à saúde humana quando há ingestão de alimentos contaminados por tais metais. O Cd pode causar disfunção renal, hipertensão e até mesmo câncer. O Cr pode causar problemas na artéria que irriga a tireóide, policitemia sobre a produção de glóbulos vermelhos (hemácias) e problemas na artéria coronária direita. Já a ingestão de alimentos contaminados por Ni pode causar parada cardíaca fatal, erupções cutâneas, fadiga, dores de cabeça, problemas cardíacos, tonturas e doença respiratória (KHAN et al., 2013; MUHAMMAD et al., 2011).

Os metais pesados são altamente tóxicos para a maioria dos micro-organismos, no entanto existem bactérias que possuem uma variedade de mecanismos de resistência que as tornam capazes de lidar com elevadas concentrações de metais pesados sendo utilizadas como agentes de absorção e adsorção para remoção de metais (CONGEEVARAM et al., 2007; GAYLARDE et al., 2005). Estes mecanismos de resistência, codificados por genes cromossômicos incluem: bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal dentro da célula, redução do contaminante a uma forma menos tóxica e produção de exopolissacarídeos (ABDELATEY et al., 2011).

A capacidade dos micro-organismos em converter substâncias tóxicas em compostos menos nocivos ou facilitar sua remoção de um local é à base do processo conhecido como biorremediação. Portanto, este processo consiste na utilização de agentes biológicos para transformação ou remoção de resíduos tóxicos ambientais (KRASTANOV et al., 2013).

Dentre as técnicas de biorremediação existentes podemos citar a fitorremediação; técnica utilizada na remoção de metais pesados do solo por vegetais. Essa técnica pode estar associada ao uso de micro-organismos. Algumas bactérias são capazes de sintetizar hormônios promotores de crescimento, auxinas, em especial o ácido indolacético (AIA) e capazes de solubilizar fosfato (ULLAH et al., 2015), tais características associadas aos vegetais podem acelerar o processo de fitorremediação.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias resistentes a metais pesados como o cádmio, cromo e níquel de solo de área agrícola, além de caracterizar esses isolados quanto à capacidade de produção AIA e de solubilização de fosfato para utilização em processos de fitorremediação em solos contaminados.

## **3.2 Metodologia**

### **3.2.1 Amostras de solo**

Foram coletadas dezenove amostras de solo, de áreas agrícolas, cultivado há mais de 80 anos com parte destinada à pesquisa nos últimos 50 anos. As coletas foram realizadas no período de 19 a 21 de fevereiro de 2014 com auxílio de trado holandês na profundidade de 0 – 20 cm, sendo os solos amostrados classificados como Latossolo Vermelho Eutroférico (Lvef). Os manejos empregados no solo amostrado de três áreas usadas para plantio de milho são: plantio direto (PD) e aplicação de fertilizantes minerais há 25 anos; plantio convencional (PC) e aplicação de fertilizantes minerais há 50 anos e cultivo mínimo e aplicação de lodo de esgoto (PL) há 17 anos. O lodo de esgoto empregado é procedente da Sabesp (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo), unidades de Barueri-SP, Monte Alto-SP e Franca-SP e foi usado nas doses de 0,0 Mg ha<sup>-1</sup> (testemunha com fertilização mineral baseada na análise química do solo); 5,0 Mg ha<sup>-1</sup>; 10,0 e 20,0 Mg ha<sup>-1</sup> (base seca). Solo controle foi coletado de uma área de mata nativa (MN).

A área amostral, pertencente à Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão (FEPE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal - SP, localiza-se em torno da latitude de 21°14'47" S e longitude de 48°17'00" W,

com altitude e declividade médias de 560 m e 6 %, respectivamente. O clima da região é tropical com temperatura e precipitação média, ao longo de cinco anos, de 22,64°C e 1257,6 mm, respectivamente.

Os pontos de coletas foram georreferenciados com receptor GNSS Trimble R6 operado no método de posicionamento cinemático em tempo real (RTK), adotando-se como estação base marco geodésico pertencente ao Sistema Geodésico Brasileiro (SGB). As coordenadas plano-retangulares projetadas no sistema de projeção Universal Transversa de Mercator – UTM (Fuso 22, Hemisfério Sul) são exibidas na Tabela 5. Adotou-se como sistema de referência geodésico o Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas – SIRGAS2000.

Tabela 5. Coordenadas plano-retangulares (Projeção UTM)

<b>Pontos</b>	<b>E (m)</b>	<b>N (m)</b>
<b>PC 184</b>	782.389,13	7.647.906,75
<b>PC 185</b>	782.419,13	7.647.906,75
<b>PC 279</b>	782.149,13	7.648.026,75
<b>PC 280</b>	782.179,13	7.648.026,75
<b>PC 356</b>	781.999,13	7.648.116,75
<b>PC 357</b>	782.029,13	7.648.116,75
<b>PC 368</b>	782.359,13	7.648.116,75
<b>PC 395</b>	782.329,13	7.648.146,75
<b>PC 209</b>	782.389,13	7.647.936,75
<b>PC 235</b>	782.389,13	7.647.966,75
<b>PC 384</b>	781.999,13	7.648.146,75
<b>PC 410</b>	781.999,13	7.648.176,75
<b>PC 191</b>	781.849,13	7.647.936,75
<b>PC 192</b>	781.879,13	7.647.936,75
<b>PC 75</b>	781.969,13	7.647.786,75
<b>PC 76</b>	781.999,13	7.647.786,75
<b>PD 378</b>	781.819,13	7.648.146,75
<b>PL 403A</b>	781.806,69	7.648.185,94
<b>MN 501</b>	782.679,84	7.647.854,85

PC – Área sob sistema de plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais; PD - área sob sistema de plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais; PL – área sob cultivo mínimo com aplicação de lodo de esgoto; MN - área de mata Nativa.

### 3.2.2 Determinação de Cd, Cr e Ni em amostras de solo

Os solos amostrados foram secos ao ar e a sombra por 72 h em casa de vegetação, destorroados e peneirados utilizando peneira de 2 mm.

Para mensurar a concentração dos metais Cd, Cr e Ni adotou-se metodologia 3050B da USEPA, *United States Environmental Protection Agency* (1996), sendo a quantificação dos metais nos extratos realizada por espectroscopia de absorção atômica com chama ar-acetileno em espectrofotômetro GBC Avanta.

### 3.2.3 Isolamento de bactérias resistentes a Cd, Cr e Ni

Para isolar as bactérias do solo foi realizada diluição de 0,5 g de solo em 4,5 mL de NaCl 0,85 % (m/v) e, em seguida foram feitas três diluições seriadas de 10x (500  $\mu$ L) em 4,5 mL de NaCl 0,85 % (m/v), inoculando, em triplicata, 100  $\mu$ L da terceira e quarta diluição em placas petri com meio de cultura PGE sólido (0,5 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 10 g L<sup>-1</sup> de glicose; ágar 9 g L<sup>-1</sup> e pH final de 6,8), com adição do antifúngico cicloheximida na proporção de 10 mL L<sup>-1</sup>, conforme descrito por Sacco (2013). Após o crescimento das colônias foram realizados cálculos de unidade formadora de colônia (UFC).

As placas foram incubadas em estufa BOD a 30°C por 72 h. As colônias isoladas obtidas foram coletadas em microtubos de 2 mL contendo meio PGE líquido e incubadas para cultivo por 24 h. Posteriormente, retirou-se 30  $\mu$ L, que foram pré-cultivados em micro-placas com 96 poços contendo 1,2 mL de meio líquido PGE durante 72 h, a 30°C e 150 rpm. Após esse período os isolados foram inoculados nas placas contendo meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) com íons Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup> e Ni<sup>2+</sup> nas seguintes concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, obtidas a partir de soluções preparadas pela dissolução de CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O em água deionizada. As placas foram incubadas a 30°C, por 72 h (Cd e Ni) e 120 h (Cr). A resistência dos isolados foi determinada pela capacidade de desenvolvimento dos mesmos nesses meios.

### **3.2.4 Solubilização de fósforo**

As bactérias que apresentaram maiores resistências aos metais foram inoculadas (10 µL) em placas com meio sólido NBRIP (NAUTIYAL, 1999) e incubadas a 30°C por 96 h. A solubilização do fósforo foi avaliada pela formação de halo ao redor das colônias, sendo a eficiência de solubilização calculada pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias (BERRAQUERO et al., 1976).

### **3.2.5 Produção de ácido indolacético (AIA)**

As estirpes bacterianas resistentes às maiores concentrações dos metais foram previamente cultivadas em meio PGE suplementado com 100 µg de L-tryptophan, aminoácido precursor para biosíntese do AIA) por 24 h, a 30°C e 150 rpm. Estas amostras foram centrifugadas durante 30 min a 10.000 xg a 4°C. Foram coletados 500 µL do sobrenadante e este foi misturado vigorosamente com 1 mL de Reagente de Salkowski (GORDON e WEBER, 1950). A mistura foi incubada durante 30 min no escuro. A presença de auxina foi visualizada pela coloração avermelhada e quantificada por leitura de absorvância a 530 nm, sendo as medidas de absorvância realizadas em triplicata. A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada com o auxílio de uma curva analítica obtida a partir de soluções padrões de AIA nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100 e 125 µg mL<sup>-1</sup>, com R<sup>2</sup> = 0,9745. Para a análise dos dados de produção de AIA realizou-se ANOVA pelo programa R, sendo todos os dados expressos pela média das triplicatas. Foi utilizado o teste de Tukey para comparar as médias dos tratamentos; a variabilidade nos dados foi expressa pelo desvio e p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### **3.2.6 Identificação de bactérias**

Os isolados bacterianos resistentes às maiores concentrações de Cd, Cr e Ni foram cultivados em meio PGE e usados para a extração de DNA, segundo Marmur (1961), sendo a qualidade dos DNAs avaliadas por eletroforese em gel de agarose

0,8 % e as quantidades de DNA determinadas em nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific).

A amplificação do gene 16S rRNA foi feita pela reação em cadeia polimerase (PCR) usando oligonucleotídeos universal fD1 (5'-CCg AAT TCg TCg 33 ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g - 3') e rD1 (5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA ggT gAT CCA gCC - 3') (WEISBURG et al., 1991) e primers internos 362f (região 339-362), 786f (região 746-786) e 1203f (região 1179-1203) segundo Inui et al. (2012). As reações de PCR continham 20 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl; 1,5 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>; 5 pmol de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de Taq polimerase Fermentas e 40 ng de DNA. O DNA foi amplificado em termociclador PTC-100™ “Programmable Thermal Controller” – MJ Research, Inc. de acordo com o programa: pré-aquecimento a 95°C por 1 minuto; 39 ciclos de 2 min de desnaturação a 95°C; 1 min de emparelhamento dos oligonucleotídeos a 36°C; 1 min de elongação a 72°C e 5 min de etapa de extensão final a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “DNA Clean & Concentrator™ -5” Zymo Research e o sequenciamento do 16S rRNA foi realizado na plataforma ABI 3700 (Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas, preliminarmente, com os programas “Sequencing Analysis 3.4” e “Phred/ Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). As sequências com mais de 400 bases e com qualidade Phred acima de 20 foram selecionadas, com auxílio do programa Contgen. As sequências em formato fasta foram comparadas com sequências do GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e também analisadas no banco Ribossomal Database Project (RDP). Para alinhar as sequências de DNA, utilizou-se o programa BioEdit (HALL, 2001), e para a construção da árvore filogenética foi adotado como método de distância *Maximum Likelihood* sendo, as análises filogenéticas evolutivas e moleculares realizados utilizando MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013).

### **3.3 Resultados e discussão**

#### **3.3.1 Características do solo**

Nas áreas onde as práticas agrícolas são intensas, os metais pesados são adicionados devido a utilização de fertilizantes comerciais, lodo de esgoto e pesticidas (CHEN et al., 2008; CAI et al., 2010). O Cd, por exemplo, é encontrado naturalmente nos solos pelo desgaste da rocha de origem sendo as rochas sedimentares as que apresentam a maior concentração deste metal. É constituinte dos fertilizantes fosfatados, que são fontes de contaminação para solos agrícolas (ALLOWAY, 1995b). O Cr é encontrado nos solos com outros elementos na forma de óxidos de ferro e de chumbo. Já a quantidade de Ni tem aumentado muito nos solos devido atividades antrópicas como descarte incorreto de resíduos, aplicação de fertilizantes, pesticidas agrícolas e lodo de esgoto (LOPEZ e MAGNITSKI, 2011).

As concentrações dos metais quantificados no solo e as UFC estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações de níquel (Ni), cádmio (Cd) e cromo (Cr) nas amostras de solos utilizadas para isolar bactérias resistentes a metais pesados; número total de bactérias por grama de solo (UFC/ g solo) e número de isolados morfológicamente diferentes obtidos.

<b>Pontos</b>	<b>Ni mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Cd mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Cr mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>UFC 10<sup>6</sup> (g solo)<sup>-1</sup></b>	<b>Nº de isolados</b>
<b>PC 184</b>	22,77	0,99	83,38*	4,11	27
<b>PC 185</b>	17,21	1,45*	62,39	4,53	21
<b>PC 279</b>	16,92	0,80	64,39	5,55	30
<b>PC 280</b>	29,14	1,43*	97,03*	0,66	22
<b>PC 356</b>	21,26	1,08	64,81	5,90	28
<b>PC 357</b>	23,85	1,28	94,29*	5,26	19
<b>PC 368</b>	31,15*	1,24	70,55	6,50	42
<b>PC 395</b>	20,83	1,20	56,65	11,19	40
<b>PC 209</b>	13,92	0,96	73,70	5,60	44
<b>PC 235</b>	41,09*	0,62	81,22*	8,40	48
<b>PC 384</b>	28,92	1,57*	77,30*	5,18	21
<b>PC 410</b>	18,01	0,83	65,08	6,79	25
<b>PC 191</b>	20,10	0,72	58,37	1,10	23
<b>PC 192</b>	16,14	2,4*	51,81	3,93	39
<b>PC 75</b>	12,25	1,56*	51,42	7,20	32
<b>PC 76</b>	14,84	0,43	57,67	7,00	54
<b>PD 378</b>	19,69	1,19	74,47	3,75	26
<b>PL 403A</b>	31,04*	1,53*	86,53*	18,63	26
<b>MN 501</b>	16,99	1,38*	57,43	1,28	25
<b>VP CONAMA</b>	<b>30</b>	<b>1,3</b>	<b>75</b>	<b>---</b>	<b>Total = 592</b>

\* concentrações de metais que ultrapassaram os valores de prevenção (VP) do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que por meio da Resolução 420/2009, dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. PC – área sob sistema de plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais; PD - área sob sistema de plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais; PL – área sob cultivo mínimo com aplicação de lodo de esgoto; MN - área de mata nativa.

Conforme apresentado na Tabela 6, 15,8 % das amostras apresentaram concentrações de Ni acima do valor de prevenção (VP) recomendado pelo CONAMA que é de 30 mg kg<sup>-1</sup>; 36,8% das amostras estão acima do VP para Cd que é de 1,3 mg kg<sup>-1</sup> e 31,58% estão acima do VP para Cr que é de 75 mg kg<sup>-1</sup>. O solo de mata nativa apresentou concentração acima do VP apenas para Cd e isto é explicado pelo material de origem da área, Basalto (CAI et al., 2015). Alguns pontos



estão acima do valor de prevenção para mais de um metal, que é o caso de Cd e Cr (em PC 280 e PC 384); de Ni e Cr (em PC 235) e para os três metais em PL 403.

Não parece existir qualquer correlação entre o número de UFC e a concentração de metais no solo (Tabela 6). Os dois maiores valores de UFCs estão em PC 395, que apresentou concentrações moderadas de metais e em PL 403A caracterizado por apresentar altas concentrações de Ni, Cd e Cr. Por outro lado, os menores valores de UFC foram observados em PC 280, PC 191 e MN 501, cujas amostras possuem quantidades variadas de metais em sua composição.

### 3.3.2 Bactérias resistentes a metais pesados

A presença de micro-organismos em locais contaminados está relacionada aos mecanismos de resistência que eles apresentam e também a adaptação às condições locais. Esses micro-organismos se proliferam e se tornam dominantes, pois utilizam os substratos poluentes como fonte de nutrientes (KUIPER et al., 2004). Desta forma os 592 isolados, morfologicamente diferentes, obtidos nos pontos amostrados foram avaliados quanto à resistência ao Ni, Cd e Cr, Figura 6.

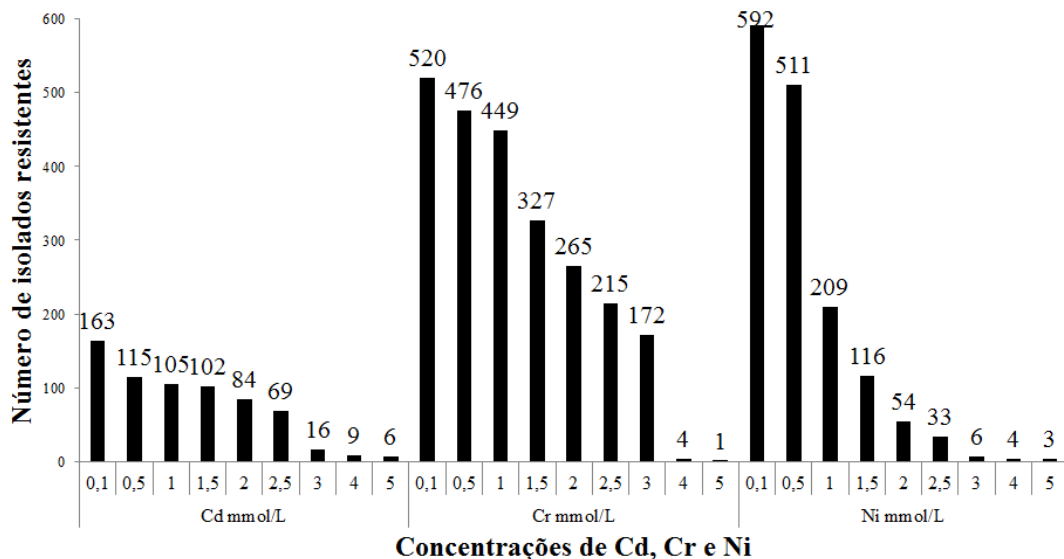


Figura 6. Número de isolados bacterianos resistentes às concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de Cd, Cr e Ni em meio DYGS.

O número de isolados resistentes aos metais diminuiu com o aumento da concentração deles no meio de cultivo (Figura 6). Entretanto, as bactérias isoladas apresentam sensibilidade diferente frente aos três metais estudados. Baixa

concentração de cádmio ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) é suficiente para impedir o desenvolvimento de mais de 70% dos isolados. Por outro lado, as concentrações de cromo e níquel que proporcionam essa mesma taxa de inibição de crescimento são 3 e  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, nas concentrações superiores a  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  dos três elementos ocorreu diminuição significativa do número de isolados que conseguem se desenvolver *in vitro*.

A diminuição do número de isolados que podem ser cultivados em altas concentrações de metais está relacionada à capacidade de resistência que algumas bactérias apresentam. Algumas espécies bacterianas são resistentes à presença de contaminantes, como metais pesados, sendo esta resistência desenvolvida por características do genoma e metabolismo (LOPES et al., 2011). Por outro lado, a resistência a metais pode ocorrer devido a exposição prolongada, a qual favorece a seleção e proliferação de micro-organismos tolerantes ao estresse causado pelos metais (HUTCHINSON e SYMINGTON, 1997).

Observou-se que de um total de 592 bactérias isoladas, o número de organismos resistentes ao  $\text{Cd}^{2+}$  teve uma queda acentuada na concentração de  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e na concentração de  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  verificou-se uma queda significativa do número de isolados, passando de 11,65 para 2,7 %. Ayano et al. (2014) verificaram que  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  foi a concentração de  $\text{Cd}^{2+}$  que mais inibiu o desenvolvimento de bactérias isoladas de solo. Este elemento pode causar danos irreversíveis às células bacterianas, pois se ligam a proteínas respiratórias e produzem oxigênio reativo, além de reduzir a taxa de crescimento, diminuir a densidade celular e até mesmo levar a morte (LEE et al., 2001; MA et al., 2009).

Quando se analisa a resistência ao Cr observa-se que  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  foi a concentração que mais interferiu no desenvolvimento de bactérias, ou seja, promoveu diminuição de 29,1 para 0,7 % isolados resistentes. O maior número de isolados resistentes ocorreu em meio contendo Cr, o que pode estar relacionado à utilização de Cr(III), forma menos tóxica deste metal, para o preparo do meio de cultivo. Sotero-Martins et al. (2014) avaliaram o potencial de biorremediação de bactérias e observaram que 25,2 % apresentaram resistência a Cr até  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0,0192 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Mesmo este metal apresentando toxicidade, tanto na forma hexavalente quanto na trivalente, observa-se que algumas bactérias são tolerantes a

este elemento. A tolerância a metais está relacionada à produção de substâncias quelantes capazes de se ligarem e complexarem metais, favorecendo o desenvolvimento destes micro-organismos em ambientes em que a microbiota esteja em constante competição (ULLAH et al., 2015).

O percentual de bactérias resistentes a Ni na concentração de 2 mmol L<sup>-1</sup> passou de 9,1 para 1,0 % em 3 mmol L<sup>-1</sup>. Castro-Silva et al. (2003) isolaram e caracterizaram bactérias resistentes a 10 mmol L<sup>-1</sup> de Ni em ambientes de mineração de carvão. Isolados obtidos em área de descarte de resíduos urbanos apresentaram resistência a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (8,52 mmol L<sup>-1</sup>) de Ni (Samanta et al., 2012). O níquel é um metal importante para a constituição e atividade de muitas metaloenzimas (MARSCHNER, 1995; NEGI et al., 2014). Por outro lado, ele também pode alterar os padrões de metilação de citosina provocando hipometilação ou hipermetilação do DNA, que pode levar a instabilidade cromossômica ou aumento da susceptibilidade dos cromossomos para quebras, respectivamente (KOVALCHUK et al., 2001). A genotoxicidade induzida por Ni pode ser devida às interações deste metal com as proteínas da cromatina formando ligação cruzada proteína-DNA (ROSSMAN, 1995; ANJUM et al., 2015).

Dos 592 isolados bacterianos, apenas 17 diferentes isolados se desenvolveram em meio contendo 4 mmol L<sup>-1</sup> dos metais e estes foram submetidos a testes de resistência a 5 mmol L<sup>-1</sup>. Dos 17 isolados avaliados 10 foram resistentes a essa nova concentração de metal. Para o Cd foram observados 6 isolados resistentes, sendo todos obtidos de amostra de solo da área de plantio convencional, PC 395, e plantio direto PD 378 (isolados 378/8, 395/8, 395/10, 395/18, 395/23, 395/33). O micro-organismo resistente a 5 mmol L<sup>-1</sup> de Cr foi isolado da amostra PC 209 (isolado 209/16) e, os resistentes a 5 mmol L<sup>-1</sup> de Ni foram obtidos das amostras de solo da área PC 209 e PC 280 (isolados 209/9, 209/22 e 280/21). Esses isolados foram selecionados para estudos de produção de AIA e capacidade de solubilização de fosfato.

### **3.3.3 Índice de solubilização de fosfato (MSP) e produção de AIA por bactérias resistentes a metais**

Dez isolados bacterianos morfologicamente e bioquimicamente diferentes (avaliados por eletroforese de alfa-esterase em gel de poliacrilamida, dados não mostrados) e resistentes à concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup> dos metais (citados no item anterior), juntamente com três isolados resistentes a 2,5 mmol L<sup>-1</sup>, simultaneamente aos mesmos metais (185/9, 185/10 e 185/15) foram avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato e produção de fitohormônio – auxina (AIA). Dos 13 isolados estudados observa-se (Tabela 7) que apenas sete apresentaram formação de halo de solubilização de fosfato e todos apresentaram produção de AIA, sendo que uma apresentou uma produção significativa.

Tabela 7. Produção de ácido indolacético (AIA), índice de solubilização de fosfato e resistência a 5 mmol L<sup>-1</sup> por 13 isolados bacterianos de solo agrícola.

Isolados	Resistência aos metais	Índice de solubilização de fosfato	Produção de AIA (µg mL <sup>-1</sup> ) *
<b>185/9</b>	Cd, Cr, Ni**	0	3,28 ± 0,72 j
<b>185/10</b>	Cd, Cr, Ni**	1,27	6,51 ± 0,36 e
<b>185/15</b>	Cd, Cr, Ni**	1,25	3,35 ± 0,42 i
<b>209/9</b>	Ni	1,4	10,28 ± 0,36 b
<b>209/16</b>	Cr	0	6,9 ± 0,21 d
<b>209/22</b>	Ni	1,56	3,29 ± 0,75 j
<b>280/21</b>	Ni	1,44	3,62 ± 0,42 g
<b>378/8</b>	Cd	0	6,5 ± 0,21 e
<b>395/8</b>	Cd	2,22	3,42 ± 0,36 h
<b>395/10</b>	Cd	0	45,6 ± 0,21 a
<b>395/18</b>	Cd	0	2,31 ± 0 k
<b>395/23</b>	Cd	1,63	7,69 ± 0,21 c
<b>395/33</b>	Cd	0	4,86 ± 0,21 f

\*Médias das triplicatas e desvio padrão. Letras diferentes dentro da coluna indicam diferença significativa em  $p < 0,05$  de acordo com teste de Tukey usando o *software* estatístico R.

\*\*resistência na concentração de 2,5 mmol L<sup>-1</sup>

O índice ou eficiência de solubilização de fosfato (E) variou de 1,25 a 2,22 após 96 h de incubação. O processo de solubilização pode ser classificado em baixa solubilização ( $E < 2$ ); solubilização média ( $2 < E < 3$ ) ou alta solubilização ( $E > 3$ ) (SILVA FILHO e VIDOR, 2000). Desta forma, dentre os microrganismos estudados

foi encontrado apenas 1 com eficiência de solubilização classificada como média (entre 2 e 3) e 6 estirpes com eficiência de solubilização classificada como baixa ( $E < 2$ ).

Cento e trinta (130) isolados bacterianos solubilizadores de fosfato mineral, encontradas no sudeste da Venezuela, apresentaram halo de solubilização de diferentes tamanhos o que sugeriu a existência de bactérias que exibem diferentes graus de eficiência de solubilização (PÉREZ et al., 2007). Do mesmo modo, Massenssini et al. (2008) obtiveram 66 isolados bacterianos que apresentaram formação de halo de solubilização variando de 0 a 4,07 mm e 3 isolados que apresentaram índices superiores a 3,15. Em solo contaminado com chumbo (Pb), Park et al. (2011) encontraram 18 estirpes de bactérias com potenciais de solubilização de fosfato, sendo que sete apresentaram halo de 2 mm e quatro halo com 3 mm

O uso de micro-organismos com capacidade de solubilizar fosfato tem sido empregado como forma de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, havendo assim melhor aproveitamento dos fosfatos naturais (OLIVEIRA et al., 2012) e menor contaminação do solo por metais pesados contidos nos fertilizantes minerais (SHEPPARD & THIBAUT, 1992; ALLOWAY, 1995b; LOPEZ e MAGNITSKI, 2011).

Embora o fósforo (P) seja abundante em solos nas formas inorgânicas e orgânicas, sua baixa disponibilidade às plantas é uma característica predominante nos solos brasileiros. É um elemento essencial para o desenvolvimento das raízes e perfilhamento das plantas (capacidade de alguns grupos de plantas em emitir brotação lateral), além de ser fundamental em processos de nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico. A alta capacidade de adsorção deste nutriente, em consequência da acidez e teores elevados de óxidos de ferro e alumínio, favorece sua imobilização química e sua baixa mobilidade, o que leva à necessidade de aplicação de altas quantidades de adubos fosfatados (LOPES et al., 2011; PORTO et al., 2012).

Plantas e micro-organismos podem aumentar a disponibilidade de P inorgânico através da alteração do pH e exsudar ácidos orgânicos na rizosfera (RENGEL e MARSCHNER, 2005). Apenas 0,1% da quantidade total de P está em

forma solúvel, disponível para a absorção pelas plantas (ZHOU et al., 1992), porém, uma alternativa para disponibilizar formas absorvíveis de P às plantas é o uso de inoculantes microbianos (biofertilizantes) que possuem atividade solubilizadora de P em solos (SHARMA et al., 2013). Estes micro-organismos, através de mecanismos de solubilização e mineralização, são capazes de converter formas inorgânicas e orgânicas de P do solo (KHAN et al., 2009) em forma biodisponível, facilitando assim sua absorção pelas raízes das plantas (SHARMA et al., 2013).

Com relação à produção de fitohormônio AIA, todas as bactérias estudadas apresentaram capacidade de produção diferenciada. A produção variou de  $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  (isolado 395/18) ao valor máximo da auxina ( $45,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) produzida pelo isolado 395/10.

O AIA pode ser produzido por duas fontes: pelos tecidos vegetais (produção endógena) e pela ação de micro-organismos (produção exógena), sendo esta última muito difundida entre bactérias do solo e bactérias associadas com plantas (BACA & ELMERICH, 2007). O fitormônio, produzido por micro-organismos, atua sobre o crescimento das raízes, o que resulta no aumento do comprimento, número de raízes laterais e de pelos radiculares melhorando o crescimento da planta em solos contaminados com metais pesados (RAJKUMAR et al., 2012).

O sucesso da fitorremediação, técnica que visa à descontaminação ou desintoxicação de áreas mediada por plantas, depende da resistência das plantas a metais pesados e também da produção elevada de biomassa (RASKIN et al., 1997; RAJKUMAR et al., 2012). Estudos abordam a eficiência da utilização conjunta de plantas com micro-organismos para descontaminação de áreas com metais pesados, visto a capacidade de alguns micro-organismos de promoverem alterações na mobilidade e biodisponibilidade destes elementos (AAFI et al., 2012; RAJKUMAR et al., 2012). Além disso, algumas bactérias possuem características especiais que permitem a solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio, sequestro de ferro e produção de fitohormônio que melhoram o crescimento da planta e a produção da biomassa da planta. Portanto, esses micro-organismos ajudam em processos de fitorremediação (ULLAH et al., 2015).

Neste trabalho os resultados de produção de AIA pelos isolados mostraram que essa característica não está relacionada com a capacidade de solubilização de

fosfato. O isolado 395/10 apresentou a maior produção de AIA ( $45,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e não foi capaz de solubilizar fosfato. Por outro lado, o isolado 395/8, que mostrou maior índice de solubilização de fosfato (2,22), teve baixa produção de AIA ( $3,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Vários organismos apresentam capacidade de produção do AIA. Alguns organismos, tais como, *Gluconacetobacter* spp, *Acinetobacter* spp, *Actinomyces* spp, *Agrobacterium* spp, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Burkholderia* spp, *Curtobacterium* spp, *Pantoea* spp, *Pseudomonas* spp e *Xanthomonas* spp podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pelos radiculares (PATTEN e GLICK, 1996). Esses micro-organismos, além da produção de fitohormônios, podem exercer diversas outras ações que estimulam o desenvolvimento de vegetais, sendo conhecidos como bactérias promotoras de crescimento de vegetais (PGP, plant growth promoting bactéria). As bactérias PGP são, portanto, importantes ferramentas nos processos de fitorremediação (ULLAH et al., 2015).

### 3.3.4 Identificação dos isolados

Os resultados mostraram que quatro estirpes bacterianas apresentaram resistência a concentrações de até  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  dos metais, capacidade mediana de solubilização de fosfato e/ou produção de AIA (isolados 209/16, 395/8, 395/10, 395/18). Por outro lado, o isolado 185/9, apesar de não ser bom produtor de AIA ou solubilizador de fosfato, apresentou resistência a Cd, Cr e Ni simultaneamente na concentração de  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Todas essas bactérias foram isoladas de solo agrícola sob plantio convencional (PC) com aplicação de fertilizantes minerais e apresentam potencialidade para uso em processos de fitorremediação. Portanto, os isolados descritos acima foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA. A Tabela 8 exibe os resultados da análise das sequências do gene 16S rRNA e a comparação com o banco de dados do NCBI pelo programa Blastn, assim como, o número de identificação dessas sequências depositadas nesse banco. O gene 16S rRNA dos isolados teve sua sequência completa determinada, observado pelo tamanho das sequências obtidas - aproximadamente 1500 pb. Dos cinco isolados estudados quatro apresentaram porcentagem de identificação de 99 % com espécies já descritas no banco de dados, indicando que estes isolados se

identificam com espécies já encontradas. Entretanto, o isolado 395/18 só apresenta 90 % de identidade com uma sequência de um organismo da mesma família, mas de gênero distinto do *Cupriavidus*.

Trabalho recente que compara sequências do gene 16S rRNA depositadas em bancos de dados mostra que o percentual de identidade entre sequências completa desse gene refletem a confiança em se classificar taxonomicamente isolados bacterianos. Identidade de 94,5 % ou inferior é uma forte evidência para gêneros distintos; 86,5 % ou inferior é característico de famílias distintas; 82,0 % ou inferior detecta ordens distintas; 78,5 % ou inferior é forte evidência para classes distintas e 75,0 % ou inferior é forte evidência para filos distintos (YARZA et al., 2014).

Tabela 8. Análise, comparação e identificação das sequências do gene 16SrRNA.

Isolado	Tamanho da Sequência (pb)	Identidade (%)	e value	Identificação	ID
185/9	1450	99	0.0	<i>Ensifer adhaerens</i>	KU168586
209/16	1520	99	0.0	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KU168587
395/8	1497	99	0.0	<i>Burkholderia lata</i>	KU168588
395/10	1494	99	0.0	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	KU168589
395/18	1479	90	0.0	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	KU168590

pb – pares de base; ID – identificação dos genes 16S rRNA depositados no Blastn

Portanto, cinco sequências do banco de dados NCBI que apresentaram as maiores porcentagens de similaridade com as deste estudo foram comparadas com as obtidas nesta pesquisa. Todas essas sequências foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética, sendo observado o agrupamento entre as sequências (Figura 7). A análise filogenética molecular foi realizada pelo método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura-3 (TAMURA, 1992), com bootstrap de 1000 repetições e as análises evolutivas foram realizadas no MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013).



Os dados de comparação das sequências do gene 16S rRNA dos isolados com as 5 sequências de maior identidade no banco de dados do NCBI comprovam a classificação taxonômica em gênero de 4 dos isolados, mas sugerem que esses organismos sejam diferentes daqueles cujas sequências estão depositadas. Por outro lado o isolado 395/18, apesar de estar posicionado dentro do agrupamento de diversas espécies de *Cupriavidus*, se mostrou distante filogeneticamente delas.

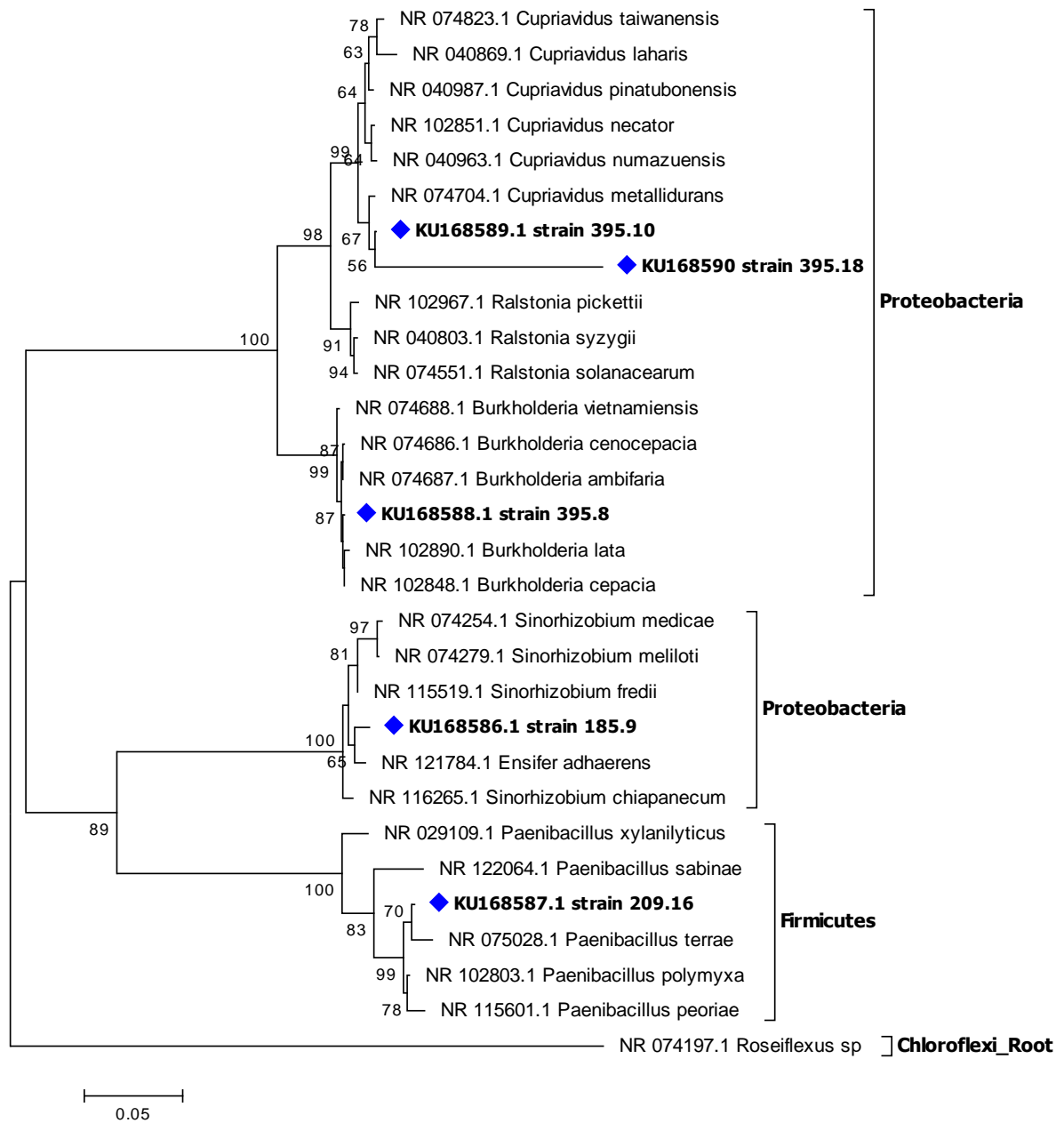


Figura 7. Análise filogenética molecular pelo método *Maximum Likelihood* (baseado no modelo Tamura-3) com bootstrap de mil repetições e análises evolutivas realizadas no MEGA v.6.

O isolado 209/16 foi classificado pela comparação da sequência do gene 16S rRNA, como pertencente ao gênero *Paenibacillus*. Bactérias desse gênero são anaeróbias facultativas, gram-positivas com formato em bastonete e apresentam formação de endósporos. Além de serem altamente eficazes no controle de fungos patogênicos de plantas e bactérias de origem do solo (LING et al., 2010), apresentam produção de enzimas hidrolíticas, compostos orgânicos voláteis (ação nematicida e antifúngica) e antibióticos eficazes contra plantas daninhas e patógenos humanos (RAZA et al., 2008; RAZA et al., 2009). Também auxiliam no crescimento de plantas, pois são fixadoras de nitrogênio, produtoras de hormônios e promovem uma maior absorção de fósforo (GOUZOU et al., 1993; RAZA et al., 2008). Esta bactéria é conhecida por produzir antibióticos peptídicos (PAMs), ativos contra bactérias gram-negativas, fungos, bactérias gram-positivas e actinomicetos (RAZA et al., 2008). Além disso, *Paenibacillus* sp. também produz grandes quantidades de EPS quando cultivadas em meio adequado e devido a esta produção de EPS vem sendo empregada para fins de biorremediação (KACI, 2006). A superfície da biomassa de *Paenibacillus* é capaz de acumular Cu(II) e Ni(II) (COLAK et al., 2013) e o EPS produzido por *Paenibacillus* pode ser usado como um agente adsorptivo eficiente de Cd<sup>2+</sup> (MOKADDEM et al., 2009).

Estudos mostraram que isolados do gênero *Paenibacillus* apresentam resistência a Ni, Cd e Cu (II) (COLAK et al., 2013; MOKADDEM et al., 2009); porém, em nosso estudo o isolado 209/16 mostrou-se resistente apenas ao Cr (5,0 mmol L<sup>-1</sup>), não apresentou produção de EPS e nem capacidade de solubilizar fosfato, entretanto produziu nos ensaios *in vitro* 6,9 µg mL<sup>-1</sup> de AIA.

A espécie *Paenibacillus polymyxa* foi o organismo cuja sequência do gene 16S rRNA do isolado 209/16 se mostrou mais similar. O *P. polymyxa* tem sido isolado de várias amostras ambientais (LAL et al., 2012). Atualmente sua aplicabilidade tem sido potencialmente demonstrada na agricultura, indústria e medicina. É conhecida por promover o crescimento de plantas e induzir resistência sistêmica induzida – controle de patógenos e por emissões de compostos orgânicos

voláteis (LEE et al., 2012; EASTMAN et al., 2014). Este gênero apresenta genes responsáveis pela síntese de fitohormônios, envolvidos na solubilização de fosfato e nas repostas ao estresse (EASTMAN et al., 2014). Além disso, o *P. polymyxa* é produtor de polimixinas E1 (colistina), um antimicrobiano polipeptídico que atua nas membranas celulares e do antibiótico *paenibacillin* (HUANG e YOUSEF, 2012). Tratando-se de resistência a metais, não foram encontrados trabalhos que evidenciassem tal resistência a Cd, Cr e Ni por essa espécie.

O isolado 395/8 foi classificado como uma bactéria do gênero *Burkholderia*. Esse gênero é classificado como gram-negativo e benéfico à agricultura, pois é capaz de competir com fitopatógenos, promover o crescimento de plantas, solubilizar fosfatos e degradar compostos xenobióticos (DOURADO et al., 2013). Sua diversidade metabólica permite utilizar herbicidas e hidrocarbonetos como fonte de carbono, apresentando assim potencial para biorremediação (COENYE et al., 2001).

Dentre os isolados avaliados, o 395/8 apresentou resistência a Cd  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  e maior índice de solubilização de fosfato. Dourado et al. (2013) isolaram espécies de *Burkholderia* sp. de solos cultivados com café e contaminados com Cd e relataram que estes isolados foram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato inorgânico. Também mencionaram que esta bactéria, ao interagir com plantas de tomates expostas ao Cd promoveu o crescimento da planta e reduziu a absorção de Cd pelas raízes, contribuindo na interação planta-micro-organismo.

Em estudo com cepas de *Burkholderia* sp. na presença de Ni em concentrações de 1 a  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ , Dourado et al. (2015) relataram que conforme se aumentava a concentração deste metal, aumentava também a biossorção. Há relatos de que esta espécie apresenta capacidade de tolerância e crescimento em elevadas concentrações não apenas de Cd e Ni, mas também de zinco (Zn), sendo a capacidade biossortiva benéfica para o crescimento de plantas em solos contaminados com estes metais devido à imobilização momentânea dos metais (GUPTA et al., 2004).

Além disso, pesquisadores demonstraram que a inoculação de *Burkholderia* sp. em cultivares de arroz resultou em um aumento na produção de grãos, sendo estas bactérias classificadas como diazotróficas (fixadoras de nitrogênio)

(GUIMARÃES et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). Em nosso trabalho essa avaliação não foi feita, entretanto esse isolado apresenta potencial para ser utilizado como estimulador do desenvolvimento vegetal pela sua característica de solubilização de fosfato.

O isolado 185/9 foi classificado pela análise do gene 16S rRNA como uma bactéria pertencente à espécie *Ensifer adhaerens*. Esse gênero bacteriano pertence à família Rhizobiácea, família na qual se encontram vários organismos com capacidade de fixar nitrogênio. Bactérias do gênero *Ensifer* muitas vezes foram classificadas como pertencentes ao gênero *Sinorhizobium*, outro gênero da mesma família, entretanto esses organismos possuem diferenças importantes. Enquanto *Sinorhizobium* são organismos fixadores de nitrogênio em simbiose com leguminosas os classificados como *Ensifer* não apresentam tal característica (CARARETO ALVES et al., 2014). O principal representante do gênero *Ensifer* é a espécie *Ensifer adhaerens*, sendo frequentemente obtida a partir do solo e caracterizada por apresentar atividade predatória a bactérias gram-negativas.

Muitos autores relatam que isolados desse gênero apresentam capacidade de solubilização de fosfato (HALDER et al., 1990; RAU et al., 2009; GLICK, 2010) entretanto, no presente estudo, este gênero não apresentou tal característica. Por outro lado, Nonnoi et al. (2012) estudando isolados da mesma família não observaram relação entre a solubilização de fósforo e tolerância a metais, o que corrobora com os resultados deste trabalho visto que o isolado 185/9 do gênero *Ensifer*, apesar de não apresentar solubilização de fosfato, apresenta simultaneamente, resistência a Cd, Cr e Ni 2,5 mmol L<sup>-1</sup>.

A espécie *Ensifer adhaerens* é capaz de produzir cobalamina, vitamina B12 (THI et al., 2013), capacidade de fixação de N, promoção do crescimento de plantas, remoção de poluentes orgânicos e oxidação de metais pesados (ZHOU et al., 2013; XU et al., 2016). Isolados de *E. adhaerens* apresentam produção de EPS responsável pela solubilidade de poluentes e enzimas de defesa (oxidase e peroxidase), que lhes conferem atuação na biorremediação de poluentes orgânicos, sendo capazes de realizar bio-sorção de bifenilos policlorados (PCBs), compostos orgânicos sintéticos, em águas contaminadas (XU et al., 2016). Foi encontrada também, para esta espécie, capacidade de degradar THIA (Thiamethoxam) um

inseticida neonicotinóide (ZHOU et al., 2013). Entre as moléculas sintetizadas por *Ensifer adhaerens* foram encontradas a produção de alinase, uma enzima com atividade fungicida (YUTANI et al., 2011). Mesmo com capacidade de produzir diversos produtos com aplicação em biotecnologia, não se tem relatos literários quanto à resistência de *Ensifer adhaerens* a metais pesados. Portanto, pouco se sabe sobre a aplicabilidade desta espécie em biorremediação de áreas contaminadas com tais poluentes.

Os isolados 395/10 e 395/18 foram classificados inicialmente como pertencentes ao gênero *Cupriavidus*. Apesar dos dois isolados apresentarem resistência ao Cd a  $5\text{mmol L}^{-1}$ , apresentaram capacidade de solubilizar fosfato. Por outro lado o isolado 395/10 que apresentou sequência gênica com 99 % de identidade com as sequências de *Cupriavidus metallidurans* foi o maior produtor de AIA dentre os organismos estudados.

As bactérias do gênero *Cupriavidus* são encontradas nos solos com elevadas concentrações de metais pesados e em humanos debilitados, são gram-negativas e flageladas com metabolismo oxidativo. Utilizam ácidos aminados como fonte de carbono e nitrogênio, apresentam catalase e oxidase, além de resistência a diversos metais pesados (VANDAMME e COENYE, 2004; UZEL e OZDEMIR, 2009).

*Cupriavidus metallidurans* é encontrada em solos e águas com elevados teores de metais pesados e apresentam múltiplas resistências a metais pesados devido conter genes codificadores de proteínas envolvidas em mecanismos de efluxo de cátions (VON ROZYCKI e NIES, 2009). Bactérias da espécie *Cupriavidus metallidurans* apresentam alta tolerância a metais pesados. O mecanismo que atribui resistência retira substâncias tóxicas do meio para o citoplasma, acumulando-as. Portanto o *C metallidurans* não seria uma bactéria eficiente para processos de biorremediação (SCHENBERG, 2010). Por outro lado, os isolados desse gênero seriam interessantes para trabalhos de manipulação genética, pois forneceriam os genes necessários para a imobilização de íons metálicos (SCHENBERG, 2010).

Entretanto as comparações da sequência do gene 16S rRNA do isolado 395/18 sugerem que essa bactéria seja uma nova espécie dentro desse gênero (90% de identidade). Seria esse isolado uma nova espécie a ser estudada? Futuros e aprofundados estudos moleculares deverão ser feitos para se obter essa resposta.

### 3.4 Conclusões

Os isolados resistentes a cádmio, cromo e níquel possuem capacidade de tolerar e de se desenvolver em elevadas concentrações de metais pesados.

Entre os isolados obtidos, alguns são produtores de hormônio de crescimento vegetal (AIA) e/ou apresentam capacidade de solubilização de fosfato.

A identificação de cinco isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA sugere que pelo menos um desses isolados possa ser uma nova espécie do gênero *Cupriavidus*. Os outros quatro apresentaram grande identidade, 99%, com sequências de espécies reconhecidamente importantes em processos biotecnológicos e de biorremediação.

Tais informações indicam que os isolados bacterianos obtidos apresentam grande potencial para serem usados em processos de recuperação de áreas contaminadas através da técnica de fitorremediação.

### 3.5 Referências

AAFI, NE.; BRHADA, F.; DARY, M.; MALTOUF, A.F.; PAJUELO, E. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC 541. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 14, p. 261–274, 2012.

ABDELALEY, L. M.; KHALIL, W. K. B.; ALI, T. A.; MAHROUS, K. F. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Egyptian soils. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, Surabaya, v.6, n.2, p.201–211, 2011.

ALLOWAY, B.J. Cadmium. In: ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic e Professional, 1995b. cap. 5, p. 122-147.

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**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389 – 3402, 1997.

ANJUM, N. A.; SINGH, H. P.; KHAN, M. I. R.; MASOOD, A.; PER, T. S.; NEGI, A.; BATISH, D. R.; KHAN, N. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. **Environmental Science Pollution Research**, Berlin, v. 22, p. 3361–3382, 2015.

AYANO, H.; MIYAKE, M.; TERASAWA, K.; KURODA, M.; SODA, S.; SAKAGUCHI, T.; IKE, M. Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 117, p. 576-581, 2014.

BACA, B. E.; ELMERICH, C. Microbial production of plant hormones. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht: Springer, 2007, p. 113-143.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 420, de 28 de dezembro de 2009. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

CAI, L.; HUANG, L.; ZHOU, Y.; XU, Z.; PENG, X.; YAO, L.; ZHOU, Y.; PENG, P. Heavy metal concentrations of agricultural soils and vegetables from Dongguan, Guangdong. **Journal of Geographical Sciences**, Beijing, v. 20, p. 121-134, 2010.

CAI, L.; XU, Z.; BAO, P.; HE, M.; DOU, L.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; ZHU, Y. Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and source of arsenic and heavy metals in the agricultural soils in Shunde, Southeast China. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 148, p. 189-195, 2015. doi: 10.1016/j.gexplo.2014.09.010

CARARETO ALVES, L. M.; SOUZA, J. A M.; VARANI, A. M.; LEMOS, E. G. M. The Family Rhizobiaceae In: ROSEMBERG, E. et al. **The prokaryotes**. 4<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer, 2014. p. 419-437.

CASTRO-SILVA, M. A.; LIMA, A. O. S.; GERCHENSKI, A.V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A. L.; DE SOUZA, P. L.; RÖRIG, L. R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, suppl.1, p. 45-47, 2003.

CHEN, T.; LIU, X.M.; ZHU, M.Z.; ZHAO, K.L.; WU, J.J.; XU, J.M.; HUANG, P.M. Identification of trace element sources and associated risk assessment in vegetable soils of the urban–rural transitional area of Hangzhou, China. **Environmental Pollution**, Dordrecht, v. 151, p. 67-78, 2008. doi:10.1016/j.envpol.2007.03.004

CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, New York, v. 33, n. 6, p. 745-755, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W.; LIPUMA, J.; COENYE, T.O.M. Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3427–3436, 2001.

COLAK, F.; OLGUN, A.; ATAR, N.; YAZICIOGLU, D. Heavy metal resistances and biosorptive behaviors of Paenibacillus polymyxa: batch and column studies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Easton, v. 19, p. 863–869, 2013

CONGEEVARAM, S.; DHANARANI, S.; PARK, J.; DEXILIN, M.; THAMARAISELVI, K. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 146, p. 270-277, 2007.

DE MOURA, M.C.S.; LOPES, A.N.C.; MOITA, G.C.; NETO, J.M.M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 429-435, 2006.

DOURADO, M. N.; FRANCO, M. R.; PETERS, L. P.; MARTINS, P. F.; SOUZA, L. A.; PIOTTO, F. A.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes activities of Burkholderia spp.strains—oxidative responses to Ni toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 24, p. 19922-19932, 2015. doi: 10.1007/s11356-015-5204-1

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**, Wellesbourne, v. 163, p.494–507, 2013.

EASTMAN, A. W.; HEINRICHS, D. E.; YUAN, Z. Comparative and genetic analysis of the four sequenced Paenibacillus polymyxa genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. **BMC Genomics**, London, v. 15, n.851, p. -22, 2014.

FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com Herbaspirillum seropedicae. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 826-833, 2011.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 3, p. 36-43, 2005.

GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 367–374, 2010.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Chicago, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

GORDON D.; ABAJIAN, C. GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Seattle, New York, n. 8, p. 195–202, 1998.



GOUZOU, L.; BURTIN, G.; PHILIPPY, R.; BARTOLI, F.; HEULIN, T. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. **Geoderma**, Amsterdam, v. 56, p. 479-491, 1993.

GU, Y. G.; LI, Q. S.; FANG, J. H.; HE, B. Y.; FU, H. B.; TONG, Z. J. Identification of heavy metal sources in the reclaimed farmland soils of the pearl river estuary in China using a multivariate geostatistical approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 105, p. 7-12, 2014.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOBNETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000300013>

GUPTA, A.; KUMAR, M.; GOEL, R. Bioaccumulation properties of nickel, cadmium and chromium-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* NBRI 4014 at alkaline pH. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 99, p. 269-277, 2004.

HALL, T. **BioEdit version 5.0.6**. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001.

HALDER, A.K.; MISHRA, A.K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P.K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 36, p. 81-92, 1990.

HARMANESCU, M.; LIANA, M.A.; DESPINA, M.B.; IOAN, G.; IOSIF, G. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. **Chemistry Central Journal**, London, v. 5, p. 1-10, 2011. doi: [journal.chemistrycentral.com.content.5.1.64](http://journal.chemistrycentral.com/content/5.1.64)

HUANG, E.; YOUSEF, A.E. Draft genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF, which coproduces a lantibiotic, paenibacillin, and polymyxin E1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, p. 4739 - 474, 2012.1. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00846-12>

HUTCHINSON, T.C. E SYMINGTON, M.S. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 58, p. 323-330, 1997.

INUI, R. N.; KISHI, L. T.; PICCHI, S. C.; BARBOSA, J. C.; LEMOS, M. T. O.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G.M. phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences**, Pakistan, v. 7, n. 11, p. 1446-1454., 2012.

KACI, Y. **Les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*): effet sur l'agrégation du sol**. Thèse (Doctorat en

Microbiologie des Sols) - Université des Scences et de la Tecnologia Houari Boumediene, Bab – Ezzouar, 2006.

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**, Islamabad, v. 1, p. 48–58, 2009.

KHAN, K.; LU, Y.; KHAN, H.; ISHTIAQ, M.; KHAN, S.; WAQAS, M.; WEI, L.; WANG, T. Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 58, p.449–458, 2013.

KOVALCHUK, O.; TITOV, V.; HOHN, B.; KOVALCHUK, I. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 568–572, 2001.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 13, n.1, p. 76-87, 2013.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, J.J. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v.17, p.6–15, 2004.

LAL, S.; ROMANO, S.; CHIARINI, L.; SIGNORINI, A.; TABACCHIONI, S. The *Paenibacillus polymyxa* species is abundant among hydrogen-producing facultative anaerobic bacteria in Lake Averno sediment. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 194, p. 345–351, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-011-0763-0>

LEE, B.; FARAG, M. A.; PARK, H. B.; KLOEPPER, J. W.; LEE, S. H.; RYU, C. Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

LEE, S-W.; GLICKMANN, E.; COOKSEY, D. A. Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1437–1444, 2001.

LING,N.; XUE, C.; HUANG, Q.; YANG, X.; XU, Y.; SHEN, Q. Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to Fusarium wilt. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 673–683, 2010.

LOPES, A.; REMÉDIOS, C.; DEUS, C.; BARROS, S. Identificação da Presença de Bactérias Resistentes a Metais em Solos não Contaminados por Poluição Industrial. **Revista CAPTAR**, Aveiro, v. 3, p. 95-103, 2011.

LOPEZ, M. Á.; MAGNITSKI, S. Nickel: the last of the essential micronutrients. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 29, p. 49-56, 2011.

MA, ZHEN.; JACOBSEN, F. E.; GIEDROC, D. P. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. **Chemical Review**, Easton, v. 109, p. 4644–4681, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition in higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic, 1995.

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

MASSESSINI, A.M., COSTA, M.D., REIS, M.R.; SILVA, A.A. atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de Glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, n. 4, p. 815-823, 2008.

MOKADDEN, H.; SADAQUI, Z.; BOUKHELATA, N.; AZOUAOU, N.; KACI, Y. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 172, p. 1150–1155, 2009.

MUHAMMAD, S.; SHAH, M.T.; KHAN, S. Heavy metal concentrations in soil and wild plants growing around Pb–Zn sulfide terrain in the Kohistan region, northern Pakistan. **Microchemical Journal**, New York, v. 99, p. 67-75, 2011. doi:10.1016/j.microc.2011.03.012

NAUTIYAL, C.S. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, New York, v.70, p.265-270, 1999.

NEGI, A.; SINGH, H. P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Ni<sup>2+</sup>-inhibited radicle growth in germinating wheat seeds involves alterations in sugar metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 923–929, 2014.

NONNOI, F.; CHINNASWAMY, A.; TORRE, V. S. G.; PENA, T. C.; LUCAS, M. M.; PUEYO, J. J. Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, New York, v. 61, p. 49-59, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, Mossoró, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PARK, J. H.; BOLANA, N.; MEGHARAJA, M.; NAIDUA, R. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, p. 829–836, 2011.

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

PÉREZ, E.; SULBARAÁN, M.; BALL, M. M.; YARZÁBAL, L. A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2905–2914, 2007.

POLETTI, G.D.; ETHUR, E.M.; HOEHNE, L. Determinação de cádmio e chumbo em solos usados em plantações de erva-mate sem e com diferentes tipos de manejo na região sul do país. **Destques Acadêmicos**, Lajeado, v. 6, p. 59-65, 2014.

PORTO, E. M. V.; ALVES, D. D.; VITOR, C. M. T.; GOMES, V. M.; SILVA, M. F.; DAVID, A. M. S. S. Rendimento forrageiro da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a doses crescentes de fósforo. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 11, n 3, p.25-34, 2012.

RAJKUMAR, M.; SANDHYA, S.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, p. 1562–1574, 2012.

RASKIN, I.; SMITH, R. D.; SALT, D. E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 8, p. 221–226, 1997.

RAU, N.; MISHRA, V.; SHARMA, M.; DAS, M.K.; AHALUWALIA, K.; SHARMA, R.S. Evaluation of functional diversity in rhizobacterial taxa of a wild grass (*Saccharum ravennae*) colonizing abandoned fly ash dumps in Delhi urban ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.41, p. 813–821, 2009.

RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q-R. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 90, p. 419–430, 2008.

RAZA, W.; YANG, X.; WU, H.; WANG, Y.; XU, Y.; SHEN, Q. Isolation and characterisation of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f.sp. *neivium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 471–483, 2009.

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

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

ROSSMAN, T.G. Metal mutagenesis. In: GOYER, R. A.; CHERIAN, G. C. (Ed.). **Toxicology of metals**, New York: Springer, 1995, p 373–430.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SAMANTA, A.; BERA, P.; KHATUN, M.; SINHA, C.; PAL, P.; LALEE, A.; MANDAL, A. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Bellary, v. 2, p. 178-189, 2012.

SCHENBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, p. 7-17, 2010.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, Switzerland v. 2, p. 587, 2013. Disponível em: <<http://www.springerplus.com/content/2/1/587>>. Acesso em: 4 de jun. 2015.

SHEPPARD, M.L.; THIBAUT, D.H. Desorption and extraction of selected heavy metals from soils. **Soil Science Society of America journal**, Madison, v. 56, n.2, p. 415-423, 1992.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 311-319, 2000.

SOTERO-MARTINS, A.; VIANA, M. O.; CARVAJAL, E. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 36-42, 2014.

TAMURA, K.. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, Laurence, v. 9, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Laurence, v.30, p. 2725-2729, 2013.

THI VU, H.; ITOH, H.; ISHII, S.; SENNO, K.; OTSUKA, S. Identification and Phylogenetic Characterization of Cobalamin Biosynthetic Genes of *Ensifer adhaerens*. **Microbes and Environments**, Tagajõ, v. 28, n. 1, p. 153–155, 2013.

ULLAH, A.; HENG, S.; MUNIS, M. F. H.; FAHAD, S.; YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 117, p. 28–40, 2015.

USEPA- United States Environmental Protection Agency. **3050B**. Revision 2. 1996. Disponível em:

<<http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

UZEL, A.; OZDEMIR, G. Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 542–548, 2009.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2285–2289, 2004.

VON ROZYCKI, T.; NIES, D. H. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metalresistant bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.96, p.115-39, 2009.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697–703, 1991.

XU, L.; CHEN, X.; LI, H.; HU, F.; LIANG, M. Characterization of the biosorption and biodegradation properties of *Ensifer adhaerens*: A potential agent to remove polychlorinated biphenyls from contaminated water. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 302, p. 314–322, 2016.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLOCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B.; EUZEBY, J.; AMANN, R.; MÓRA, R. R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 12, p. 635- 645,2014.

YUTANI, M.; TANIGUCHI, H.; BORJIHAN, H.; OGITA, A.; FUJITA, K.; TANAKA, T. Alliinase from *Ensifer adhaerens* and Its Use for Generation of Fungicidal Activity. **AMB Express**, Heidelberg, v. 1, n.2, p. 1-8, 2011.

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

ZHOU, G.; WANG, Y.; ZHAI, S.; GE, F.; LIU, Z.; DAI, Y.; YUAN, S.; HOU, J. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Boston, v. 97, p.4065–4074, 2013.

#### 4 Considerações Finais

1) A área estudada apresentou teores elevados de cádmio provavelmente oriundos do material de origem do solo. As maiores concentrações deste metal ocorreram em áreas sob atividades agrícolas, indicando a acumulação do mesmo.

2) A área experimental apresentou contaminação do solo por cádmio e cromo em grande parte da área experimental e contaminações pontuais por níquel. O cromo foi o elemento que apresentou os maiores teores médios na área total e se encontrou acumulado tanto na área sob aplicação de lodo de esgoto quanto em área sob aplicação de fertilizantes minerais.

3) A análise de componentes principais indicou que tanto a fertilização mineral quanto a aplicação de lodo de esgoto contribuíram no acúmulo de níquel e cromo no solo, o que foi especificamente observado nos pontos: PC 235, PC 280 e PL 403A.

4) Os sistemas de plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos; plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais e plantio convencional com aplicação de lodo de esgoto, não diferiram em relação à retenção dos metais no solo.

5) Os isolados resistentes ao cádmio, cromo e níquel apresentaram capacidade de se desenvolver em elevadas concentrações destes metais, sendo alguns, destes isolados, produtores de hormônio de crescimento vegetal (AIA) e/ou capazes de solubilizar fosfato.

6) A identificação de cinco isolados pelo sequenciamento do gene 16SrRNA sugeriu que pelo menos um desses isolados possa ser uma nova espécie do gênero *Cupriavidus*, enquanto que os outros quatro apresentaram grande identidade, 99 %, com sequências de espécies reconhecidamente importantes em processos biotecnológicos e de biorremediação.

7) Os isolados bacterianos obtidos apresentam grande potencial para serem usados em processos de recuperação de áreas contaminadas através da técnica de fitorremediação. Para futuros estudos, a aplicação destes micro-organismos em processos de fitorremediação e o sequenciamento total da possível nova espécie do gênero *Cupriavidus* se faz necessário.

**ANEXO**

Valores de pH CaCl<sub>2</sub> e concentração de MO, Ni, Cd e Cr em solos sob plantio convencional com aplicação de fertilizantes minerais, solos sob plantio direto com aplicação de fertilizantes minerais e solo sob plantio convencional com aplicação de lodo de esgoto.

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 1	21	6,5	14,48	1,08	78,00
PC 2	19	5,3	17,01	0,71	68,12
PC 3	20	5,9	12,11	0,89	54,29
PC 4	21	5,8	18,26	0,58	56,23
PC 5	22	5,1	10,08	0,73	45,77
PC 6	22	5,7	11,43	1,14	45,22
PC 7	22	5,7	12,36	1,13	48,42
PC 8	22	5,1	15,37	1,05	66,97
PC 9	22	6,0	11,22	0,86	57,31
PC 10	24	5,4	10,46	0,40	51,70
PC 11	19	5,5	13,63	0,65	71,12
PC 12	18	5,7	9,73	0,82	59,79
PC 13	22	5,6	14,50	0,23	51,14
PC 14	23	5,3	19,89	0,57	58,67
PC 15	22	5,2	12,74	1,00	46,74
PC 16	22	5,4	13,88	0,71	62,30
PC 17	24	5,1	11,15	0,88	53,32
PC 18	23	5,3	10,43	0,87	57,46
PC 19	21	4,6	11,03	0,59	54,88
PC 20	19	5,3	11,32	0,72	55,34
PC 21	19	5,7	11,18	0,77	65,84
PC 22	19	5,2	11,82	0,68	53,95
PC 23	28	5,2	12,12	1,10	40,31
PC 24	25	5,1	23,99	0,47	51,35
PC 25	26	5,9	11,18	0,75	42,78
PC 26	26	5,4	12,12	1,17	52,34
PC 27	25	5,2	13,91	0,38	62,44
PC 28	23	4,9	11,72	0,73	47,73
PC 29	20	5,2	13,74	0,17	60,01
PC 30	20	5,8	11,94	0,57	57,14



Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 31	22	5,5	13,76	0,76	68,49
PC 32	21	5,3	12,10	0,44	64,30
PC 33	21	6,0	11,01	0,66	50,77
PC 34	18	5,9	10,87	0,50	52,06
PC 35	16	5,7	11,02	0,73	55,75
PC 36	23	5,7	12,14	0,89	39,35
PC 37	25	5,6	15,12	0,87	56,18
PC 38	25	6,1	10,09	0,88	39,59
PC 39	23	5,2	13,47	1,47	50,32
PC 40	26	5,2	11,66	0,78	46,56
PC 41	26	5,6	13,22	1,22	58,63
PC 42	21	5,0	14,70	1,10	47,47
PC 43	23	5,8	15,03	0,38	63,77
PC 44	22	5,9	12,62	0,69	50,83
PC 45	22	5,6	12,28	1,04	55,02
PC 46	17	5,9	11,21	0,94	52,82
PC 47	22	6,0	11,65	0,90	50,91
PC 48	18	5,7	12,55	1,01	60,79
PC 49	22	5,6	10,93	0,67	48,62
PC 50	18	5,5	12,73	0,08	61,21
PC 51	18	7,3	17,00	1,17	74,20
PC 52	21	5,5	9,93	0,83	65,54
PC 53	26	5,8	8,97	1,07	50,88
PC 54	26	5,9	9,47	0,96	51,54
PC 55	23	5,4	13,91	0,94	49,37
PC 56	24	5,2	11,47	1,16	64,05
PC 57	21	5,3	11,26	1,10	73,65
PC 58	20	4,9	10,87	0,91	59,46
PC 59	24	5,4	18,33	0,38	62,58
PC 60	22	5,6	19,90	0,40	66,49
PC 61	23	5,5	15,29	0,98	66,99
PC 62	22	6,0	17,63	0,97	70,57
PC 63	21	5,4	15,13	0,27	74,10
PC 64	21	5,8	13,63	0,51	60,71
PC 65	23	6,2	12,88	0,99	86,38
PC 66	19	5,4	11,42	0,95	79,47

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 67	21	5,2	14,13	0,88	76,07
PC 68	22	4,80	13,52	0,93	82,87
PC 69	21	5,6	13,64	0,94	80,58
PC 70	20	5,2	11,74	0,76	73,64
PC 71	18	5,8	15,93	0,65	72,65
PC 72	24	7,1	10,79	1,12	53,67
PC 73	25	4,9	10,23	1,02	51,37
PC 74	25	5,3	12,32	1,24	43,62
PC 75	27	5,4	12,25	1,56	51,42
PC 76	25	5,6	14,84	0,43	57,67
PC 77	21	5,9	11,33	1,03	66,90
PC 78	20	5,7	11,34	0,74	48,27
PC 79	20	5,3	14,15	1,06	75,64
PC 80	23	5,8	18,47	0,97	73,26
PC 81	18	5,0	15,89	0,94	69,62
PC 82	24	5,5	15,77	1,22	68,34
PC 83	25	4,9	13,26	0,62	69,64
PC 84	25	5,2	11,92	0,85	62,08
PC 85	26	5,0	13,37	0,90	60,52
PC 86	21	5,4	13,06	0,41	56,09
PC 87	21	5,1	15,57	0,65	67,30
PC 88	21	5,3	16,11	1,04	69,14
PC 89	23	5,8	17,90	0,16	59,75
PC 90	19	6,3	13,18	0,85	63,02
PC 91	24	5,1	19,87	0,97	78,78
PC 92	21	6,5	18,35	1,02	78,04
PC 93	23	6,2	16,02	0,47	73,85
PC 94	24	5,7	11,29	0,91	43,07
PC 95	25	5,5	13,43	1,00	41,12
PC 96	25	5,6	12,13	0,98	43,39
PC 97	24	5,5	11,66	0,44	39,19
PC 98	27	5,8	12,14	0,50	39,75
PC 99	27	5,3	13,09	1,22	49,38
PC 100	27	6,3	13,86	0,25	48,62
PC 101	25	5,4	14,82	1,25	53,58
PC 102	26	5,6	12,63	0,42	46,93

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 103	22	5,4	13,15	0,87	55,59
PC 104	22	5,2	13,08	0,94	59,93
PC 105	25	5,2	12,74	0,92	61,51
PC 106	23	5,6	13,70	0,73	59,31
PC 107	27	5,0	16,04	0,32	67,32
PC 108	24	5,8	14,17	0,78	65,24
PC 109	24	5,1	15,98	0,70	64,38
PC 110	23	5,0	16,33	0,85	74,20
PC 111	23	5,2	18,84	1,11	77,13
PC 112	25	4,6	16,43	1,08	64,13
PC 113	24	5,4	19,22	1,10	77,71
PC 114	23	5,4	22,38	1,26	81,50
PC 115	22	5,4	17,97	1,11	72,95
PC 116	24	6,1	13,52	0,80	73,55
PC 117	23	5,9	16,12	1,21	50,67
PC 118	24	5,1	14,21	1,24	45,37
PC 119	22	4,9	18,98	1,39	53,87
PC 120	22	5,1	15,21	1,32	52,05
PC 121	25	5,4	14,28	1,14	52,18
PC 122	27	5,6	13,14	1,12	54,28
PC 123	28	5,6	12,06	0,83	57,80
PC 124	28	5,9	16,85	1,31	67,26
PC 125	26	6,1	14,95	1,25	59,27
PC 126	25	5,4	17,54	1,25	68,74
PC 127	26	5,8	19,69	1,34	79,35
PC 128	20	5,2	17,49	1,33	75,43
PC 129	23	5,2	15,08	1,10	61,58
PC 130	25	6,1	19,09	0,40	72,43
PC 131	24	4,6	14,80	0,89	68,36
PC 132	24	5,5	18,16	0,61	70,46
PC 133	24	5,3	17,63	1,13	75,56
PC 134	27	6,3	17,73	1,13	67,82
PC 135	23	5,0	20,93	1,26	79,72
PC 136	23	5,4	22,54	1,28	80,63
PC 137	23	5,6	21,52	1,28	90,53
PC 138	24	5,8	21,98	0,80	82,06

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 139	25	6,2	22,26	1,21	79,97
PC 140	23	5,6	13,68	0,36	45,25
PC 141	23	5,5	12,96	1,27	35,54
PC 142	24	5,4	15,32	1,37	39,53
PC 143	26	5,1	13,35	1,23	41,80
PC 144	23	5,8	13,30	1,48	39,02
PC 145	25	5,7	13,09	1,38	42,27
PC 146	23	6,0	14,32	1,03	49,89
PC 147	24	5,5	11,15	1,40	41,38
PC 148	25	5,6	13,54	1,32	49,51
PC 149	24	5,3	13,77	1,37	46,77
PC 150	25	5,5	14,87	1,40	53,09
PC 151	26	5,1	14,99	1,41	53,78
PC 152	27	5,6	14,23	1,25	60,08
PC 153	24	5,8	12,91	1,27	51,72
PC 154	23	5,7	14,74	1,31	54,20
PC 155	23	5,4	15,81	1,31	54,37
PC 156	24	5,5	15,76	1,31	58,36
PC 157	23	5,6	16,08	1,35	56,53
PC 158	23	5,4	17,74	1,39	55,71
PC 159	21	4,6	15,80	1,43	55,20
PC 160	21	5,1	20,87	0,49	81,86
PC 161	26	5,0	17,39	1,46	63,25
PC 162	25	5,9	18,93	1,46	67,04
PC 163	18	5,9	12,79	0,00	70,22
PC 165	24	5,1	13,79	1,38	36,88
PC 166	23	4,6	20,38	1,35	38,41
PC 167	27	5,5	15,45	1,32	41,69
PC 168	27	5,4	14,20	1,32	41,30
PC 169	24	5,4	14,13	1,38	39,57
PC 170	24	5,0	14,22	1,39	48,48
PC 171	26	4,8	14,93	1,47	46,48
PC 172	25	4,8	13,20	1,33	44,10
PC 173	23	4,7	12,83	1,34	47,59
PC 174	26	6,2	15,26	1,45	53,43
PC 175	25	6,8	16,48	1,35	53,12

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 176	26	6,0	14,18	1,32	49,19
PC 177	25	5,9	20,15	0,93	78,43
PC 178	26	6,5	20,75	0,69	72,32
PC 179	25	5,9	15,60	1,21	51,97
PC 180	27	5,0	16,86	1,43	54,29
PC 181	28	5,3	17,35	1,43	60,00
PC 182	28	5,5	17,14	1,37	57,94
PC 183	23	6,3	18,21	1,38	56,92
PC 184	21	5,7	22,77	0,99	83,38
PC 185	26	5,3	17,21	1,45	62,39
PC 186	23	5,6	18,29	1,48	61,11
PC 187	21	5,7	25,15	0,79	93,54
PC 189	22	5,7	14,34	1,43	38,14
PC 190	26	5,3	16,99	0,61	51,02
PC 191	24	5,9	20,10	0,72	58,37
PC 192	26	5,0	16,14	2,40	51,81
PC 193	23	5,0	13,71	0,78	58,66
PC 194	26	5,7	14,05	0,83	50,86
PC 195	27	5,8	12,96	1,16	57,84
PC 196	25	4,8	12,30	0,83	60,50
PC 197	25	5,3	15,04	1,07	66,91
PC 198	25	5,2	14,34	0,90	66,98
PC 199	26	6,1	13,34	0,93	64,40
PC 200	26	5,2	17,08	1,01	73,61
PC 201	28	5,9	14,89	1,17	77,60
PC 202	23	5,5	15,42	0,91	70,10
PC 203	27	5,8	15,24	0,82	75,61
PC 204	29	5,4	16,66	1,04	75,10
PC 205	29	5,6	15,89	0,79	72,30
PC 206	29	5,4	16,36	0,86	68,55
PC 207	26	6,1	18,03	1,16	81,00
PC 208	25	5,4	16,75	0,97	70,95
PC 209	26	5,6	13,92	0,96	73,70
PC 210	23	5,6	17,75	1,09	79,68
PC 211	23	5,7	19,01	0,90	77,02
PC 212	23	5,1	16,74	0,91	70,58

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 214	24	6,2	12,29	0,69	54,15
PC 215	24	5,8	14,63	1,09	57,89
PC 216	22	5,5	15,20	0,86	52,29
PC 217	24	4,8	16,82	1,24	69,20
PC 218	23	4,2	15,81	0,88	52,80
PC 219	22	5,1	12,73	1,03	70,66
PC 220	19	4,9	13,63	0,84	53,64
PC 221	23	5,0	15,34	0,85	58,92
PC 222	23	5,2	15,49	0,86	64,00
PC 223	22	5,8	13,42	0,93	61,36
PC 224	24	6,3	15,19	1,04	69,33
PC 225	25	6,1	16,20	1,10	63,99
PC 226	26	5,7	15,96	1,12	77,34
PC 227	26	5,5	16,94	1,07	76,80
PC 228	27	5,5	18,48	1,11	74,14
PC 229	27	5,8	21,36	1,05	82,40
PC 230	26	5,4	17,39	0,93	73,55
PC 231	28	5,3	21,11	0,94	77,37
PC 232	24	4,7	15,85	0,89	66,25
PC 233	24	4,9	20,22	1,04	77,03
PC 234	28	4,8	21,83	1,02	77,11
PC 235	25	5,4	41,09	0,62	81,22
PC 236	18	5,7	19,01	0,93	82,57
PC 237	21	5,4	21,44	1,02	78,58
PC 238	26	4,9	20,95	1,04	77,13
PC 240	22	5,8	12,67	1,00	56,20
PC 241	25	5,4	16,55	0,93	56,21
PC 242	23	6,2	16,00	1,26	67,76
PC 243	26	6,4	14,08	1,06	60,24
PC 244	26	6,6	16,80	0,95	56,01
PC 245	24	6,5	18,04	1,02	64,22
PC 246	24	5,8	15,88	0,94	60,15
PC 247	21	6,0	22,31	0,61	70,00
PC 248	23	6,6	22,84	0,62	73,01
PC 249	25	6,3	19,78	0,92	68,89
PC 250	25	5,9	15,83	1,12	77,81

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 251	24	5,5	23,12	0,87	76,63
PC 252	26	5,3	16,94	1,02	69,18
PC 253	26	5,7	16,15	0,81	63,65
PC 254	24	5,9	19,69	0,98	73,12
PC 255	30	5,7	17,80	0,95	68,41
PC 256	26	6,1	22,08	0,92	69,17
PC 257	25	5,2	18,20	1,11	68,91
PC 258	27	5,4	21,61	1,25	70,61
PC 259	29	5,4	21,76	0,99	67,86
PC 260	27	5,3	22,23	1,23	71,65
PC 261	24	4,5	23,99	1,19	74,38
PC 262	24	5,0	23,69	1,23	74,52
PC 263	29	5,6	22,63	1,14	76,37
PC 264	18	6,7	21,01	1,29	74,66
PC 265	23	5,2	16,84	1,06	52,05
PC 266	23	5,3	22,47	0,55	58,20
PC 267	23	6,0	15,06	0,93	51,23
PC 268	23	6,0	15,86	0,81	52,47
PC 269	25	5,7	15,49	0,87	48,67
PC 270	21	5,6	16,50	1,05	57,32
PC 271	23	5,5	19,10	1,21	62,28
PC 272	21	6,4	17,33	1,14	63,20
PC 273	20	6,7	17,32	0,93	57,65
PC 274	22	6,5	18,19	1,27	72,39
PC 275	24	6,3	16,71	0,84	62,89
PC 276	24	6,6	18,21	0,89	71,51
PC 277	18	6,2	18,97	1,14	74,25
PC 278	24	5,1	26,11	0,48	75,46
PC 279	25	7,0	16,92	0,80	64,39
PC 280	23	5,6	29,14	1,43	97,03
PC 281	31	6,1	21,80	1,19	69,60
PC 282	22	5,3	22,77	1,28	78,12
PC 283	24	5,4	24,95	1,23	82,00
PC 284	24	5,7	24,76	1,30	64,29
PC 285	25	5,6	24,13	1,28	70,71
PC 286	23	5,0	25,48	1,38	70,37

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 287	23	4,4	27,44	1,43	81,30
PC 288	23	5,1	21,32	1,11	74,19
PC 289	25	5,0	23,41	1,16	78,21
PC 292	23	5,4	17,11	1,06	60,26
PC 293	16	5,9	18,25	1,20	53,88
PC 294	22	5,3	19,52	1,24	60,82
PC 295	22	5,9	20,39	1,18	58,32
PC 296	26	5,9	20,03	1,15	61,78
PC 297	25	5,7	18,98	1,04	67,66
PC 298	22	6,4	20,31	0,89	64,87
PC 299	22	6,1	25,56	1,01	71,65
PC 300	21	6,5	20,85	1,24	61,42
PC 301	21	6,7	19,76	1,04	74,61
PC 302	22	6,3	24,20	1,10	79,40
PC 303	21	6,6	19,27	1,22	73,14
PC 304	23	6,2	17,67	1,04	71,26
PC 305	21	5,7	20,11	1,08	79,09
PC 306	25	5,3	19,25	1,10	65,64
PC 307	21	5,5	22,81	1,18	67,71
PC 308	23	5,9	23,68	1,17	73,69
PC 309	23	5,1	21,16	1,19	78,99
PC 310	16	6,3	23,46	1,27	76,42
PC 311	22	4,7	20,31	1,17	63,03
PC 312	21	5,1	23,42	1,23	69,16
PC 313	23	4,8	24,45	0,83	60,31
PC 314	25	4,8	22,80	1,01	67,58
PC 315	23	4,5	22,22	0,78	62,99
PC 316	29	5,1	24,37	1,21	65,14
PC 317	22	5,7	21,59	0,94	65,66
PC 318	22	5,6	23,36	1,03	62,47
PD 319	23	5,4	17,73	0,60	54,99
PC 320	24	5,7	21,88	0,92	65,89
PC 321	23	5,2	16,51	0,76	58,82
PC 322	21	5,6	19,38	0,91	63,05
PC 323	25	5,9	18,97	1,04	66,42
PC 324	23	5,4	17,43	1,07	62,49



Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 325	18	6,6	20,70	0,61	66,46
PC 326	18	6,6	18,17	1,03	56,97
PC 327	17	6,4	20,05	0,77	61,76
PC 328	19	6,1	19,86	1,06	61,06
PC 329	22	6,1	25,77	1,05	87,99
PC 330	21	6,3	20,10	1,05	68,18
PC 331	23	6,7	23,66	1,24	86,49
PC 332	22	5,4	19,00	0,83	68,47
PC 333	22	5,6	19,59	0,82	68,99
PC 334	23	5,1	21,15	0,64	67,20
PC 335	22	5,8	19,06	0,82	61,77
PC 336	22	5,4	25,19	0,92	70,84
PC 337	28	4,7	19,31	1,17	77,71
PC 338	24	4,4	22,27	1,12	68,69
PC 339	22	4,7	23,21	1,37	82,40
PC 340	25	5,6	24,24	1,29	74,55
PC 341	25	4,6	23,31	1,27	81,75
PC 342	24	4,7	24,10	1,36	82,61
PC 343	27	5,3	21,26	1,34	77,18
PC 344	27	5,9	22,16	1,36	80,10
PD 347	18	5,2	17,97	1,18	71,47
PD 348	19	5,2	21,92	1,21	69,56
PD 349	22	5,6	18,40	1,00	64,95
PD 350	22	5,7	17,47	0,95	62,21
PD 351	20	5,0	23,47	1,36	71,95
PC 352	24	5,1	18,82	1,26	72,66
PC 353	19	6,1	22,00	1,28	86,02
PC 354	21	6,3	21,88	1,22	83,87
PC 355	22	6,2	21,15	1,09	61,18
PC 356	18	6,1	21,26	1,08	64,81
PC 357	24	5,8	23,85	1,28	94,29
PC 358	22	5,6	21,54	0,66	75,13
PC 359	21	6,1	18,54	0,62	64,52
PC 360	19	5,3	19,06	1,29	84,18
PC 361	21	5,1	19,21	1,16	92,66
PC 362	20	4,2	22,82	1,20	95,35

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PC 363	23	5,4	19,83	1,17	81,76
PC 364	22	5,7	19,26	1,20	79,98
PC 365	24	5,2	18,45	1,29	74,23
PC 366	23	5,0	25,60	0,79	65,99
PC 367	24	5,1	26,02	1,46	90,16
PC 368	28	5,1	31,15	1,24	70,55
PC 369	27	4,6	21,58	1,22	80,55
PC 370	28	5,5	21,99	1,33	73,63
PC 371	27	5,6	22,98	1,23	77,72
PC 372	19	5,9	18,63	0,81	62,18
PD 375	22	6,1	23,01	1,31	86,73
PD 376	22	5,0	23,68	1,35	66,42
PD 377	24	5,6	19,70	1,03	64,04
PD 378	21	4,7	19,69	1,19	74,47
PD 379	21	5,3	25,05	1,36	70,19
PC 380	21	6,0	26,15	1,11	64,36
PC 381	18	6,1	25,51	1,21	68,64
PC 382	20	6,4	29,21	1,50	69,42
PC 383	20	6,2	28,39	1,56	75,27
PC 384	22	6,1	28,92	1,57	77,30
PC 385	20	6,0	25,81	1,28	70,86
PC 386	22	5,7	21,69	1,12	68,74
PC 387	21	5,9	22,05	1,24	79,04
PC 388	20	5,3	25,45	1,11	72,17
PC 389	18	4,8	19,64	0,88	63,60
PC 390	20	5,1	18,87	0,85	59,61
PC 391	21	5,2	26,86	1,45	74,90
PC 392	20	5,7	27,19	1,12	70,81
PC 393	22	5,3	20,75	0,77	65,38
PC 394	22	5,5	23,49	1,46	66,39
PC 395	29	4,4	20,83	1,20	56,65
PC 396	26	5,5	27,62	1,26	65,87
PC 397	24	5,4	24,09	0,83	65,71
PC 398	23	5,3	21,64	1,12	56,38
PC 399	23	5,8	21,61	1,23	58,46
PC 400	24	5,9	20,07	1,10	50,10

Amostras	MO mg dm <sup>-3</sup>	pH CaCl <sub>2</sub> g dm <sup>-3</sup>	Ni mg kg <sup>-1</sup>	Cd mg kg <sup>-1</sup>	Cr mg kg <sup>-1</sup>
PL 401	28	5,1	24,58	1,44	69,14
PL 401A	25	5,4	24,43	1,09	63,87
PL 402	26	5,4	23,94	1,21	56,78
PL 402A	26	5,8	27,25	1,49	77,27
PC 403	23	5,2	16,15	0,92	53,10
PL 403A	33	4,9	31,04	1,53	86,53
PD 404	23	5,3	24,49	1,45	66,76
PL 404A	18	5,4	25,75	0,95	64,71
PL 405	24	5,6	24,49	1,46	71,38
PL 405A	21	5,8	26,20	1,40	70,84
PC 406	19	5,3	19,01	0,99	49,76
PC 407	22	6,2	19,28	0,97	49,71
PC 408	21	6,4	19,11	0,95	59,57
PC 409	22	6,3	20,16	1,15	63,80
PC 410	21	5,8	18,01	0,83	65,08
PC 411	23	6,1	25,63	1,22	72,04
PC 412	24	5,9	18,44	0,78	64,93
PC 413	24	5,8	19,21	1,02	62,30
PC 414	19	5,7	16,18	0,79	74,74
PC 415	23	5,5	18,92	0,95	64,14
PC 416	22	5,4	22,63	1,36	78,21
PC 417	22	5,2	26,60	1,42	75,98
PC 418	32	5,7	16,54	0,46	57,49
MI 500	23	5,5	15,70	1,37	78,12
MN 501	20	5,1	16,99	1,38	57,43
MN 428	43	6,3	13,08	0,98	49,31
MN 423	33	4,4	16,59	1,02	66,25
MN 420	52	6,2	13,04	0,98	47,58
MN 421	37	6,5	11,64	0,88	46,45
MN 427	42	6,3	14,38	0,90	6,17
MN 424	47	5,1	15,92	0,97	71,39
MN 422	36	6,5	11,97	0,74	52,07
MN 425	43	6,3	13,94	0,88	58,42