

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REMEDIÇÃO DE LATOSSOLO VERMELHO eutroférico
CONTAMINADO COM MERCÚRIO**

**Letícia Fernanda Lavezzo
Zootecnista**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REMEDIÇÃO DE LATOSSOLO VERMELHO eutroférico
CONTAMINADO COM MERCÚRIO**

Letícia Fernanda Lavezzo

Orientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Coorientadora: Profa. Dra. Anne Hélène Fostier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Ciência do Solo).

L399r Lavezzo, Leticia Fernanda
Remediação de latossolo vermelho eutroférico
contaminado com mercúrio / Leticia Fernanda Lavezzo. --
Jaboticabal, 2019
85 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal

Orientador: Wanderley José de Melo
Coorientador: Everlon Cid Rigobelo

1. Biorremediação. 2. Mercury. 3. Elementos traços no
solo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).


Essa ficha não pode ser modificada.

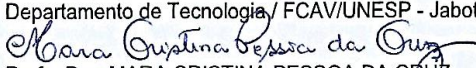
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

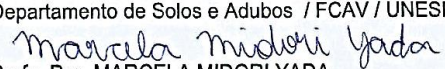
TÍTULO DA TESE: REMEDIAÇÃO DE LATOSSOLO VERMELHO eutroférico CONTAMINADO COM MERCÚRIO

AUTORA: LETÍCIA FERNANDA LAVEZZO
ORIENTADOR: WANDERLEY JOSÉ DE MELO
COORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO
COORIENTADORA: ANNE HÉLÈNE FOSTIER

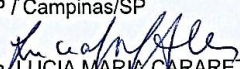
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (CIÊNCIA DO SOLO), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. WANDERLEY JOSÉ DE MELO
Departamento de Tecnologia / FCAV/UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. MARA CRISTINA PESSOA DA CRUZ
Departamento de Solos e Adubos / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. MARCELA MIDORI YADA
Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior-ITES / Taquaritinga/SP


Pesquisador Dr. RODRIGO MORETTO GALAZZI
UNICAMP / Campinas/SP


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de outubro de 2019

DADOS CURRÍCULARES DA AUTORA

Letícia Fernanda Lavezzo nascida em 21 de outubro de 1986 na cidade de Votuporanga, São Paulo. Em 2012, graduou-se em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Jaboticabal, São Paulo. Em junho de 2013, iniciou especialização em saneamento e meio ambiente no Centro Universitário de Votuporanga, com término em 2016. Em agosto de 2014, ingressou no mestrado com bolsa da CAPES, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) na Unesp de Jaboticabal, sob orientação do Professor Doutor Wanderley José de Melo com término em fevereiro de 2016. Em março do mesmo ano, iniciou doutorado, com bolsa da CAPES, também pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) na Unesp de Jaboticabal, sob orientação do Professor Doutor Wanderley José de Melo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e saúde, pelas oportunidades de aprendizado, crescimento e por sempre ter sido meu suporte nos momentos difíceis.

Aos meus pais Odelbe Lavezzo e Any Lavezzo, a minha irmã Lígia Lavezzo, por serem minha fortaleza, por me darem diariamente exemplo de força e determinação, pelo apoio e amor incondicional.

À família Brigagão Paulo, Alda e Luís por estarem presentes nessa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wanderley José de Melo, por mais um trabalho concedido, pela paciência ao longo dessa jornada, pelos ensinamentos, conhecimentos e dedicação pela pesquisa. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo por todo apoio e conhecimentos compartilhados que contribuíram para a conclusão da pesquisa. À minha coorientadora Profa. Dra. Anne Hélène Fostier pelo apoio, educação, pelos ensinamentos enriquecedores e possibilidade de reflexão, além de ter me recebido extremamente bem em seu laboratório na Unicamp.

A todos colegas da Unicamp por toda gentileza no laboratório, pelo apoio, atenção e pelos cafés. Ao técnico Humberto por toda paciência, profissionalismo, por ser sempre solícito e pelos ensinamentos. Muito obrigada, vocês são demais.

A querida Joana Schossler, que compartilhou comigo sua tranquilidade, educação e gentileza, muitos jantares gostosos, taças de vinho, cafés e conversas que fizeram da minha estadia em Barão Geraldo muito mais agradável.

Aos meus queridos amigos, Danilo, Roberta e Denise, que mais uma vez compartilharam tempo, atenção, apoio e amizade. A Denise, não só pela amizade, mas por toda paciência, possibilidade de reflexão e discussão, e ajuda na elaboração do trabalho. Muito obrigada por ter vocês na minha vida.

A minha amiga Camila Chioda, por toda dedicação, parceria e ensinamentos compartilhados. A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Sentimos mais prazer, às vezes, em superar um desafio, do que desfrutar algo que se nos é oferecido gratuitamente”

Caio Fernando Abreu

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Metais potencialmente tóxicos.....	4
2.2. Mercúrio.....	4
2.3. Risco à saúde humana por contaminação com mercúrio.....	8
2.4. Mercúrio no Brasil.....	9
2.5. Remediação de áreas contaminadas.....	10
2.6. Remediação com uso de plantas	11
2.7. Remediação com uso de microrganismos.....	14
2.8. Vantagens e desvantagens da remediação com uso de plantas e microrganismos.....	17
2.9. Hipótese e objetivos.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 - Uso de <i>Hibiscus cannabinus</i> L. para remediar Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com concentrações de mercúrio.....	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Preparo do solo.....	36
2.2. Delineamento experimental.....	37
2.3. Transplante e manejo do <i>Hibiscus cannabinus</i>	37

2.4. Coleta de raízes, parte aérea das plantas de <i>Hibiscus cannabinus</i> e solo no final do experimento.....	38
2.5. Quantificação de mercúrio total nas amostras de solo e planta.....	39
2.6. Validação do método analítico.....	40
2.7. Análise dos resultados.....	40
3.RESULTADOS.....	41
3.1. Influência das condições de cultivo no pH do solo e nas variáveis de crescimento do <i>Hibiscus cannabinus</i>	41
3.2. Concentrações de mercúrio total no solo e mercúrio total acumulado na fitomassa seca da raiz e parte aérea do <i>Hibiscus cannabinus</i>	44
4.DISSCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 3 - Associação de microrganismos e planta de milho para remediar Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com mercúrio.....	58
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1.INRODUÇÃO.....	60
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1.Isolamento das bactérias utilizadas e análises microbiológicas....	61
2.2. Delineamento experimental.....	63
2.3. Preparo do solo.....	63
2.4. Plantio e manejo do milho.....	64
2.5. Preparo e aplicação dos microrganismos no solo contaminado com mercúrio.....	64
2.6. Coleta de raízes, parte aérea de plantas de milho e do solo ao final do experimento.....	65
2.7. Quantificação de mercúrio total nas amostras de solo e planta.....	65
2.8. Validação do método analítico.....	68
2.9. Análise dos resultados.....	67

3.RESULTADOS.....	68
3.1. Identificação das bactérias.....	68
3.2. Influência das condições de cultivo no pH do solo.....	68
3.3. Influência das condições de cultivo nas variáveis de crescimento do milho.....	69
3.4. Concentrações de mercúrio total nos compartimentos solo, raiz e parte aérea do milho.....	71
4.DISSCUSSÃO.....	75
5.CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHI** – Brain Heart Infusion Broth
- BPCP** – Bactéria promotora de crescimento de plantas
- CH₃Hg⁺** – Metilmercúrio
- (CH₃)₂Hg** – Dimetilmercúrio
- CMI** – Concentração Mínima Inibitória
- CTC** – Capacidade de troca catiônica
- CV** – Coeficiente de variação
- DMA** – Direct Mercury Analyzer®
- Hg** – Mercúrio
- Hg⁰** – Mercúrio elementar
- Hg²⁺** – Mercurico
- HgCl₂** – Cloreto de mercúrio
- HgS** – Sulfeto de mercúrio
- LVEf** – Latossolo Vermelho eutroférico
- MOS** – Matéria orgânica do solo
- PA** – Parte aérea
- PCA** – Ágar padrão
- PCR** – Reação da Polimerase em Cadeia

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Ciclo do mercúrio no ambiente.....	7
Figura 1.2 Processo de fitorremediação de mercúrio no solo.....	13
Figura 2.1 <i>Hibiscus cannabinus</i> mantido em Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com diferentes doses de Hg ²⁺	38
Figura 2.2 Curvas analíticas de calibração.....	39
Figura 2.3 Raízes de <i>Hibiscus cannabinus</i> mantidas em Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com diferentes doses de mercúrio Hg ²⁺	43
Figura 3.1 Curvas analíticas de calibração.....	66
Figura 3.2 Raízes de milho mantidas em Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com alta concentração de mercúrio Hg ²⁺ ...	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 Fertilização mineral em todos os tratamentos.....	37
Tabela 2.2 Valores de pH em CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ do solo do experimento do cultivo de <i>Hibiscus cannabinus</i> em diferentes doses de mercúrio.....	41
Tabela 2.3 Altura das plantas de <i>Hibiscus cannabinus</i> no início e final do experimento.....	42
Tabela 2.4 Média da fitomassa seca das plantas de <i>Hibiscus cannabinus</i> final do experimento.....	43
Tabela 2.5 Média das concentrações de mercúrio total no Latossolo Vermelho eutroférico esperada no início do plantio e a encontrada.....	44
Tabela 2.6 Concentração de Hg total no Latossolo Vermelho eutroférico no final do experimento e acúmulo de Hg na fitomassa seca de raiz e parte aérea.....	45
Tabela 2.7 Correlação das variáveis das plantas de <i>Hibiscus cannabinus</i>	46
Tabela 3.1 Fertilização mineral em todos os tratamentos.....	
Tabela 3.2 Valores de pH em CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ do solo do experimento do cultivo do milho com inoculação de diferentes cepas de bactérias.....	64
Tabela 3.3 Fitomassa seca das raízes e de parte aérea de milho cultivado em solo contaminado com mercúrio e na presença de diferentes bactérias.....	70
Tabela 3.4 Média das concentrações de mercúrio total no Latossolo Vermelho eutroférico esperada no início (momento da semeadura) e a encontrada.....	72
Tabela 3.5 Concentração de Hg total no Latossolo Vermelho eutroférico no final do experimento e acúmulo de Hg na fitomassa seca de raiz e parte aérea.....	73

Tabela 3.6 Correlação das variáveis das plantas de milho.....	74
--	----

REMEDIAÇÃO DE LATOSSOLO VERMELHO eutroférico CONTAMINADO COM MERCÚRIO

RESUMO - O mercúrio (Hg) é um metal potencialmente tóxico e não essencial para os organismos. Alternativas menos onerosas e ambientalmente corretas como a remediação com uso de plantas e bactérias podem recuperar áreas contaminadas. Por isso, avaliou-se, em ambiente controlado, o potencial de remediação de plantas e bactérias em Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) contaminado com HgCl_2 em diferentes doses de Hg^{2+} . Na primeira etapa, 5 kg de LVef foram contaminados com solução de HgCl_2 , em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos: controle positivo (sem Hg^{2+}) e tratamentos com 5 mg kg^{-1} de Hg, 24 e 36 mg kg^{-1} de Hg^{2+} , base seca, em 5 repetições e mantidos por 75 dias com plantas *Hibiscus cannabinus* para avaliar seu efeito remediador. A quantificação do Hg total foi por espectrofotometria de absorção atômica. O tratamento com 24 mg kg^{-1} de Hg apresentou fitomassa seca da raiz maior que dos demais. De modo geral, LVef foi responsável por reter maior concentração do Hg do que as plantas. O Hg acumulou em maior proporção nas raízes do que na parte aérea, sendo maior o acúmulo com aumento da dose. A planta que recebeu a dose de 36 mg kg^{-1} Hg acumulou 2,57 mg kg^{-1} de Hg por planta, diferindo dos demais tratamentos. Concluiu-se que o LVef adsorveu maior concentração de Hg do que as plantas. O *H. cannabinus* apresentou resistência a diferentes concentrações de Hg no solo e pode ser considerado como planta potencial estabilizadora de Hg^{2+} , pois acumulou maior concentração de Hg nas raízes do que na parte aérea. Na segunda etapa, isolaram-se 180 microrganismos do solo da etapa anterior e apenas 12 sobreviveram, *in vitro*, a alta concentração de Hg e 5 foram escolhidas devido à facilidade de cultivo e características morfológicas para serem avaliadas como potenciais remediadoras de Hg associadas à planta de milho. Vasos com 2 kg LVef foram contaminados com HgCl_2 sólido, em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos: controle (Hg e sem bactéria), tratamento 2 (Hg e bactéria 1), tratamento 3 (Hg e bactéria 2), tratamento 4 (Hg e bactéria 3), tratamento 5 (Hg bactéria 4) e tratamento 6 (Hg e bactéria 5) e 4 repetições. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg^{-1} de Hg^{2+} . A quantificação do Hg total foi por espectrofotometria de absorção atômica e a identificação das bactérias foi realizada por sequenciamento (Sanger). As bactérias foram identificadas como: *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. A fitomassa seca da raiz e da parte aérea (PA) apresentaram homogeneidade entre os tratamentos analisados. O tratamento 2 (com *Enterobacter* sp.) foi o que translocou maior quantidade de Hg para a PA, acumulando 0,25 mg kg^{-1} de Hg total por fitomassa de PA. O tratamento 6 (com *Bacillus* sp.) acumulou maior quantidade de Hg na raiz e na PA, totalizando 6,99 mg kg^{-1} de Hg total por planta. Concluiu-se que o LVef adsorveu maior concentração de Hg do que as plantas. O milho apresentou resistência à alta concentração de Hg no solo e o pode ser considerado como planta potencial estabilizadora de Hg^{2+} , pois acumulou maior concentração do metal nas raízes do que na parte aérea.

Palavras-chave: Biorremediação, fitorremediação, metal potencialmente tóxico

ABSTRACT - Mercury (Hg) is a potentially toxic metal and not essential for organisms. Less costly and environmentally sound alternatives such as plant and bacterial remediation have been used to recover contaminated areas. Therefore, in a controlled environment, the potential for remediation of plants and bacteria in an Oxisol contaminated with HgCl_2 at different doses of Hg^{2+} was evaluated. In a first experiment, 5 kg of Oxisol were contaminated with HgCl_2 solution, in a completely randomized design with 4 treatments: positive control (without Hg^{2+}) and treatments with 5 mg kg^{-1} Hg, 24 and 36 mg kg^{-1} Hg^{2+} , dry basis, and 5 repetitions and maintained for 75 days with *Hibiscus cannabinus* plants to assess its remediation potential. Total Hg quantification was by atomic absorption spectrophotometry. The 24 mg kg^{-1} Hg treatment presented higher root dry weight than the others. In general, LVEf was responsible for retaining higher Hg concentration than plants. Hg accumulated to a greater extent in the roots than in the shoots, with greater accumulation with increasing dose. Plant that received the dose 36 mg kg^{-1} Hg accumulated 2,57 mg kg^{-1} Hg per plant, differing from the other treatments. It was concluded that Oxisol adsorbed higher Hg concentration than plants. *H. cannabinus* showed resistance to different soil Hg concentrations and can be considered as a potential Hg^{2+} stabilizing plant because it accumulated higher Hg concentration in the roots than in the shoots. In the second experiment, 180 soil microorganisms were isolated from the previous experiment and only 12 survived, in vitro, the high concentration of Hg and 5 were chosen due to the ease of cultivation and morphological characteristics to be evaluated as potential Hg remediation associated with maize plant. Pots with 2 kg of Oxisol were contaminated with solid HgCl_2 , in a completely randomized design with 6 treatments: control (Hg and no bacteria), treatment 2 (Hg and bacteria 1), treatment 3 (Hg and bacteria 2), treatment 4 (Hg and bacteria 3), treatment 5 (Hg bacteria 4) and treatment 6 (Hg and bacteria 5) and 4 repetitions. All treatments received a dose of 36 mg kg^{-1} Hg^{2+} . Total Hg was quantified by atomic absorption spectrophotometry and bacterial identification was performed by sequencing (Sanger). The bacteria were identified as *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. and *Staphylococcus* sp. The root and shoot dry weight showed homogeneity between the analyzed treatments. Treatment 2 (with *Enterobacter* sp.) was the one of translocated the highest amount of Hg in the shoot, with 0,25 mg kg^{-1} total Hg per shoot phytomass. The treatment 6 (with *Bacillus* sp.) accumulated higher amount of Hg in the roots and shoots, with 6,99 mg kg^{-1} of Hg per plant. It was concluded that the Oxisol adsorbed more Hg than the plants. Maize presented resistance to high soil Hg concentration and can be considered as a potential stabilizing plant for Hg^{2+} because it accumulated higher concentration of the metal in the roots than in the aerial part. It was concluded that the Oxisol adsorbed more Hg than the plants. Maize presented resistance to high soil Hg concentration and can be considered as a potential stabilizing plant for Hg^{2+} because it accumulated higher concentration of the metal in the roots than in the shoots.

Keywords: Bioremediation, phytoremediation, potentially toxic metal

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1. Introdução

A busca por estratégias de manejo que minimizem os impactos antrópicos ao ambiente não é recente. Um desses impactos, que tem crescido ao longo das últimas décadas, é o aumento do teor de metais potencialmente tóxicos no meio, que acarreta diversos problemas, como contaminação do ar, do solo, dos recursos hídricos, dos animais e, ainda, compromete a saúde humana, dependendo da forma e concentração em que se encontram.

Diversos ambientes do planeta, até mesmo locais mais remotos, apresentam contaminação por metais que não têm origem geogênica local. No Antártico, por exemplo, concentrações de mercúrio (Hg) maiores do que o estimado para o nível basal da região são encontradas em vários compartimentos (atmosfera, gelo, biota, etc) em decorrência do transporte atmosférico de Hg emitido a longa distância (Lacerda e Malm, 2008; Lacerda et al., 2017).

O mercúrio é naturalmente encontrado em rochas ígneas e sedimentares (Adriano, 2001), porém, é frequentemente empregado na mineração, na indústria para fabricação de lâmpadas e baterias, na produção de cloro, na produção de fármacos, pesticidas, inseticidas e até na fabricação de tintas (Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007; Li et al., 2009).

O Hg pode ser encontrado nos estados de oxidação Hg^0 (Hg elementar), Hg^{1+} (mercuroso) e Hg^{2+} (mercúrico). Na atmosfera, há predomínio do Hg^0 , enquanto no solo, na água e nos sedimentos, a maior parte está na forma de sais inorgânicos (Hg^{2+}) e na biota na forma orgânica de metilmercúrio (CH_3Hg^+) (Adriano, 2001; Beckers e Rinklebe, 2017).

No ambiente, o Hg não pode ser eliminado, porém, pode sofrer transformações para formas mais tóxicas, que são Hg^{2+} , CH_3Hg^+ (monometilmercúrio) e $(CH_3)_2Hg$ (dimetilmercúrio), para formas menos tóxicas, que são Hg^0 e HgS (Wagner-Döbler, 2013).

Nenhum organismo utiliza Hg em sua biossíntese, e sua presença no ambiente tem se tornado uma preocupação global devido à volatilidade e toxicidade (Wang et al., 2003; Pacyna et al., 2016; Sundseth et al., 2017). Por essa razão, foi classificado

pela *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* como a terceira substância mais perigosa, ficando atrás de arsênio e chumbo (ATSDR, 2016).

No período de 2010 a 2013, o Brasil emitiu 39.214 kg de Hg para o ambiente, sendo a maior parte decorrente da mineração de ouro (22.500 kg) (UNEP, 2018).

Atualmente, as indústrias aplicam técnicas para a remediação de solo contaminado com Hg, por métodos como a vitrificação (imobilização do metal em uma matriz de vidro), tratamento térmico (redução do Hg^{2+} para Hg^0), extração físico-química do metal do solo (diminuição da biodisponibilidade) e encapsulação de formas reativas (diminuição da mobilidade) (Mahbub et al., 2017). No entanto, estas medidas apresentam elevado custo.

Diante disso, estratégias menos onerosas para a remediação de áreas contaminadas, tais como a biorremediação com uso de plantas e microrganismos, têm despertado atenção mundial para a recuperação de solos e recursos hídricos.

As plantas podem agir como extratoras, estabilizadoras, volatilizadoras, além de atuar na degradação, rizodegradação e rizofiltração (Tangahu et al., 2011). Além disso, contribuem indiretamente na fitorremediação ao suportar microrganismos simbióticos nas raízes, responsáveis pela desintoxicação dos contaminantes (Kumar et al., 2017).

Diversos estudos têm demonstrado efetivo potencial das plantas em acumular Hg em sua biomassa (Xun et al., 2017; Qian et al., 2018) com tendência para acúmulo em maior proporção nas raízes do que na parte aérea (Pedron et al., 2013; Chauhan e Mathu, 2018; Debeljak et al., 2018; Cabrita et al., 2019).

A biorremediação com uso de microrganismos como fungos, bactérias e leveduras resistentes à metais potencialmente tóxicos e outros contaminantes, é uma técnica promissora pois os microrganismos podem transformar os contaminantes em formas menos tóxicas e/ou menos móveis no ambiente (Dixit et al., 2015; Naguib et al., 2018).

Os microrganismos possuem diferentes mecanismos de resistência e estratégias para bioacumular, biomineralizar, biotransformar e adsorver os contaminantes do meio. A biorremediação pode ter êxito se utilizar microrganismos apropriados para cada contaminante, baseando-se na compreensão das interações entre os microrganismos e o ambiente (Dixit et al., 2015).

Por esta razão, objetivou-se, neste trabalho, avaliar em duas etapas o potencial de remediação de plantas de *Hibiscus cannabinus* e de plantas de milho inoculadas com bactérias resistentes a alta concentração de Hg^{2+} .

2. Revisão de literatura

2.1. Metais potencialmente tóxicos

Os metais potencialmente tóxicos são os elementos químicos que apresentam densidade maior que 5 g cm^{-3} e os metaloides, sendo eles antimônio (Sb), arsênio (As), bário (Ba), berílio (Be), boro (B), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), estanho (Sn), flúor (F), manganês (Mn), Hg, molibdênio (Mo), níquel (Ni), prata (Ag), selênio (Se), tálio (Tl), vanádio (V) e zinco (Zn) (Adriano, 2001; Chen et al., 2015).

Esses metais e metaloides podem ser considerados como contaminantes quando presentes em concentrações acima dos níveis basais e quando apresentarem toxicidade. Alguns são, ao mesmo tempo, micronutrientes, por serem requeridos em quantidades específicas pelas plantas, animais e seres humanos (Adriano, 2001).

Segundo o mesmo autor, podem também ser denominados elementos traço quando são naturais do meio, por exemplo alumínio (Al), cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) potássio (K), silício (Si) e sódio (Na) e em nível $<0,1\%$, e também, podem ser essenciais em baixas concentrações para as plantas, (B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) e para os animais (Co, Cu, Fe, Ni, entre outros).

A presença de metais potencialmente tóxicos no meio pode ser de origem natural ou antrópica, decorrente da atividade industrial, da mineração, do uso de fertilizantes, herbicidas, pesticidas e fungicidas utilizados na agricultura (Zhu et al., 2017), e da queima de combustíveis, entre outras atividades.

Os metais potencialmente tóxicos não são facilmente convertidos em formas menos tóxicas, podem persistir no ambiente por longos períodos, além de bioacumular e poder entrar na cadeia alimentar e serem tóxicos em baixas concentrações, colocando em risco a saúde dos seres vivos (Ayangbenro e Babalola, 2017).

2.2. Mercúrio

O Hg é um metal de transição muito tóxico, de número atômico 80 e massa atômica relativa de 200,59, líquido à 25 °C , com ponto de ebulição a 357 °C , sólido a $-38,83 \text{ °C}$, condutor de eletricidade e encontrado na atmosfera principalmente na sua

forma elementar (Hg^0) gasosa (Adriano, 2001, Chang et al., 2009; Ariya et al., 2015; Fu et al., 2016).

Pode ser naturalmente encontrado em regiões vulcânicas, em rochas ígneas, sedimentares e em fontes de águas termais localizadas em dobramentos modernos. As emissões naturais desse metal correspondem a até 10% de liberação para o ambiente (Adriano, 2001; Rytuba, 2003; UNEP, 2013).

Por estar presente em rochas, pode-se considerar solos como normais aqueles que apresentam nível menor que $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg e com tendência a se concentrar na profundidade de 0,05 a 0,2 m (Silva et al.; 1994, Adriano, 2001). No entanto, esse valor tem aumento significativo quando os solos estão localizados próximos a fontes de poluição de Hg (Wang et al., 2011).

Embora o Hg seja um metal de ocorrência natural, que não pode ser criado ou extinguido, a ciclagem desse elemento no meio é decorrente não só de processos naturais como também de processos antropogênicos, intensificados devido à interferência das ações humanas (Kim et al., 2016) para atender as necessidades da vida moderna.

A forma antrópica de liberação de Hg para o ambiente pode ser primária e secundária. A forma primária ocorre quando o metal de origem geológica é mobilizado e liberado para o meio através da extração de minérios e pela queima de combustíveis. A secundária corresponde ao uso de Hg intencional, como por exemplo, no processo industrial. Ambas as formas podem contribuir para geração de resíduos contaminados com o metal (Pacyna et al., 2010).

Os processos antropogênicos que favorecem a contaminação do ambiente com Hg são a recuperação do ouro em garimpos, atividades industriais como a fabricação de lâmpadas fluorescentes, baterias e condutores elétricos, a produção de cloro alcalino, a fabricação de produtos odontológicos, fármacos, pesticidas e inseticidas e a produção de tintas (Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007; Li et al., 2009). A produção de cimento, a fundição de metais não ferrosos, a incineração de restos da produção de aço e a fabricação de termômetros e termostatos (Rytuba, 2003) também são fontes antrópicas de liberação de Hg no ambiente.

O Hg é um metal potencialmente tóxico em todas as formas, e o grau de toxicidade varia de acordo com a forma em que se encontra (Schaefer, 2016).

Apresenta um complexo conjunto de transformação que engloba simultaneamente processos químicos, físicos e biológicos (Shotyk, 2017).

O Hg apresenta três estados de oxidação: mercúrio elementar (Hg^0), mercurioso (Hg^+) e mercúrico (Hg^{2+}) (Adriano, 2001). No ambiente, pode ser encontrado nas formas elementar, inorgânica e orgânica (metilmercúrio e dimetilmercúrio), sendo a forma orgânica a mais tóxica por ser lipossolúvel e poder atravessar as barreiras dos organismos (Faria, 2003) e conseqüentemente, ser absorvido e entrar na cadeia alimentar. Ademais, não pode ser transformado em um composto não tóxico, mas sim convertido das formas mais tóxicas, que são Hg^{2+} , metilmercúrio (CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio ($[(\text{CH}_3)_2\text{Hg}]$), para formas menos tóxicas para a saúde humana e do ambiente, que são, Hg^0 e HgS (Wagner-Döbler, 2013).

A presença de Hg em quantidades significativas na atmosfera é devido à sua volatilidade incomum, que é favorecida com o aumento da temperatura quando comparado a outros metais. O Hg^0 é presente em maior quantidade na atmosfera por ser mais volátil, ser pouco reativo, por apresentar pouca velocidade de deposição seca, e por apresentar baixa solubilidade em água (Adriano, 2001; Fu et al., 2015).

Pode persistir por longo período no ambiente, ser móvel e ser transportado do local onde foi emitido para outra parte do mundo pela corrente de ar e velocidade do vento, na forma de Hg^0 , bem como, em menor proporção, na forma orgânica (Palmieri, 2006; Pacyna, et al., 2016; Sundseth et al., 2017).

O Hg pode permanecer ativo por aproximadamente 100 anos, nos sedimentos dos oceanos, rios e lagos, e servir de substrato para sofrer metilação, mesmo que a fonte de contaminação tenha sido eliminada. Na atmosfera, o Hg^0 pode ser oxidado pelo ozônio e transformado a Hg^{2+} e ambos podem ser depositados no solo e na água, ainda pode ser transportado pelo vento para outros lugares (Figura 1.1). Uma vez no ambiente terrestre, parte desse metal pode ser volatilizado e voltar à atmosfera, e parte pode ser complexado ou precipitado com o HgS (Roulet e Lucotte, 1995; Bisinoti e Jardim, 2004; Fitzgerald e Lamborg, 2007).

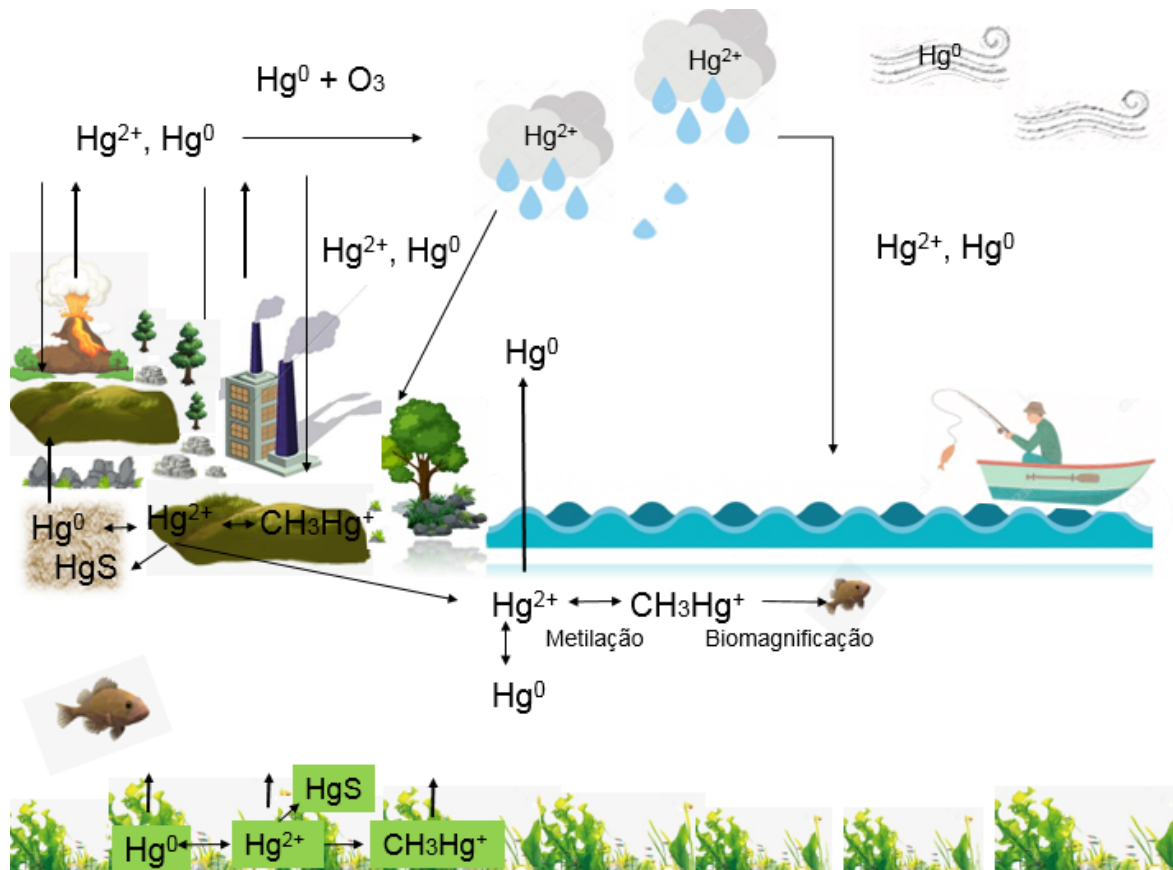


Figura 1.1. Ciclo do mercúrio no ambiente.

Fonte: Adaptado de Mason et al. (1994).

O Hg^{2+} pode se ligar com outros íons presentes no meio, como por exemplo, o cloreto, e formar o cloreto de mercúrio (HgCl_2), bem como, poderá ser convertido em Hg^0 , volatilizar e voltar para atmosfera e/ou ser transformado em metilmercúrio ou dimetilmercúrio/metilmercúrio (Bisinoti e Jardim, 2004) pelo processo de metilação. As queimadas também são responsáveis pela emissão de Hg para a atmosfera e este pode ser transformado a forma orgânica (De Simone et al., 2017).

A metilação pode ocorrer no solo e nos sedimentos, em condições de aerobiose, principalmente por microrganismos anaeróbicos, mas também por processos abióticos com o contato com radiação ultravioleta (Bisinoti e Jardim, 2004; Miranda et al., 2007; Eklöf et al., 2018).

O processo de metilação favorece a formação de metilmercúrio em meios mais ácidos a neutros e a formação de dimetilmercúrio em meios mais alcalinos. Além disso, é favorecido em ambientes que apresentam elevada concentração de matéria orgânica, que estimula a atividade dos microrganismos. Porém, o aumento dos teores

de matéria orgânica pode favorecer a complexação do Hg em ligantes orgânicos, e reduzir a atividade microbiana, o que conseqüentemente, irá reduzir o processo de metilação biótica (Bisinoti e Jardim, 2004).

A desmetilação é o processo de redução do metilmercúrio em Hg^0 que ocorre pela ação de bactérias anaeróbicas resistentes a presença do metal e que possuem genes (*merB*) que codificam a enzima organo mercúrio liase. Essa reação também pode ser foto-oxidativa e transformar metilmercúrio em Hg^{2+} , com tendência para ocorrer em ambientes com menor concentração de Hg (Mahbub et al., 2017).

2.3. Risco à saúde humana por contaminação com mercúrio

A exposição ao mercúrio pode causar intoxicação resultando em quadro de insuficiência respiratória prolongada, distúrbios pulmonares (pneumomediastino), distúrbios renais e paralisia cerebral. Efeitos imunotóxicos também foram notados após a exposição ao mercúrio orgânico e inorgânico (Clarkson, 1993; Pollard et al., 2010; Kern et al., 2014; Smiechowicz et al., 2017).

Problemas de alergias e hipersensibilidade também podem ocorrer após a exposição ao mercúrio inorgânico (AMAP, 2003). A exposição pode ocasionar, ainda, quadros de ataxia, levar a paralisia cerebral de fetos e afetar gravemente a função neurológica devido à exposição ao metilmercúrio (Harada, 1995; Cariccio et al., 2019). Das doenças causadas por metais potencialmente tóxicos, 23% estão relacionadas à forma orgânica de metilmercúrio (Gibb et al., 2018).

Vassalo et al. (2019) identificaram que ratos expostos a $HgCl_2$ durante 30 dias aumentaram as chances de apresentarem problemas cardiovasculares, assim como hipertensão. Em outro estudo, Meleleo et al. (2019) sugerem que o contato com Hg^{2+} pode favorecer o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

De modo geral, a exposição a esse metal, em suas diferentes formas, pode ocasionar danos, com diversos graus de severidade à saúde física e mental dos seres humanos e animais.

2.4. Mercúrio no Brasil

O Brasil importa, principalmente dos Estados Unidos, Hg metálico para uso industrial, e importou cerca de 25.000 kg no período de janeiro a abril de 2013, sendo o Estado de São Paulo responsável por importar 960 kg (Cetesb, 2014).

As regiões do Caminho do Mar, confluência dos rios Perequê e Cubatão, Vale do Mogi, Vale dos Pilões e Vila Parisi, localizadas na cidade de Cubatão (São Paulo), apresentaram notadamente, em amostras foliares, a presença de Hg em avaliação feita no ano de 2012. A região dos rios Perequê e Cubatão apresentou 71% das amostras com concentrações acima do Valor de Referência (VR), variando entre 0,52 a 1,78 mg kg⁻¹ de Hg metálico (Cetesb, 2015).

Nas cidades de Santos e São Vicente, localizadas no Estado de São Paulo, também foram relatados teores de Hg acima dos valores orientadores, em amostras de sedimentos e na biota aquática. Em amostras de água (0,004 mg L⁻¹ de Hg total) e peixes (0,29 mg kg⁻¹ de Hg total) do Rio Grande, SP (Flynn et al., 2011; Nanini-Costa et al., 2016), do mesmo modo, foram relatados teores acima dos valores orientadores.

O Brasil possui diversas reservas de ouro e as principais estão localizadas nos estados do Amapá, Bahia, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso e Pará (ANM, 2017), o que torna essas áreas potenciais poluidores de Hg no ambiente, uma vez que em mineração artesanal o Hg é utilizado para amalgamar o ouro.

Várias regiões do Brasil, principalmente no Estado de Minas Gerais, estão contaminadas com Hg em função da atividade mineradora de ouro (Windmöller et al., 2015). Na região amazônica, estima-se que 15 anos de mineração provocaram a contaminação com aproximadamente 4.000 t de Hg (Lacerda, 2003; Bastos et al., 2006). Sedimentos do Rio Xingu apresentaram 1,025 mg kg⁻¹ de Hg total e 0,03 mg kg⁻¹ de metilmercúrio, assim como foi identificada a presença de Hg nos rios Cabaliana, Canaçari, Curuai e Janauaca localizados na bacia amazônica (Araujo et al., 2018), que pode ser oriunda da mineração do ouro.

Amostras de peixes coletadas no período de chuva no Rio Negro, na região da Amazônia, apresentaram valores entre 0,12 e 0,59 mg kg⁻¹ de Hg na musculatura das espécies analisadas, dos quais mais de 70% apresentaram concentração acima de 0,4 mg kg⁻¹ de Hg (Soares et al., 2016). Teores de Hg acima do estabelecido pela

legislação também foram identificados em amostras de sedimento do Rio Ribeirão da Mata, em Minas Gerais (Torres et al., 2017).

Estudos apontam que nos estados de Amapá, Goiás, Mato Grosso, Pará e Rondônia, há a presença de Hg total e metilmercúrio em populações que vivem próximas ao garimpo de ouro e em amostras de sedimentos e moluscos (Viveira et al., 1995; Fostier, 2000, Pinheiro et al., 2000, Tibiriçá et al., 2013; Lauthartte et al., 2018). Essa situação reflete a necessidade de controle e monitoramento do Hg liberado para o ambiente nessas áreas, principalmente nos locais onde existem fontes pontuais de poluição.

2.5. Remediação de áreas contaminadas

Para conter e minimizar os efeitos nocivos da contaminação do ambiente por diversos contaminantes oriundos da intensificação da atividade antrópica, estratégias para a recuperação de áreas contaminadas têm sido constantemente estudadas.

O processo de recuperação envolve uma série de medidas para otimizar o restabelecimento dos danos causados pelos contaminantes ao ecossistema, visando o retorno de um local contaminado a uma condição mais próxima do natural (Rohr et al., 2016).

Nos últimos anos tem crescido a busca pelo reequilíbrio de áreas contaminadas e se tornado uma questão de política ambiental em âmbito mundial (Bullock et al. 2011) o que força a adoção de planejamento estratégico para a redução de contaminação e técnicas de remediação pelas empresas poluidoras.

Embora seja de conhecimento das empresas que o Hg resulta em diversos prejuízos para o ambiente, para a saúde animal e humana, ainda que em menor proporção, este metal continua sendo utilizado pela indústria. Para minimizar as contaminações das áreas, algumas técnicas físico-químicas podem ser aplicadas para reduzir a toxicidade nos solos, sedimentos e água contaminados com Hg.

Uma das técnicas de remediação do solo utilizada em áreas de contaminação maior do que 260 mg kg^{-1} de Hg total consiste na extração química do metal, com uso de agentes quelantes ou ácidos como clorídrico ou sulfúrico. No entanto, esse método

demanda elevado custo e gera grande quantidade de água residual de difícil tratamento (Abumaizar e Smith, 1999; USEPA, 2007; Wang et al. 2012).

O Hg pode também ser imobilizado pela transformação em forma menos reativa (HgS) com uso de agentes contendo enxofre e, assim, reduzir a mobilidade e volatilização do Hg, com a vantagem desse método poder ser aplicado em áreas extensas e permitir a sua revegetação. Porém, o HgS produzido pode ainda sofrer metilação, necessitando de monitoramento constante, sendo uma desvantagem em longo prazo (Mahbub et al., 2017).

Outra técnica aplicada é o tratamento térmico do solo para transformar o Hg em Hg⁰, seguido da condensação do vapor para ser transformado na forma líquida. Entretanto, este é um tratamento oneroso e o solo, devido à elevada temperatura, tem sua qualidade reduzida, tornando-o impróprio para a agricultura (Dermont et al. 2008; Ma et al., 2014).

A vitrificação consiste no aquecimento do solo seguido de tratamento químico para solificação e estabilização do Hg e, do mesmo modo como o tratamento térmico, reduz a qualidade do solo. Sua aplicação depende do tipo do solo e requer o tratamento dos gases emitidos (USEPA, 2007; He et al., 2015).

Técnicas alternativas e menos onerosas, como remediação com uso de plantas e microrganismos, e que podem ser aplicadas em grandes áreas, estão sendo constantemente estudadas como potenciais remediadores de Hg do solo, sedimento e água.

2.6. Remediação com uso de plantas

A remediação com uso de plantas tolerantes à presença de diversos contaminantes, é uma técnica, *in situ*, considerada com baixo custo de implantação e adequada para ser aplicada em áreas extensas (Carmo et al., 2008; Burges et al., 2018).

A remediação com plantas envolve mecanismos de fisiologia vegetal, bioquímica do solo e dos contaminantes para restabelecer a qualidade do solo e da biota local, garantindo o desenvolvimento vegetal e dos microrganismos (Merkl et al., 2006; Marques et al., 2011). As plantas remediadoras podem atuar como extratoras,

estabilizadoras, volatilizadoras e rizofiltradoras (Tangahu et al., 2011) dos contaminantes do solo.

As plantas extratoras são capazes de acumular os contaminantes nas raízes e translocá-los para a parte aérea, produzindo maior quantidade de biomassa. São consideradas como hiperacumuladoras as plantas que acumulam mais os contaminantes na parte aérea do que nas raízes, produzindo menor quantidade de biomassa. Neste caso, são capazes de acumular de 100 a 1000 vezes mais os contaminantes nas folhas e caules (Tangahu et al., 2011; Burges et al., 2018; Vijayaraghavan et al., 2018)

Embora as plantas hiperacumuladoras sejam mais atrativas para a remediação, por acumularem maior teor dos contaminantes nas folhas e nos caules, removendo-os do meio, pode haver a entrada de elementos tóxicos na cadeia alimentar. Esse processo pode ser reduzido com o uso de plantas estabilizadoras, pois apresentam menor potencial de translocação dos metais das raízes para a parte aérea (Alkorta et al. 2010; Gómez-Sagasti et al. 2012; Burges et al., 2018).

No entanto, a fitoestabilização não remove os contaminantes do meio, mas sim reduz a sua biodisponibilidade, favorecendo a adsorção destes no solo e a complexação com substâncias húmicas, conseqüentemente, reduz a lixiviação dos elementos tóxicos no ambiente. As plantas estabilizadoras apresentam rápido crescimento e sistema radicular bem desenvolvido (Mendez e Maier, 2008; Martínez-Martínez et al., 2018; Radziemska, 2018; Vijayaraghavan et al., 2018).

Uma vez que os contaminantes são translocados das raízes para a parte aérea, podem ser volatilizados, via transpiração, com significativa diluição para a atmosfera. Contudo, a volatilização é um mecanismo da planta quando em contato apenas com compostos voláteis e se utilizada em perímetro urbano pode colocar em risco a qualidade do ar, embora tal fato ainda seja pouco relatado na literatura (Limmer e Burken, 2016).

Outra técnica de remediação com uso de plantas bastante eficaz e de interesse econômico é a rizofiltração, muito utilizada no tratamento de águas residuais, pois as raízes das plantas e a parte aérea podem absorver acumular e precipitar os contaminantes dos efluentes (Verma et al., 2006; Deyris e Grison, 2018).

Os processos de remediação pelas plantas (Figura 1.2) podem ser favorecidos pela rizosfera e pelas bactérias que atuam na dinâmica de funcionamento e desenvolvimento vegetal e como consequência, auxiliam no processo de remediação (Wenzel, 2009; Roychowdhury et al., 2019), bem como podem ser potencializados com a associação de bactérias e fungos resistentes a presença de metais potencialmente tóxicos.

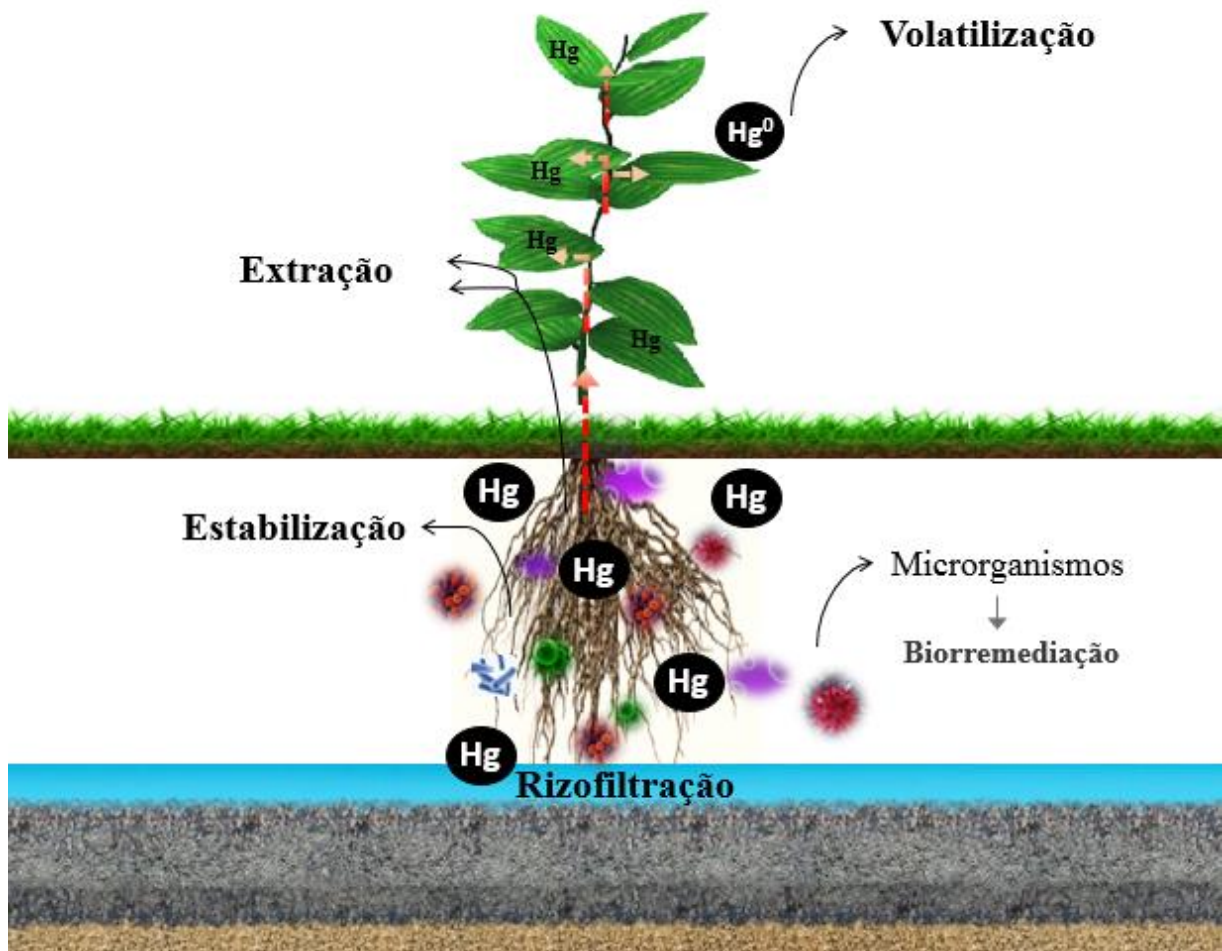


Figura 1.2. Processo de fitorremediação de mercúrio do solo.

Fonte: Adaptado de Parmar e Singh (2015).

Não há planta naturalmente hiperacumuladora de Hg, mas sim plantas que desenvolveram mecanismos para lidar com a presença desse contaminante no meio (Wagner-Döbler, 2013). O kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), assim como o milho (*Zea mays* L.), são plantas que vêm sendo estudadas por apresentarem potencial para

remediação de metais potencialmente tóxicos (Catroga et al., 2005; Arbaoui et al., 2013; Ding et al., 2016; Li et al., 2019).

Originário da África, o kenaf é uma planta anual, herbácea, pertencente à família Malvaceae. Pode ser utilizada para a produção de biomassa, na produção de papel, na indústria têxtil, na alimentação animal, como planta ornamental, apresenta propriedades medicinais, além de favorecer o sequestro de gás carbônico e ser uma planta potencialmente remediadora por possuir propriedades absorventes que favorecem a bioacumulação (Borazjani e Diehl, 1994; Roseberg, 1996; Vishnoi e Singh, 2017).

O milho apresenta fácil cultivo, elevado grau de micorrização e foi avaliado como possível remediador de Hg, sobretudo quando associado a microrganismos (Kodre et al., 2017; Debeljak et al., 2018). No entanto, o conhecimento da interação entre plantas e microrganismos como remediadores de Hg em Latossolo Vermelho eutroférico (Vef) em condições de clima tropical ainda é incipiente.

Considerando que a associação de plantas e microrganismos pode ser a chave para aumentar a remoção de compostos inorgânicos e orgânicos do solo e da água, diversas pesquisas estão sendo realizadas ativamente para aprimorar esses métodos, menos onerosos do que as tecnologias de remediação convencional (Ward e Singh, 2004).

2.7. Remediação com uso de microrganismos

Os microrganismos possuem diversos mecanismos para sobreviver e habitar ambientes com diferentes condições adversas de temperatura, salinidade, pH, concentrações de oxigênio e contaminantes, como por exemplo, os metais potencialmente tóxicos, devido a sua flexibilidade morfológica e genética (Mathema et al., 2011; Hazen, 2018).

Por isso, a remediação com uso de microrganismos vivos ou mortos, como bactérias, fungos e leveduras, é uma técnica capaz de recuperar áreas contaminadas, pois os microrganismos podem absorver, precipitar e ou transformar os elementos tóxicos em formas menos tóxicas para o ambiente, além de ser mais econômica do

que as técnicas físico-químicas convencionais (Su, 2014; Ayangbenro e Babalola, 2017).

Como mecanismos de defesa para sobreviver em meio contaminado com metais potencialmente tóxicos e reduzir o efeito tóxico destes, os microrganismos desenvolveram estratégias para bioissorver, bioacumular, biomineralizar e biotransformar os contaminantes. Desse modo, têm sido constantemente utilizados para a recuperação e redução da toxicidade de áreas contaminadas (Ayangbenro e Babalola, 2017).

A bioissorção é um processo rápido que ocorre pela aderência física dos metais potencialmente tóxicos à parede celular bacteriana, devido à presença de cargas negativas na superfície celular, o que favorece a ligação dos cátions metálicos. A bioissorção pode ocorrer pela captação ativa com uso de bactérias vivas, ou realizada pela biomassa bacteriana morta pela captação passiva, que proporciona economia com o preparo de cultivo bacteriano (Fomina e Gadd, 2014; Ayangbenro e Babalola, 2017).

Uma vez que o metal potencialmente tóxico atravessa a membrana celular para o citoplasma das bactérias vivas, ocorre o processo de bioacumulação. Para que o processo de absorção ativa ocorra, as bactérias devem ser tolerantes ao menos a um metal em alta concentração e possuir mecanismos de resistência para sobreviver em condições de toxicidade (Mosa et al., 2016; Ayangbenro e Babalola, 2017).

A biomineralização favorece a precipitação dos metais potencialmente tóxicos na fase sólida, reduzindo a solubilidade o que tende ao processo de desintoxicação do meio, além de reduzir a contaminação de outras áreas pela lixiviação dos contaminantes (Simkiss, 1977; Maity et al., 2019).

Outro mecanismo de sobrevivência das bactérias em meios contaminados é a biotransformação, que consiste em transformar os metais potencialmente tóxicos em formas menos tóxicas e não biodisponíveis para as plantas e organismos (Barkay e Schaefer, 2001), proporcionando condições mais favoráveis para o desenvolvimento da produção vegetal e homeostase do ambiente.

Diversas bactérias aeróbias e anaeróbias como *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomas* sp., *Pseudomas putida*, *Salmonella* sp., *Serratia marcescens*,

Staphylococcus epidermidis, entre outras, foram descritas por apresentarem mecanismos de resistência a diferentes concentrações e formas de Hg (Sotero-Martins et al., 2008; Giovanella e Bento, 2011; Cabral et al., 2013, Yu et al., 2014; Purkan et al., 2017, Chen et al., 2018).

A sobrevivência bacteriana à elevada concentração de Hg ocorre devido à evolução genética referente à presença do *mer* operon, localizado no DNA ou no plasmídeo, que atua de forma direta na transformação do metal em formas menos tóxicas (Schaefer et al., 2002; Schelert et al., 2004; Xiao-xi et al., 2010) e assim proporciona um ambiente mais favorável para o desenvolvimento microbiano e vegetal.

As principais formas de *mer* operon são a de estreito espectro (*merA*) que proporciona resistência apenas ao Hg inorgânico e a de amplo espectro (*merB*) que proporciona resistência não só ao Hg inorgânico como também às formas orgânicas (Misra, 1992; Bogdanova et al., 1998; Mahbub et al., 2017).

O Hg^{2+} é carregado para dentro da célula bacteriana pelas proteínas de absorção *merP*, *merT*, *merF*, *merC*, *merG* e *merR*. Então, o *merA* codifica a enzima mercúrio redutase que, em uma reação dependente de NADPH, transforma o Hg^{2+} em Hg^0 , que por difusão, sai da célula bacteriana e é liberado para o meio (Dash e Das, 2012; Mahbub et al., 2017).

No entanto, o transporte dos organomercuriais para o interior das células bacterianas ainda é pouco conhecido (Dash e Das, 2012). Uma vez dentro do citoplasma, esses compostos são clivados de C-Hg para Hg^{2+} pela ação da enzima organomercurio liase que é codificada pelo gene *merB*. Assim, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0 pela ação do gene *merA* e pode ser prontamente volatilizado (Schottel, 1978; Mahbub et al., 2017).

Alguns microrganismos, além de atuar como remediadores de metais potencialmente tóxicos, podem atuar como promotores de crescimento das plantas por favorecer o desenvolvimento vegetal

Algumas bactérias são consideradas promotoras de crescimento das plantas (BPCP) por serem capazes de se relacionar positivamente com as plantas, promovendo o crescimento e resistência vegetal. As BPCP podem atuar nos processos de fixação de nitrogênio, na solubilização do fósforo, produção de

fitormônios, na redução dos contaminantes do solo para permitir o desenvolvimento vegetal, entre outros processos (Morales-García et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento que não possuem o gene *mer* de resistência ao Hg podem beneficiar o crescimento das plantas em meio contaminado com o metal com outras estratégias. São capazes de melhorar a absorção dos nutrientes, produzir fitormônios reguladores de crescimento como auxina (IAA) e podem produzir compostos quelantes de metais potencialmente tóxicos (Jha et al. 2012).

Bactérias *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. (Tariq et al., 2015; Mobeen e Latif, 2016; Amin e Latif 2017), entre outras, são BPCP e apresentam resistência ao Hg podendo favorecer o processo de remediação do metal e detoxificação do meio (Sapre et al., 2019).

O sucesso da biorremediação depende da escolha correta do microrganismo a ser utilizado em cada local, considerando os fatores ambientais, tipo e concentração dos contaminantes (Roychowdhury et al., 2019).

2.8. Vantagens e desvantagens da remediação com uso de plantas e microrganismos

A remediação com uso de plantas e microrganismos é uma técnica sustentável que pode ser aplicada *in situ* e *ex situ*, o que reduz custos de implementação do tratamento de áreas industriais e rurais contaminadas. Tais abordagens, necessitam de menor controle quando comparadas com outros métodos de remediação, reduzindo a toxicidade dos ambientes contaminados e são pouco destrutivas. Além disso, o Brasil é favorecido por ampla biodiversidade, o que aumenta a gama de plantas com potencial para remediação (Rock et al. 2000; Marques et al., 2011; Raman e Gnansounou, 2017; Roychowdhury et al., 2019; Singh et al., 2019).

O uso dessas técnicas apresenta algumas limitações como a lentidão no processo de remediação, que pode durar anos, dependendo das características do solo e profundidade de atuação limitada à rizosfera. A biomassa que acumulou os contaminantes orgânicos e inorgânicos também necessita de adequada disposição final, e ainda há carência de informações sobre a adoção da melhor estratégia para

cada caso, entre outros problemas (Marques et al., 2011; Cameselle et al., 2013; Cameselle et al., 2019).

2.9. Hipótese e objetivos

Sabe-se que as plantas e as bactérias possuem habilidades para se desenvolverem e atuar na remediação de solos contaminados com diversos metais potencialmente tóxicos. No entanto, o conhecimento da interação entre plantas e microrganismos como remediadores de Hg em Latossolos ainda é incipiente.

Diante do exposto, neste trabalho, em uma primeira etapa em ambiente controlado, avaliou-se o potencial de remediação de planta de *H. cannabinus* L. (kenaf) cultivada em Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) contaminado com HgCl₂ em diferentes concentrações de Hg²⁺.

Na segunda etapa, foram isoladas bactérias do solo da etapa anterior, selecionadas e identificadas 5 bactérias resistentes a altas concentrações de Hg²⁺ potenciais agentes biorremediadores do metal.

A segunda etapa, assim como na anterior, foi realizada em ambiente controlado e se avaliou o potencial remediador das 5 bactérias selecionadas, associadas à planta de *Zea mays* L. (milho) cultivado em LVef, estéril e contaminado com HgCl₂ em alta concentração de Hg²⁺.

Referências

Abumaizar RJ, Smith EH (1999) Heavy metal contaminants removal by soil washing. **Journal of Hazardous Materials** 70:71–86.

Adriano DC (2° ed.) (2001) Trace elements in terrestrial environments – Biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. New York: Springer, 866p.

Alkorta I, Becerril JM, Garbisu C (2010) Phytostabilization of metal contaminated soils. **Reviews on Environmental Health** 25:135-146.

ANM (Agência Nacional de Mineração): Anuário mineral brasileiro. Principais substâncias metálicas (2017) Brasília: Departamento nacional de produção mineral. Disponível em: http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/amb_metalicos2017
Acesso em: 8 de abril de 2019.

Araujo BF, Hintelmann H, Dimock B, Sobrinho RL, Bernardes MC, Almeida MG, Krusche AV, Rangel TP, Thompson F, Rezende CE (2018) Mercury speciation and Hg stable isotope ratios in sediments from Amazon floodplain lakes—Brazil. **Limnology and Oceanography** 63:1134-1145.

Arbaoui S, Evlard A, Mhamdi MEW, Campanella B, Paul R, Bettaieb (2013) Potential of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and corn (*Zea mays* L.) for phytoremediation of dredging sludge contaminated by trace metals. **Biodegradation** 24:563-567.

Ariya PA, Amyot M, et al. (2015) Mercury physicochemical and biogeochemical transformation in the atmosphere and at atmospheric interfaces: a review and future directions. **Chemical Reviews** 115:3760-3802.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Priority list of hazardous substances (2016) Atlanta: Federal public health agency of the **U.S. Department of Health and Human Services**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/> Acesso em: 08 de março de 2017.

Ayangbenro AS, Babalola OO (2017) A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 14:94-109.

Barkay T, Schaefer J (2001) Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. **Current Opinion in Microbiology** 4:318-323.

Bastos WR, Gomes JPO, Oliveira RC, Almeida R, Nascimento EL, Bernardi JVE, Lacerda LD, Silveira EG, Pfeiffer WC (2006) Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of The Total Environment** 368:344-351.

Beckers F, Rinklebe J (2017) Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 47:693-794.

Bisinoti MC, Jardim WF (2004) O comportamento do metilmercúrio (metilmercúrio) no ambiente. **Química Nova** 27:593-600.

Bogdanova ES, Bass IA, Minakhin LS, Petrova MA, Mindlin SZ, Volodin AA, Kalyaeva ES, Tiedje JM, Hobman JL, Brown NL, Nikiforov VG (1998) Horizontal spread of *mer* operons among Gram positive bacteria in natural environments. **Microbiology** 144:609-620.

Borazjani A, Diehl S (1994) Kenaf core as an enhancer of bioremediation. In: Goforth CE, Fuller MJ (Eds.) **A summary of kenaf production and product development research**. Mississippi: Agriculture and forestry experiment station bulletin 1011, p. 26-27.

Bullock JM, Aronson J, Newton AC, Pywell RF, Rey-Benayas JM (2011) Restoration of ecosystem services and biodiversity: Conflicts and opportunities. **Trends in Ecology & Evolution** 26:541–549.

Burges A, Alkorta I, Epelde L, Garbisu C (2018) From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. **International Journal of Phytoremediation** 20:384-397.

Cabral L, Giovanella P, Gianello C, Bento FM, Andrezza R (2013) Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. **Biodegradation** 24:319-331.

Cabrita MT, Duarte B, Cesário R, Mendes R, Hintelmann H, Eckey K, Dimock B, Caçador, I, Canário J (2019) Mercury mobility and effects in the salt-marsh plant *Halimione portulacoides*: Uptake, transport, and toxicity and tolerance mechanisms. **Science of The Total Environment** 650:111-120.

Cameselle C, Chirakkara RA, Reddy KR (2013) Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: Status and opportunities. **Chemosphere** 93:626-636.

Cameselle C, Gouveia S, Urréjola S (2019) Benefits of phytoremediation amended with DC electric field. Application to soils contaminated with heavy metals. **Chemosphere** 229:481-488.

Cariccio VL, Samà A, Bramanti P, Mazzon E (2019) Mercury involvement in neuronal damage and in neurodegenerative diseases. **Biological Trace Element Research** 187:341-356.

Carmo ML, Procópio SDO, Pires FR, Cargnelutti Filho A, Barroso ALL, Silva GP, Pacheco LP (2008) Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha** 26:301-313.

Catroga A, Fernando A, Oliveira JS (2005) Effects on growth, productivity and biomass quality of kenaf of soils contaminated with heavy metals. In: EUROPEAN BIOMASS CONFERENCE & EXHIBITION. Paris: p. 149–152.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo): Biomonitoramento de vegetação na região de Cubatão: Fluoreto, cádmio, chumbi, mercúrio e níquel (2015) São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/ar/wp-content/uploads/sites/28/2013/12/Veg_Web_24-04.pdf. Acesso em: 03 de maio de 2019.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo): Contaminação por mercúrio no estado de São Paulo (0214) São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2015/06/relatorio-contaminacao-mercurio-estado-sp-2014.pdf>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

Chang TC, You SJ, Yu BS, Chen CM, Chiu YC (2009) Treating high-mercury-containing lamps using full-scale thermal desorption technology. **Journal of Hazardous Materials** 162:967-972.

Chauhan P, Mathur J (2018) Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of multiple pollutants in the environment: A Review. **Journal of Biological Sciences and Medicine** 4:5-16.

Chen SC, Sheu YT, Surampalli RY, Zhang TC, Kao, CM (2018) Application of microbial transformation to remediate hg-contaminated water: strain isolation and laboratory microcosm study. **Journal of Environmental Engineering** 144:1-11.

Chen H, Teng Y, Lu S, Wang Y, Wang J (2015) Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. **Science of The Total Environment** 512-513:143-153.

Clarkson TW (1993) Mercury: major issues in environmental health. **Environmental Health Perspectives** 100:31-38.

Dash HR, Das S (2012) Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. **International Biodeterioration & Biodegradation** 75:207-2013.

Debeljak M, Elteren Tvan, Spruk A, Izmer A, Vanhaecke F, Vogel-Mikus K (2018) The role of arbuscular mycorrhiza in mercury and mineral nutrient uptake in maize. **Chemosphere** 212:1076-1084.

Dermont G, Bergeron M, Mercier G, Richer-Lafèche M (2008a) Metalcontaminated soils: remediation practices and treatment technologies practice. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management** 12:188–209.

De Simone F, Artaxo P (2017) Particulate-phase mercury emissions from biomass burning and impact on resulting deposition: a modelling assessment. **Atmospheric Chemistry and Physics** 17:1881-1899.

Deyris P-A, Grison C (2018) Nature, ecology and chemistry: An unusual combination for a new green catalysis, ecocatalysis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry** 10:6-10.

Ding H, Wang G, Lou L, Lv J (2016) Physiological responses and tolerance of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) exposed to chromium. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 133:509-518.

Dixit R, Wasiullah EY, et al. (2015) Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability** 7:2189-212.

Eklöf K, Bishop K, Bertilsson S, Björn E, Buck M, Skyllberg U, Osman OA, Kronberg RM, Bravo AG (2018) Formation of mercury methylation hotspots as a consequence of forestry operations **Science of The Total Environment** 613-614: 1069-1078.

Faria MAM (2003) Mercuralismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública** 37:116-127.

Fitzgerald WF, Lamborg CH (2007) Geochemistry of Mercury in the Environment. **Treatise on Geochemistry** 1-47.

Flynn MN, Silva LCM, Louro MP, Rossi MV (2011) Processo de Bioacumulação na área estuarina de Santos e São Vicente, São Paulo. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade** 4:36-58.

Fomina M, Gadd GM (2014) Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology** 160:3-14.

Fostier AH, Forti MC, Guimarães JRD, Melfi AJ, Boulet R, Santo CME, Krug FJ (2000) Mercury fluxes in a natural forested Amazonian catchment (Serra do Navio, Amapá State, Brazil). **Science of The Total Environment** 260:201-211.

Fu XW, Zhang H, Wang X, Yu B, Lin CJ, Feng XB (2015) Observations of atmospheric mercury in China: a critical review. **Atmospheric Chemistry and Physics** 15:11925-11983.

Gibb HJ, Barchowsky A, Bellinger D, Bolger PM, Carrington C, Havelaar AH, Oberoi S, Zang Y, O'leary K, Devleeschauwer B (2018) Estimates of the 2015 global and regional disease burden from four foodborne metals – arsenic, cadmium, lead and methylmercury. **Environmental Research** 25:19.

Giovanella P, Bento F (2011) Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova** 34:232-236.

Gómez-Sagasti MT, Alkorta I, Becerril JM, Epelde L, Anza M, Garbisu C (2012) Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. **Water, Air & Soil Pollution** 223:3249-3262.

Harada M (1998) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical Reviews in Toxicology** 25:1–25.

Hazen TC (2018) Cometabolic bioremediation. In: Steffan R (Eds.) **Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: biodegradation and bioremediation, handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. New York: Springer, p. 2-12.

He F, Gao J, Pierce E, Strong PJ, Wang H, Liang L (2015) In situ remediation technologies for mercury-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research** 22:8124-8147.

Jha B, Gontia I, Hartmann A (2012) The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth promoting potential. **Plant and Soil** 356:265–277

Kabata-Pendias A, Mukherjee AB (2007) Trace elements from soil to human. New York: Springer, 519p.

Kern JK, Geier DA, Bjørklund G, King PG, Homme KG, Haley BE, Sykes LK, Geier MR (2014) Evidence supporting a link between dental amalgams and chronic illness, fatigue, depression, anxiety, and suicide. **Neuroendocrinology Letters** 35:537-552.

Kim KH, Kabir E, Jahan SA (2016) A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. **Journal of Hazardous Materials** 306:376-385.

Kodre A, Arčon I, Debeljak M, Potisek M, Likar M, Vogel-Mikuš K (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi alter Hg root uptake and ligand environment as studied by X-ray absorption fine structure. **Environmental and Experimental Botany** 133:2-23.

Kumar B, Smita K, Flores LC (2017) Plant mediated detoxification of mercury and lead. **Arabian Journal of Chemistry** 10:S2335-S2342.

Lacerda LD (2003) Updating global Hg emissions from small-scale gold mining and assessing its environmental impacts. **Environmental Geology** 43:308-314.

Lacerda LD, Malm O (2008) Mercury contamination in aquatic ecosystems: an analysis of the critical areas. **Estududos Avançados** 22:173-190.

Lacerda LD, Turcq B, Sifeddine A, Corceiro RC (2017) Mercury accumulation rates in Caço Lake, NE Brazil during the past 20.000 years. **Journal of South American Earth Sciences** 77:42-50.

Lauthartte LC, Gomes DF, Mussu MH, Holanda IBB, Almeida R, Bastos WR (2018) Potential exposure to atmospheric mercury in the occupational environment of gold shops in Porto Velho, Rondônia. **Química Nova** 41:1055-1060.

Li P, Feng XB, Qiu GL, Shang LH, Li ZG (2009) Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. **Journal of Hazardous Materials** 168:591-601.

Li X, Cai Y et al. (2019) Occurrence, fate, and transport of potentially toxic metals (PTMs) in an alkaline rhizosphere soil-plant (Maize, *Zea mays* L.) system: the role of *Bacillus subtilis*. **Environmental Science and Pollution Research** 26:5564–5576.

Limmer M, Burken J (2016) Phytovolatilization of organic contaminants. **Environmental Science & Technology** 50:6632-6643.

Ma F, Zhang Q, Xu D, Hou D, Li F, Gu Q (2014a) Mercury removal from contaminated soil by thermal treatment with FeCl₃ at reduced temperature. **Chemosphere** 117:388–393.

Mahbub KR, Bahar MDM, Labbate M, Krishnan K, Andrews S, Naidu R, Megharaj M (2017) Bioremediation of mercury: not properly exploited in contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology** 101:963-976.

Maity JP, Chen GS, Huang YH, Sun AC, Chen CY (2019) Ecofriendly heavy metal stabilization: microbial induced mineral precipitation (MIMP) and biomineralization for heavy metals within the contaminated soil by indigenous bacteria. **Geomicrobiology Journal** 1-13.

Mathema VB, Thakuri BC, Sillanpää M (2011) Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. **Archives of Microbiology** 193:837-844.

Marques M, Aguiar CRC, Silva JJLS (2011) Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 35:1-11.

Martínez-Martínez S, Zornoza R, Gabarrón M, Gómez-Garrido M, Rosales RM, Muñoz MA, Gómez-López MD, Soriano-Disla JM, Faz A, Acosta JÁ (2018) Is aided phytostabilization a suitable technique for the remediation of tailings? **European Journal of Soil Science** 1-36.

Mason RP, Fitzgerald WF, Morel FMM (1994) The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 58:3191–3198.

Meleleo D, Notaranchille G, Mangini V, Arnesano F (2019) Concentration-dependent effects of mercury and lead on A β 42: possible implications for Alzheimer's disease. **European Biophysics Journal** 48:173.

Merkl N, Schultze-Kraft R, Arias M (2006) Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Staf on microbial population an activity in petroleum-contaminated soil. **Microbiological Research** 161:80-91.

Miranda MR, Coelho-Souza SA, Guimarães JRD, Correia RRS, Oliveira D (2007) Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. **Oecologia Brasiliensis** 11:240-251.

Misra TK (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid** 25:4-16.

Mobeen N, Latif Z (2016) Characterization of mercury resistant and growth promoting *Enterobacter* sp. from rhizosphere to use as a biofertilizer. **Advancements in Life Sciences** 3:36–41

Morales-García YE, Baez A, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, Muñoz-Rojas J (2019) Bacterial mixtures, the future generation of inoculants for sustainable crop production. In.: Maheshwari D, Dheeman S (Eds) **Field crops: sustainable management by PGPR**. Switzerland: Springer, p.11-44.

Mosa KA, Saadoun I, Kumar K, Helmy M, Dhankher OP (2016) Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. **Frontiers in Plant Science** 7:1-14.

Naguib MM, El-Gendy AO, Khairalla AS (2018) Microbial diversity of *mer* operon genes and their potential roles in mercury bioremediation and resistance. **Open Biotechnology Journal** 12:56-77.

Nanini-Costa MH, Quinágua GA, Held B, Petesse ML, Esteves KF (2016) Bioaccumulation of total mercury in *Platanichthys platana* (Regan, 1917), an invasive zooplanktivorous fish in the billings complex (Upper Tietê River Basin, SP). **Boletim do Instituto de Pesca** 42:674-690.

Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxson P (2010) Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. **Atmospheric Environmental** 44:2487–2499.

Pacyna JM, Travníkov O, De SF, Hedgecock IM, Sundseth K, Pacyna EG, Steenhuisen F, Pirrone N, Munthe J, Kindbom K (2016) Current and future levels of mercury atmospheric pollution on global scale. **Atmospheric Chemistry Physics** 16: 12495–12511.

Parmar S, Singh V (2015) Phytoremediation approaches for heavy metal pollution: a review. **Journal of Plant Science & Research** 2:1-8.

Pedron F, Petruzzelli G, Barbafieri, Tassi E (2013) Remediation of a mercury-contaminated industrial soil using bioavailable contaminant stripping. **Pedosphere** 23:104-110.

Pinheiro MCN, Nakanishi J et al. (2000) Methylmercury human exposure in riverine villages of Tapajos basin, Pará State, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** 33:265-269.

Pollard KM, Hultman P, Kono DH (2010) Toxicology of autoimmune diseases. **Chemical Research in Toxicology** 23:455-466.

Purkan P, Nuzulla YF, Hadi S, Prasetyawati ET (2017) Biochemical properties of mercuric reductase from local isolate of *Bacillus* sp for bioremediation agente. **Molekul** 12:182-188.

Qian X, Wu Y, Zhou H, Xu X, Xu Z, Shang L, Qiu, G (2018) Total mercury and methylmercury accumulation in wild plants grown at wastelands composed of mine tailings: Insights into potential candidates for phytoremediation. **Environmental Pollution** 239:757-767.

Radziemska M (2018) Study of applying naturally occurring mineral sorbents of Poland (dolomite halloysite, chalcedonite) for aided phytostabilization of soil polluted with heavy metals. **Catena** 163:123-129.

Raman JK, Gnansounou E (2017) A review on bioremediation potential of vetiver grass. **Waste Bioremediation** 6:127-140.

Rock S, Pivetz B, Madalinski K, Adams N, Wilson T (2000) Introduction to phytoremediation. **USEPA EPA/600/R-99/107**.

Rohr JR, Farag AM, Cadotte MW, Clements WH, Smith JR, Ulrich CP, Woods R (2016) Transforming ecosystems: when, where, and how to restore contaminated sites. **Integrated Environmental Assessment and Management** 12:273-283.

Roseberg, R. J. 1996. Underexploited temperate industrial and fiber crops. In: J. Janick (Eds.) **Progress in new crops**. Alexandria: ASHS Press, p. 60-84.

Roulet ME, Lucotte M (1995) Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South. **Water, Air, and Soil Pollution** 80:1079-1088.

Roychowdhury R, Roy M, Zaman S, Mitra A (2019) Bioremediation potential of microbes towards heavy metal contamination. **International Journal of Research and Analytical Reviews** 6:1088-1094.

Rytuba JJ (2003) Mercury from mineral deposits and potential environmental impact. **Environmental Geology** 43:326-338.

Sapre W, Deshmukh R, Gontia-Mishra I, Tiwari S (2019) Problem of mercury toxicity in crop plants: can plant growth promoting microbes (PGPM) be an effective solution? In: In: Maheshwari D, Dheeman S (Eds) **Field crops: sustainable management by PGPR**. Switzerland: Springer, p.253-278.

Schaefer JK (2016) Biogeochemistry: Better living through Mercury (2016) **Nature Geoscience** 9:94-95.

Schaefer JK, Letowski J, Barkay T (2002) *mer* mediated resistance and volatilization of Hg(II) under anaerobic conditions. **Geomicrobiology Journal** 19:87–102

Schelert J, Dixit V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, Blum P (2004) Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. **Journal of Bacteriology** 186:427-437.

Schottel JL (1978) The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid bearing strain of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry** 253:4341-4349.

Shotyk W (2017) Biogeochemistry: Arctic plants take up mercury vapour. **Nature** 547:167-168.

Silva ARB, Guimarães GA, Costa MQ, Souza TMC (1994) A contaminação mercurial nos garimpos de ouro da Amazônia. In: Guimarães GA, Silva ARB, Dutra MS. **Contaminação mercurial: Homem versus meio ambiente nos garimpos da Amazônia**. Belém: UNAMAZ (série Cooperação Amazônia, 12), p. 51-90.

Simkiss K (1997) Biomineralization and detoxification. **Calcified Tissue Research** 24:199-200.

Singh R, Behera M, Kumar S (2019) Nano-bioremediation: An innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety** 7:165–182.

Smiechowicz J, Skoczynska A, Nieckula-szwarc A, Kulpa K, Kübler A. Occupational mercury vapour poisoning with a respiratory failure, pneumomediastinum and severe quadriparesis. **SAGE Open Medical Case Reports**, 5:2050313X17695472.

Soares JLF, Goch YGF, Peleja JRP, Forsberg BR, Lemos EJS, Sousa OP (2016) Bioacumulação de mercúrio total (Hg_t) e hábitos alimentares de peixes da bacia do Rio Negro, Amazônia, Brasil. **Biota Amazônia Open Journal System** 6:102-106.

Sotero-Martins A, Jesus MS, Lacerda M, Moreira JC, Figueira ALL, Barrocas PRG (2008) A conservative region of the mercuric reductase gene (*merA*) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:307-310.

Su C (2014) A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. **Environmental Skeptics and Critics** 3:24-38.

Sundseth K, Pacyna JM, Pacyna EG, Pirrone N, Thorne RJ (2017) Global sources and pathways of mercury in the context of human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 14:105.

Tangahu BV, Abdullah SRS, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering** 2011:1-32.

Tariq S, Amin A, Latif Z (2015) PCR based DNA fingerprinting of mercury resistant and nitrogen fixing *Pseudomonas* spp. **Pure and Applied Biology** 4:129–136

Tibiriçá LG, Lima CV, Botelho NF (2013) Garimpo do Tucano: análise ambiental de um garimpo abandonado no nordeste do Goiás. **Boletim Goiano de Geografia** 33:493-508.

UNEP (United Nations Environment Programme). Chemicals and water, global mercury assessment, Sources, emissions, releases and environmental Transport (2013) UNEP: Chemicals Branch, Geneva, Switzerland. Acesso em 07 de jun de 2018. Disponível em: <https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/11401/GlobalMercuryAssessment2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

UNEP (United Nations Environment Programme). Global mercury emissions by country and sector (2018) UNEP: Chemicals and water, global mercury assessment, Nairobi. Acesso em 07 de jun de 2018. Disponível em: https://public.tableau.com/views/GlobalMercuryEmissions/Dashboard1?:embed=y&display_count=no&showVizHome=no#1

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Treatment technologies for mercury in soil, waste and water (2007). Acesso em 01 de jun de 2019. Disponível em: <https://clu-in.org/download/remed/542r07003.pdf>.

Vassalo DV, Simões MR, Giubert K, Azevedo BF, Ribeiro Jr RF, Salaices M, Stefannon I (2019) Effects of chronic exposure to mercury on angiotensin-converting enzyme activity and oxidative stress in normotensive and hypertensive rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 112:5-9.

Verma P, George KV, Singh HV, Singh SK, Juwarkar J, Singh RN (2006) Modeling rhizofiltration: heavy-metal uptake by plant roots. **Environmental Modeling and Assessment** 11:387-394.

Vijayaraghavan K, Reddy DHK, Yun Y-S (2018). Improving the quality of runoff from green roofs through synergistic biosorption and phytoremediation techniques: A review. **Sustainable Cities and Society** 46:1-62.

Viveira LM, Alho CJR, Ferreira GAL (1995) Contaminação por mercúrio em sedimentos e moluscos do Pantanal, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 12:663-670.

Vishnoi N, Singh DP (2017) Efficiency of an industrially important crop *Hibiscus cannabinus* for phytoremediation and bioenergy production. In: Baudh K, Singh B, Korstad J (Eds) **Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants**. Singapore: Springer, p.255-268.

Wagner-Döbler I (2013) Bioremediation of mercury. Current research and industrial applications. Norfolk: Caister Scientific Press, 143p.

Wang D, Shi X, Wei S (2003) Accumulation and transformation of atmospheric mercury in soil. **Science of The Total Environment** 304:209-214, 2003.

Wang J, Feng X, Anderson CW, Xing Y, Shang L (2012) Remediation of mercury contaminated sites—a review. **Journal of Hazardous Materials** 221:1–18.

Wang J, Feng X, Anderson CWN, Zhu W, Yin R, Wang H (2011) Mercury distribution in the soil–plant–air system at the Wanshan mercury mining district in Guizhou, Southwest China. **Environmental Chemistry** 30:2725-2731.

Ward OP, Singh A (2004) Soil bioremediation and Phytoremediation – an overview. In: Singh A, Ward OP (Eds.) **Applied bioremediation and phytoremediation**. New York:Springer, p. 1-11.

Wenzel WW (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. **Plant and Soil** 321:385-408.

Windmüller CC, Durão Jr WA, Oliveira A, Valle CM (2015). The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): Implications for the mercury cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 112:201-211.

Xiao-xi Z, Jian-xin T, Pei J, Hong-wei L, Zhi-min D, Xue-duan L (2010) Isolation, characterization and extraction of *mer* gene of Hg²⁺ resisting strain D₂. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China** 20:507-512.

Xun Y, Feng L, Li Y, Dong H (2017) Mercury accumulation plant *Cyrtomium macrophyllum* and its potential for phytoremediation of mercury polluted sites. **Chemosphere** 189:161-170.

Yu Z, Li J, Li Y, Wang Q, Zhai X, Wu G, Liu P, Li X (2014) A *mer* operon confers mercury reduction in a *Staphylococcus epidermidis* strain isolated from Lanzhou reach of the Yellow River. **International Biodeterioration & Biodegradation** 90:57-63.

Zhu L, Liu J, Xu S, Xie Z (2017) Deposition behavior, risk assessment and source identification of heavy metals in reservoir sediments of Northeast China. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 142:454-463.

CAPÍTULO 2- Uso de *Hibiscus cannabinus* L. para remediar Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com diferentes concentrações de mercúrio

RESUMO - O mercúrio (Hg) é um dos metais mais tóxicos e não essencial para os organismos. Nesse estudo, foi avaliado o potencial de plantas de *Hibiscus cannabinus* (kenaf) para remediar um Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) contaminado com Hg²⁺. O LVef foi coletado na fazenda de ensino da própria instituição, na profundidade 0-0,2 m. O experimento foi conduzido em ambiente controlado, em vasos com 5 kg de solo contaminados com HgCl₂ sólido, em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos: controle positivo (sem Hg²⁺) e tratamentos com 5 mg kg⁻¹ de Hg, 24 e 36 mg kg⁻¹ de Hg²⁺, base seca, e 5 repetições. Após a contaminação, os vasos foram incubados por 60 dias. Feito isso, realizou-se o transplante das mudas de kenaf, que foram mantidas em solo contaminado com Hg por 75 dias, totalizando 135 dias de experimento. No momento do transplante das mudas, coletaram-se amostras de solo para mensuração do pH inicial e da altura das mudas. A quantificação do Hg total foi feita por espectrometria de absorção atômica. Ao final do experimento, o pH do solo foi significativamente menor (0,6 a 0,9 unidade de pH) que o pH inicial. O *H. cannabinus* em contato com o Hg não apresentou sintomas visuais de toxicidade. A altura das plantas não diferiu entre tratamentos, mas a fitomassa seca da parte aérea foi maior em 21,65% no controle do que a média dos tratamentos com Hg. O tratamento com 24 mg kg⁻¹ de Hg apresentou fitomassa seca da raiz maior que os demais. De modo geral, o LVef foi responsável por reter maior concentração do Hg do que as plantas. O Hg acumulou-se em maior proporção nas raízes do que na parte aérea, sendo maior o acúmulo com aumento da dose de Hg. A planta que recebeu a dose de 36 mg kg⁻¹ Hg acumulou 2,57 mg kg⁻¹ de Hg/vaso, diferindo dos demais tratamentos. Concluiu-se que o LVef adsorveu maior concentração de Hg do que as plantas. O *H. cannabinus* apresentou resistência a diferentes concentrações de Hg no solo e pode ser considerado como planta potencial estabilizadora de Hg²⁺, pois acumulou mais Hg nas raízes do que na parte aérea.

Palavras-chave: Contaminação, metais potencialmente tóxicos, remediação, solo

CHAPTER 2- The use of *Hibiscus cannabinus* L. for phytoremediation of oxisol with different mercury concentrations

ABSTRACT – Mercury (Hg) is one of the most toxic metals and it is not essential for any organisms. In this study, the potential of *Hibiscus cannabinus* (kenaf) to remedy a Hg^{2+} contaminated Oxisol was evaluated. The soil was collected at the institution's own teaching farm at the depth 0-0,2 m. The experiment was conducted in a controlled environment, with 5 kg of an oOisol contaminated with solid HgCl_2 , in a completely randomized design with 4 treatments: positive control (without Hg^{2+}) and treatments with $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}$, $24 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$, and $36 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$, dry basis, and 5 repetitions. After contamination, the pots were incubated for 60 days. After that, enaf seedlings were transplanted to the pots and kept in the soil contaminated with Hg for 75 days, totaling 135 experimentation days. At the time of seedling transplantation, soil samples were collected for the initial measurement of pH seedling height. Total Hg quantification was carried out by atomic and quantified absorption spectrometry. At the end of the experiment, the soil pH was lower (0,6 to 0,9 pH unit) than the initial pH. *H. cannabinus* showed no visual symptoms of Hg toxicity. Plant height did not differ between treatments, however, the control shoot dry matter was higher by 21,65% when compared to the mean of the other treatments. The treatment 24 mg kg^{-1} of Hg presented larger dry root phytomass than the others. In general, the Oxisol was responsible for retaining higher Hg concentration than the plants. Hg accumulated in greater proportion in the roots as compared to the shoot and was higher when the rate of Hg increased. Plants that received $36 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}$ accumulated $2,57 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg /pot}$, differing from other treatments. It was concluded that soil adsorbed higher Hg than the plants. *H. cannabinus* showed resistance to different levels of Hg in the soil and can be considered as a potential Hg^{2+} stabilizing plant because it accumulates higher Hg concentration in the roots than the shoot.

Keywords: Bacteria, contamination, remediation, potentially toxic metal, soil

1. Introdução

As intensificações da urbanização, da modernização e dos processos industriais, têm contribuído de forma significativa para o aumento da poluição ambiental que afeta negativamente na qualidade dos ecossistemas e na qualidade de vida dos seres humanos (Singh et al., 2019).

Por essa razão, têm aumentado a procura por tecnologias verdes para recuperação de áreas contaminadas por diversos contaminantes, por serem métodos funcionais, sustentáveis e menos onerosos.

A fitorremediação é uma técnica que utiliza o potencial natural de cada planta para remediar a presença de metais potencialmente tóxicos no solo, além de apresentar baixo custo de aplicação e ser um método ambientalmente correto (Yan et al., 2019).

O *Hibiscus cannabinus* (kenaf) é uma planta anual, de interesse econômico, com altura que varia de 2,5m a 6m e possui raízes extensas e profundas o que lhe confere tolerância a seca e possui alta densidade de cultivo com até 220.000,00 plantas por hectare (Kaldor, 1989; Alexopoulou et al., 2007; Asim et al., 2018).

Essa planta tem sido estudada como potencial remediadora de metais potencialmente tóxicos como cádmio, chumbo, cromo, mercúrio, entre outros contaminantes (Catroga et al, 2005; Bada e Kalejaiye, 2010; Abioye et al., 2012; Chen et al., 2017; Fitria e Dhokhikah, 2019). Ela é capaz de acumular os metais nas raízes e tecidos. O efeito fitorremediador do kenaf pode ser favorecido com a associação de bactérias promotoras de crescimento e que sejam resistentes à presença de metais potencialmente tóxicos (Chen et al., 2017).

Sabe-se que muitas plantas e bactérias são capazes de sobreviver em solos contaminados com diversos metais potencialmente tóxicos. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a capacidade de remediação de plantas em solo contaminado com mercúrio.

Tendo em vista a necessidade de recuperação de áreas contaminadas para minimizar os impactos ambientais, avaliou-se o efeito remediador do kenaf mantido em LVEf contaminado com HgCl_2 em diferentes concentrações de Hg^{2+} , quantificando o teor de Hg total acumulado nas raízes e parte aérea (folhas e caule)

2. Material e métodos

2.1. Preparo do solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com Latossolo Vermelho eutroférico (LVef), argiloso (argila = 556 g kg⁻¹, silte = 381 g kg⁻¹ e areia = 63 g kg⁻¹ dados não publicados de Silva, 2019), sem histórico de contaminação por Hg, coletado na camada 0-0,20 m na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unesp, campus de Jaboticabal, São Paulo. Os Latossolos são a classe de solo mais predominantes no Brasil (Lima et al., 2019a).

O solo foi seco ao ar e à sombra, passado por peneira com abertura de 2 mm e uma amostra do material foi encaminhada à análise química que apresentou os resultados: pH (CaCl₂)= 5,8, matéria orgânica= 24 g dm⁻³, fósforo= 27 mg dm⁻³, enxofre= 6 mg dm⁻³, cálcio= 36 mmol_c dm⁻³, magnésio= 14 mmol_c dm⁻³, potássio= 8,1 mmol_c dm⁻³, alumínio= 1 mmol_c dm⁻³, acidez potencial (H+Al)= 23 mmol_c dm⁻³, capacidade de troca catiônica (CTC)= 81 mmol_c dm⁻³, saturação por base= 72%, boro = 0,28 mg dm⁻³, cobre= 8,5 mg dm⁻³, ferro= 26 mg dm⁻³, manganês= 31,1 mg dm⁻³, zinco= 5,9 mg dm⁻³ e Hg total= 0,099 mg kg⁻¹. O fósforo e a matéria orgânica foram determinados por espectrofotometria e o enxofre por turbidimetria. Os demais elementos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o Hg total absorção atômica no DMA-80.

O volume de 5 kg de solo foi acondicionado em vasos, seguido da contaminação com solução de HgCl₂, homogeneizado manualmente e incubado por 60 dias. Durante todo o experimento foi utilizada água deionizada na proporção de 70% da capacidade de campo do solo.

Após a contaminação foi realizada a fertilização do solo (Tabela 2.1), conforme proposto por Melo et al. (1998). O teor de Hg total dos fertilizantes empregados no experimento foi de 0,38 mg kg⁻¹ no sulfato de amônio, 0,056 mg kg⁻¹ para superfosfato simples e 0,008 mg kg⁻¹ para cloreto de potássio.

Tabela 2.1. Fertilização mineral em todos os tratamentos.

Fertilizante	por vaso	Semeadura	20 dias	40 dias
Sulfato de amônio (g)	10	2	4	4
Superfosfato Simples (g)	34	10	12	12
Cloreto de Potássio (g)	4	1	1,50	1,50
Solução C (mL)	27	27	--	--
Solução D (mL)	9	9	--	--

Solução C: 0,96 g H_3BO_3 , 1,97 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 7,33 g $ZnSO_4$, 3,08 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,09 g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$. Completar a 1000 mL. Solução D: 24,98 g $FeSO_4$, 33,20 g EDTA, 80 mL NaOH 1 mol L^{-1} . Completar a 1000 mL. Agitar 1 noite no escuro.

2.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 5 cinco repetições, sendo: T1: controle positivo, sem adição de Hg, T2: adição de 5 $mg\ kg^{-1}$ de Hg^{2+} , T3: adição de 24 $mg\ kg^{-1}$ e T4: adição de 36 $mg\ kg^{-1}$. Para todas as concentrações, a massa de solo foi considerada na base seca e o Hg^{2+} foi adicionado na forma de $HgCl_2$. A maior dose foi estabelecida em cima do valor orientador residencial para Hg no solo de acordo com a resolução nº 420, de 2009 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). As demais doses foram intermediárias.

2.3. Transplante e manejo do *Hibiscus cannabinus*

As mudas foram adquiridas em viveiro comercial, localizado em Ibitinga, SP e transplantadas para os vasos no 60º dia após a incubação dos mesmos e após, realizada a coleta de amostras de solo para mensuração do pH no início do experimento. O tamanho das plantas foi mensurado no momento do transplante e no final do experimento. As plantas de kenaf foram mantidas nos vasos até 75 dias depois do transplante (Figura 2.1).



Figura 2.1. *Hibiscus cannabinus* mantido em Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com diferentes doses de mercúrio Hg^{2+} .

2.4. Coleta de raízes, parte aérea das plantas de *Hibiscus cannabinus* e solo no final do experimento

As coletas de raízes, parte aérea (PA) e solo foram realizadas 75 dias após o transplante das mudas. No preparo das raízes, todo o solo aderido às mesmas foi cuidadosamente removido e lavadas com solução aquosa de detergente neutro (1 mL L^{-1}), água corrente, água destilada e água deionizada.

O mesmo procedimento foi realizado para a parte aérea das plantas de kenaf. As amostras foram secas em estufa a $67 \text{ }^\circ\text{C}$ com circulação forçada de ar até obtenção de massa constante, pesadas para obtenção de fitomassa seca, moídas em moinho tipo Willey com peneira de 40 mesh e armazenadas em sacos plásticos.

Os 5 kg de solo de cada vaso foram passados por peneira com 2 mm de diâmetro de malha. Por quarteamento manual foi retirado 1 kg de cada amostra, que foi encaminhado para o Instituto de Química na Unicamp, SP para quantificação do Hg total e avaliação do pH encontrado no final do experimento.

2.5. Quantificação de mercúrio total nas amostras de solo e planta

A quantificação do Hg total de todas as amostras foi realizada no Instituto de Química da Unicamp, SP. Todas as amostras foram trituradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido para obtenção de material mais homogêneo e, portanto, uma melhor precisão analítica.

A quantificação do mercúrio total nas amostras sólidas foi realizada usando o equipamento Direct Mercury Analyzer® (DMA-80 TRICELL; Milestone Inc., Itália). Este método combina a combustão de amostras (para redução térmica de Hg e vaporização) com espectrometria de absorção atômica (Melendez-Perez e Fostier, 2013).

Duas curvas analíticas foram construídas nas faixas lineares de 0,2 a 10 ng de Hg e 150 a 1.000 ng de Hg (Figura 2.2). Para tanto, soluções padrão de Hg (10, 100 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas, diluindo-se solução padrão de Hg ($1.000 \pm 0,003 \text{ mg mL}^{-1}$, Tec-Lab® Hexis, Jundiaí, Brasil) em água deionizada com 10% de HNO_3 subdestilado.

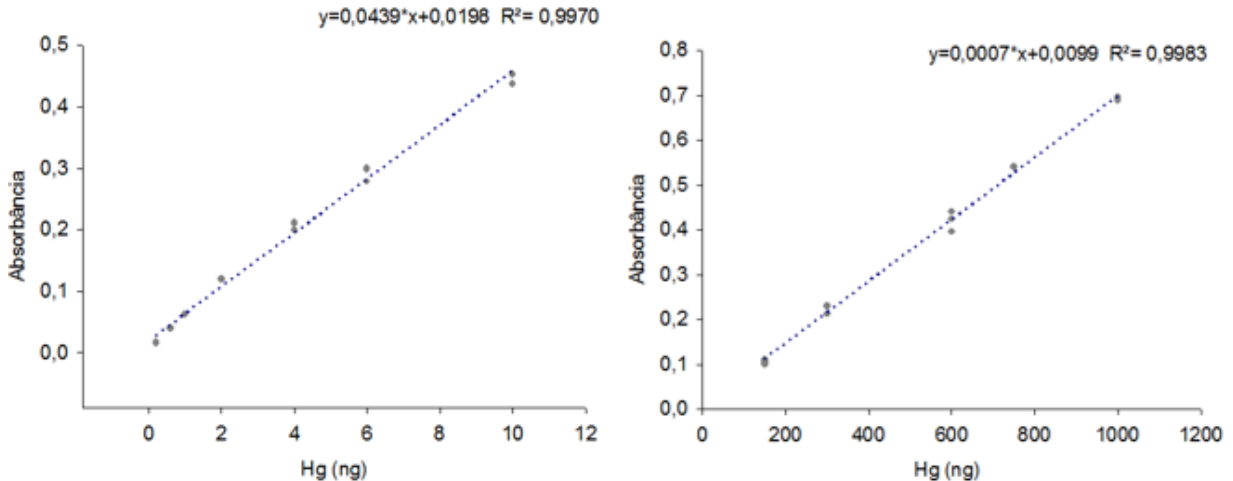


Figura 2.2. Curvas analíticas de calibração.

Os parâmetros de validação do método analítico incluíram linearidade e limite de quantificação (LOQ). A precisão foi verificada diariamente pela análise de materiais de referência padrão de folhas de tomate (SRM NIST 1573) e solo (solo de Montana SRM NIST 2711). A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo de todas as

réplicas analíticas do SRM. Cada amostra experimental também foi analisada em duplicata.

Para cada réplica, uma massa de amostra entre 10 e 200 mg foi analisada, dependendo da concentração esperada, totalizando 120 amostras analisadas.

Os excedentes de todas as amostras não utilizadas foram devidamente armazenados em recipientes fornecidos pela FCAV/Unesp. A água utilizada para lavagem das raízes bem como os materiais, e meios de cultura contaminados foram armazenados e coletados para devido descarte por empresa própria contratada pela instituição.

2.6. Validação do método analítico

Os coeficientes de correlação para as curvas de calibração de 0,2 a 10 ng e 150 a 1000 ng foram 0,9941 e 0,9966, respectivamente. Os percentuais de recuperação para amostras de referência padrão de solo e folhas foram de 105 e 106%, respectivamente. A precisão do material de referência padrão (19 e 9 replicações analíticas realizadas no solo e folha, respectivamente) foi inferior a 4%. O coeficiente de variação para as amostras analisadas em duplicata foi <10%.

2.7. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística no programa AgroEstat (2015), com aplicação do teste de Duncan para comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Influência das condições de cultivo no pH do solo e nas variáveis de crescimento do *Hibiscus cannabinus*

Em relação ao pH do solo, não houve diferença entre os tratamentos no mesmo período de avaliação, mas o pH final foi significativamente menor (0,6 a 0,9 unidade de pH) que o pH no início do experimento (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Valores de pH em CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ do solo do experimento do cultivo de *Hibiscus cannabinus* em diferentes doses de mercúrio.

Tratamentos mg kg ⁻¹ de Hg ²⁺	pH inicial	pH final
0	5,3aA	4,7bA
Desvio padrão	0,13	0,14
CV(%)	2,41	2,95
5	5,4aA	4,5bA
Desvio padrão	0,06	0,11
CV(%)	1,12	2,52
24	5,4aA	4,5bA
Desvio padrão	0,07	0,17
CV(%)	1,21	3,82
36	5,3aA	4,5bA
Desvio padrão	0,06	0,04
CV(%)	1,08	0,81

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

A altura entre tratamentos das plantas de kenaf no mesmo período de avaliação, não diferiu entre si. No entanto, 75 dias após o transplante das mudas, as plantas apresentaram tamanho final significativamente maior (1,57 a 2,05 m) que o tamanho no início do experimento (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Altura das plantas de *Hibiscus cannabinus* no início e final do experimento.

Tratamentos mg kg ⁻¹ de Hg ²⁺	Altura inicial	Altura final
	-----m-----	
0	0,58bA	2,19aA
Desvio padrão	21,98	0,23
CV(%)	37,77	10,33
5	0,57bA	2,18aA
Desvio padrão	7,64	0,24
CV(%)	13,49	10,77
24	0,60bA	2,17aA
Desvio padrão	20,72	0,25
CV(%)	34,54	11,63
36	0,51bA	2,56aA
Desvio padrão	23,53	0,32
CV(%)	46,13	12,48

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Embora a altura das plantas ao final do experimento não tenha diferido entre tratamentos, a fitomassa seca da parte aérea (PA) no tratamento sem contaminação, foi estatisticamente maior, em 21,62% do que a média dos tratamentos com diferentes doses de Hg²⁺ (Tabela 2.4), evidenciando efeito do metal no peso médio do caule, que foi estatisticamente maior no tratamento controle (122 g no controle, 83 g no tratamento com 5 mg kg⁻¹ de Hg, 78 g e 92 g nos tratamentos com 24 e 36 mg kg⁻¹ de Hg, respectivamente), uma vez que o peso médio das folhas (97 a 103 g) não apresentou diferença entre tratamentos.

A média da fitomassa seca da raiz de kenaf variou entre 16 a 21g e diferiu no tratamento que recebeu a dose de 24 mg kg⁻¹ de Hg comparado com o tratamento controle e no que recebeu a dose de 5 mg kg⁻¹ de Hg, mas não diferiu do tratamento com 36 mg kg⁻¹ de Hg (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Média da fitomassa seca das plantas de *Hibiscus cannabinus* final do experimento.

Tratamentos mg kg ⁻¹ de Hg ²⁺	Fitomassa seca raiz	Fitomassa seca parte aérea
	-----g-----	
0	16b	225a
Desvio padrão	4,18	10,61
CV(%)	26,15	4,71
5	16b	179b
Desvio padrão	4,18	11,40
CV(%)	26,15	6,37
24	21a	180b
Desvio padrão	2,24	6,12
CV(%)	10,65	3,40
36	18ab	19b
Desvio padrão	2,45	15,49
CV(%)	13,61	7,94

As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As raízes do kenaf que tiveram contato com Hg, não apresentaram diferença visual de tamanho. No entanto, quando comparado com o tratamento controle positivo (sem adição de Hg) e tratamento com 5 mg kg⁻¹ de Hg²⁺, os tratamentos com as maiores doses de Hg (24 e 36 mg kg⁻¹ de Hg²⁺) apresentaram raízes nodulares mais espessas (Figura 2.3).

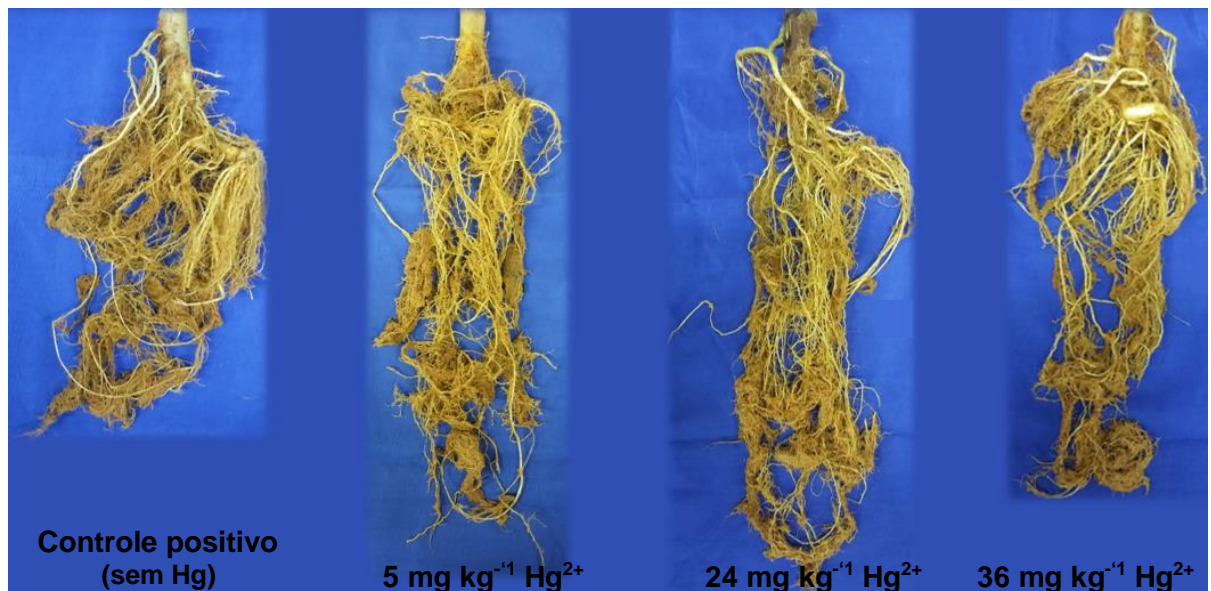


Figura 2.3. Raízes de *Hibiscus cannabinus* mantidas em Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com diferentes doses de mercúrio Hg²⁺.

3.2. Concentrações de mercúrio total no solo e mercúrio total acumulado na fitomassa seca da raiz e parte aérea do *Hibiscus cannabinus*

Após 60 dias da contaminação dos vasos de acordo com cada tratamento, as concentrações de Hg total encontradas no solo no momento do transplante das mudas de kenaf apresentaram resultados dentro do esperado (Tabela 2.5), pois, perdas por volatilização foram consideradas.

Observou-se que no tratamento controle, que não foi adicionado o metal, houve deposição de Hg atmosférico oriundo da volatilização dos tratamentos contaminados. Nota-se, também que, houve adequada homogeneização do solo contaminado com solução de HgCl₂ (CV ≤ 20%) (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Média das concentrações de mercúrio total no Latossolo Vermelho eutroférico esperada no início do plantio e a encontrada.

Tratamentos	[Hg]	[Hg]	Desvio padrão	CV	Recuperação
	esperado no solo	encontrado no solo			
mg kg ⁻¹ de Hg ²⁺	início				
	-----mg kg ⁻¹ -----				-----%-----
0	0,1	1,37	0,29	21,40	1370
5	5,1	5,33	0,99	18,47	107
24	24,1	26,39	5,75	21,77	110
36	36,1	41,99	4,84	11,53	117

Aos 75 dias, após o transplante das mudas de kenaf, a concentração de Hg total no solo variou entre 0,13 a 21,23 mg kg⁻¹ de Hg e diferiu entre os tratamentos que receberam 24 e 36 mg kg⁻¹ de Hg (Tabela 2.6). O acúmulo de Hg total encontrado na fitomassa seca da raiz da planta de kenaf foi significativamente maior no tratamento contaminado com a dose de 36 mg kg⁻¹ de Hg e o acúmulo do metal na fitomassa seca das raízes variou de 0,03 a 2,52. No que tange à fitomassa seca da parte aérea, o acúmulo de Hg total foi de 0,008 a 0,05 e foi maior na dose que recebeu 36 mg kg⁻¹ de Hg (Tabela 2.6), indicando tendência do metal em acumular nas raízes.

Tabela 2.6. Concentração de Hg total no Latossolo Vermelho eutroférico no final do experimento e acúmulo de Hg na fitomassa seca de raiz e parte aérea.

Tratamentos	[Hg] solo final	Hg acumulado na fitomassa seca raiz	Hg acumulado na fitomassa seca parte aérea	Hg total na planta (raiz+PA)
mg kg ⁻¹ de Hg ²⁺	mg kg ⁻¹	-----mg kg ⁻¹ /vaso-----		mg kg ⁻¹ / vaso
0	0,13c	0,003b	0,008b	0,01b
Desvio padrão	0,01	0,01	0,001	0,001
CV(%)	7,91	24,79	10,04	6,48
5	0,84c	0,007b	0,008b	0,01b
Desvio padrão	0,16	0,003	0,001	0,003
CV(%)	19,06	40,75	16,84	25,48
24	8,61b	0,27b	0,01b	0,28b
Desvio padrão	0,96	0,09	0,004	0,09
CV(%)	11,10	31,81	31	30,93
36	21,23a	2,52a	0,05a	2,57a
Desvio padrão	1,72	0,69	0,02	0,71
CV(%)	8,09	21,42	35,84	27,48

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

No controle positivo (não contaminado) e no tratamento de 5 mg kg⁻¹ de Hg, a principal parte do Hg inicialmente presente no solo foi removida ao final do experimento (Tabela 2.5 e 2.6), mas, apenas uma pequena parte do metal foi acumulada na fitomassa da planta (raiz e parte aérea). Apenas o tratamento de 36 mg kg⁻¹ diferiu dos demais, com maior acúmulo do Hg total na fitomassa seca da planta (Tabela 2.6).

No que tange ao grau de associação linear entre as variáveis, que pode variar de -1 a 1 (Bussab e Morettin, 2017), a concentração (mg kg⁻¹) de Hg no solo apresentou alta correlação ($p < 0,01$) com o Hg acumulado na fitomassa seca da raiz e com o acumulado na fitomassa seca de PA, assim como o acúmulo de Hg da raiz e da PA apresentaram alta correlação. A altura das plantas de kenaf ao final do experimento também se correlacionaram com as concentrações de Hg no solo. Os demais valores de correlação foram baixos e não significativos (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Correlação das variáveis das plantas de *Hibiscus cannabinus*.

	pH solo final	Fitomassa raiz	Fitomassa PA	Acúmulo Hg fitomassa seca de raiz	Acúmulo Hg fitomassa seca de PA	Altura planta
[Hg] solo final	-0,24 ^{NS}	0,22 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	0,89 ^{**}	0,85 ^{**}	0,51 [*]
Acúmulo Hg fitomassa seca de raiz	-0,12 ^{NS}	0,15 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	—	0,93 ^{**}	0,43 ^{NS}
Acúmulo Hg fitomassa seca de PA	-0,17 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,93 ^{**}	—	0,34 ^{NS}

NS= não significativa; (*) = significância a 5% de probabilidade; (**) =significância a 1% de probabilidade.

4. Discussão

A redução do pH e conseqüente acidificação do solo no final do experimento é decorrente ao processo de mineralização do sulfato de amônio adicionado para fertilização mineral, remoção das bases pela planta, liberação de exsudatos e ação das micorrizas.

A biodisponibilidade, toxicidade e solubilidade dos metais potencialmente tóxicos, assim como dos nutrientes, são diretamente influenciados pelo pH do meio, que também interfere na atividade das bactérias que atuam na biorremediação do Hg (Kannan e Krishnamoorthy, 2006; Sinha et al., 2013; Lima et al., 2019b).

A adsorção máxima do Hg^{2+} no solo com predomínio de caulinita e de gibbsita é favorecida entre pH 4,4 e 4,5 respectivamente (Sarkar et al., 1999, Sarkar et al., 2000), semelhante ao pH obtido no presente estudo. Em contrapartida, Lima et al. (2019a) indicam adsorção em Latossolo com grupo de minerais 1:1, em pH médio de 5,7. Em nosso estudo, essa faixa de pH (4,4 a 5,7) favoreceu a adsorção do metal no solo, no início e final do experimento, tornando-o menos disponível para a planta e conseqüentemente, influenciando no teor de Hg acumulado nas raízes e parte aérea.

Coloides minerais e orgânicos apresentam forte relação com a retenção de Hg no solo em função das cargas negativas. O Hg apresenta afinidade com óxidos de Fe e Al (Durão Jr. et al., 2009) e por isso os Latossolos atuam fortemente no processo de adsorção e complexação do Hg, pois são ricos em óxidos de Fe (Harris-Hellal et al., 2011), o que pode ter influenciado na remoção do metal do L_{vef} pelas plantas no presente estudo.

Em solos tropicais, a adsorção de Hg é principalmente influenciada pelo teor de matéria orgânica do solo em decorrência da afinidade com grupos tiol (-SH) (Palmieri et al., 2006; Valle et al., 2006; Leterme e Jacques, 2015, Lima et al., 2019a).

Outro fator importante que interfere na disponibilidade do Hg no solo é a textura. Solos com partículas mais finas tendem a acumular mais Hg, pois há predomínio da fração argila (Xu et al., 2014; Soares et al., 2015). O solo do presente estudo é argiloso, o que favoreceu a adsorção do metal nos tratamentos que receberam doses de Hg (Backstrom et al., 2003).

Perdas por volatilização podem ser decorrentes de processos abióticos, como temperatura, temperatura do solo, umidade do ar, radiação solar, e bióticos, como por exemplo, ação dos microrganismos e por parâmetros físico-químicos do solo (Magarelli e Fostier, 2005; Windmöller et al., 2015; Lima et al., 2019a).

Fatores ambientais como a radiação solar, nas diferentes estações do ano podem aumentar a emissão de Hg para atmosfera (Choi e Holsen, 2009; Carpi et al., 2014).

A temperatura favorece perdas por volatilização. Somado a isso, o aumento da temperatura estimula a atividade microbiana que favorece o processo de volatilização do metal, pois bactérias que possuem o gene *merA* atuam na redução do Hg^{2+} para Hg^0 (Windmöller et al., 2015; Lima et al., 2019b).

A redução da fitomassa seca da parte aérea obtida no final do experimento dos tratamentos com Hg se relaciona com danos no formato celular causados por toxicidade ao metal. A exposição a altas concentrações de Hg também reduz os espaços intracelulares, do feixe vascular, quantidade de cloroplastos e clorofila, que interferem na fisiologia vegetal e comprometem a fotossíntese, que pode acarretar a morte do tecido foliar (Rellán-Álvarez et al., 2006; Chen et al., 2009, Rodrigues et al., 2016, Ahammad et al., 2018).

Em contrapartida, a fitomassa seca da raiz dos tratamentos com Hg não apresentou efeitos negativos. Esse resultado pode ser atribuído ao efeito de estimulação do crescimento pela presença de contaminantes (hormese), mesmo que em baixa quantidade (Poschenrieder et al., 2013).

No entanto, nenhum sintoma visual de toxicidade por Hg foi observado durante o experimento. A literatura relata resistência de plantas de kenaf a outros metais, como cádmio, chumbo, cobre e zinco. Por completar seu ciclo mesmo em condições de estresse ambiental, o kenaf pode ser considerado potencial fitorremediador de solo, e por apresentar diversidade microbiana nas raízes, a simbiose entre planta e microrganismos beneficia o processo de remediação (Santos et al., 2010; Arbaoui et al., 2013; Chen et al., 2018c).

As plantas de kenaf acumularam mais Hg nas raízes do que na parte aérea, o que é característico de plantas não hiperacumuladoras (Santo et al., 2010), caracterizando-as como potencial planta estabilizadora de Hg. Resultados

semelhantes foram obtidos por Chang et al. (2018). Os autores encontraram acúmulo de Hg nas raízes de tabaco três vezes maior do que na parte aérea das plantas, e identificaram que, uma vez na raiz, o Hg tende a acumular nos vacúolos, e deste modo, a toxicidade do metal na membrana celular e demais organelas é reduzida.

Em uma área de mineração de ouro, Qian et al. (2018) identificaram maior acúmulo de Hg total (média de $13 \mu\text{g g}^{-1}$) nas raízes de grama (*Arthraxon hispidus*) do que na parte aérea (média de $70 \mu\text{g g}^{-1}$) e por essa razão foi considerada como potencial planta estabilizadora do metal, assim como o kenaf do presente estudo.

A planta possui diversos mecanismos de defesa para sobreviver em ambientes contaminados com metais potencialmente tóxicos. A endoderme das raízes pode atuar como barreira para proteger seus tecidos internos, tendo sua espessura aumentada. A parede do xilema pode aumentar com intuito de adsorver os contaminantes, e, logo, diminuir a translocação dos metais para a parte aérea das plantas (Gomes et al., 2011; DalCorso et al., 2013).

Embora o metal tenha tendência para acumular nas raízes das plantas, ainda pouco se sabe sobre a mobilidade e distribuição do Hg nas plantas, principalmente pelo fato dos relatos na literatura terem sido feitos em condições controladas de exposição ao metal (Carrasco-Gil et al., 2011).

Em estudo realizado por Lima et al. (2019a), 6 plantas de feijão e 6 plantas de aveia mantidas por 30 dias em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com 5 mg kg^{-1} de Hg^{2+} , 20, 40 e 80 mg kg^{-1} Hg^{2+} acumularam na parte aérea do feijão 0,005, 0,001, 0,08 e 0,09 mg de Hg^{2+} por vaso, respectivamente, e 0,001, 0,004, 0,005 e 0,02 mg kg^{-1} de Hg^{2+} por vaso, respectivamente, na parte aérea das plantas de aveia. Esses valores foram semelhantes ao encontrado no nosso estudo. Cada espécie vegetal é capaz de acumular concentrações diferentes do metal, visto as distintas características fisiológicas das plantas (Patra e Sharma, 2000)

A translocação do Hg para a parte aérea depende de fatores como espécie química do metal, espécie da planta, teor do metal no solo e estação do ano (Adriano, 2001; Molina et al., 2006). No entanto, parte do Hg encontrado nas folhas e caule do presente trabalho, pode também ter sua origem na deposição de Hg^0 presente na atmosfera em volta das plantas, em consequência da sua redução no solo contaminado e consequente emissão, como obtido por Assad et al. (2016). Os autores

identificaram que o Hg encontrado nas folhas de *Populus* foi exclusivamente decorrente da deposição foliar do Hg atmosférico. Uma vez translocado para a parte aérea, o metal pode também ser volatilizado e eliminado das plantas para a atmosfera devido a mecanismos de volatilização que algumas espécies vegetais possuem (Tangahu et al., 2011) e então, ser novamente depositado no solo e nas plantas.

Diante do exposto, a adsorção do Hg no solo, perdas por volatilização e proporção de acúmulo do metal nas raízes e na parte aérea das plantas podem variar de um local para o outro devido às características intrínsecas de cada região e de cada espécie vegetal.

5. Conclusão

O Latossolo Vermelho eutroférico utilizado, devido a suas características químicas, foi responsável pela maior retenção do mercúrio do que as plantas. Perdas por volatilização do Hg também foram consideradas.

As plantas de kenaf apresentaram tolerância as diferentes concentrações de Hg^{2+} analisadas sem apresentar sintomas visuais de toxicidade.

O kenaf foi capaz de acumular maior proporção do metal nas raízes do que na parte aérea da planta. Por esta razão, o kenaf pode ser considerado como planta potencial estabilizador de Hg^{2+} .

No entanto, por ser uma planta ainda pouco estudada para essa finalidade, são necessários estudos complementares para avaliar o comportamento a campo e seu efeito em grandes áreas contaminadas.

Referências

Abioye OP, Agamuthu P, Aziz ARA (2012) Phytotreatment of soil contaminated with used lubricating oil using *Hibiscus cannabinus*. **Biodegradation** 23:277-286.

Adriano DC (2001) Trace elements in terrestrial environments – Biogeochemistry, bioavailability and risk of metals, second ed. Springer, New York.

Ahammad SJ, Sumithra S, Senthilkumar P (2018) Mercury uptake and translocation by indigenous plants. **Rasayan Journal of Chemistry** 11:1-12.

Alexopoulou E, Consentino SL et al. (2007) Kenaf Booklet. Prepared in the framework of the Biokenaf project. Acesso em 27 de ago de 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/293334134_Kenaf_Booklet_Prepared_in_the_framework_of_the_BIOKENAF_project_QLK5_CT2001_01729

Arbaoui S, Evlard A, Mhamdi MEW, Campanella B, Paul R, Bettaieb (2013) Potential of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and corn (*Zea mays* L.) for phytoremediation of dredging sludge contaminated by trace metals. **Biodegradation** 24:563-567.

Asim M, Paridah MT, Jawaid M, Nasir M, Saba N (2018) Physical and flammability properties of kenaf and pineapple leaf fibre hybrid composites. **Materials Science and Engineering** 368:1-10.

Assad M, Parelle J, Cazaux D, Gimbert F, Chalot M, Tatin-Froux F (2016) Mercury uptake into poplar leaves. **Chemosphere** 146:1-7.

Bada BS, Kalejaiye ST (2010) Response of kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) grown in different soil textures and lead concentrations. **Journal of Agriculture and Biological Sciences** 6:659-664.

Backstrom M, Dario M, Karlsson S, Allard B (2003) Effects of fulvic acid on the adsorption of mercury and cadmium on goethite. **Science of the Total Environment** 304:257-268.

Bussab WO, Morettin PA (Eds.) (2017) Estatística básica. São Paulo: Saraiva, 548p.

Carpi A, Fostier AH, Orta OR, Santos JC, Gittings M (2014) Gaseous mercury emissions from soil following forest loss and land use changes: Field experiments in the United States and Brazil. **Atmospheric Environment** 96:423-429.

Carrasco-Gil S, Álvarez-Fernández A, Sobrino-Plata J, Millán R, Carpena-Ruiz RO, Leduc DL, Andrews JC, Abadía J, Hernández LE (2011) Complexation of Hg with phytochelatins is important for plant Hg tolerance. **Plant, Cell & Environment** 34:778-791.

Catroga A, Fernando A, Oliveira JS (2005) Effects on growth, productivity and biomass quality of kenaf of soils contaminated with heavy metals. In: EUROPEAN BIOMASS CONFERENCE & EXHIBITION. Paris: p. 149–152.

Chang S, Wu Z, Sun W, Lin F, Zhang J, Zeng Q, Qiao L, Shu H (2018) Mercury distribution in tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell. **Advances in Bioscience and Biotechnology** 9:127-135.

Chen J, Shiyab S, Han FX, Monts DL, Waggoner CA, Yang Z, Su Y (2009) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. **Ecotoxicology** 18:110-121.

Chen Y, Ding Q, Chao Y, Wei X, Wang S, Qiu R (2018c) Structural development and assembly patterns of the root-associated microbiomes during phytoremediation. **Science of The Total Environment** 644:1591-1601.

Chen Y, Yang W, Chao Y, Wang S, Tang YT, Qiu RL (2017) Metal-tolerant *Enterobacter* sp. strain EG16 enhanced phytoremediation using *Hibiscus cannabinus* via siderophore-mediated plant growth promotion under metal contamination. **Plant and Soil** 413:203-216.

Choi HD, Holsen TM (2009) Gaseous mercury fluxes from the forest floor of the Adirondacks. **Environmental Pollution** 157:592-600.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução Nº 420, de 28 de dezembro de 2009 (2009). Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>.

DalCorso G, Manara A, Furini A (2013) An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. **Metallomics** 5:1117–1132

Durão Jr. WA, Palmiere HEL, Trindade MC, Branco OEA, Carvalho Filho CA, Fleming PM, Silva JBB, Windmüller CC (2009) Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Environmental Monitoring** 11:1056-1063.

Fitria FL, Dhokhikah Y (2019) Removal of chromium from batik wastewater by using kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) with bed evapotranspiration. **Earth and Environmental Science** 243:1-5.

Gomes MP, Marques TCLLSM, Nogueira MOG, Silva GH, Castro EM, Soares AM (2011). Effects of tailings from zinc industry in the anatomy and growth of young plants of *Salix humboldtiana* Willd. (willow). **Hoehnea** 38:135-142.

Harris-Hellal J, Grimaldi M, Garnier-Zarli E, Bousserhine N (2011) Mercury mobilization by chemical and microbial iron oxide reduction in soils of French Guyana. **Biogeochemistry** 103:223-234.

Kaldor AF (1989) Preparation of kenaf bark and core fibres for pulping by the Annkel method. **Tappi Journal** 72:137-140.

Kannan SK, Krishnamoorthy R (2006) Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury — A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. **Science of the Total Environment** 367:341-353.

Leterme B, Jacques D (2015) A reactive transport model for mercury fate in contaminated soil—sensitivity analysis. **Environmental Science of Pollution Research** 22:16830-16842.

Lima FRD, Engelhardt MM, Vasques ICF, Martins GC, Cândido GS, Pereira P, Reis RHCL, Silva AO, Guilherme LRG, Marque JJ (2019a) Evaluation of mercury phytoavailability in Oxisols. **Environmental Science and Pollution Research** 26:483-491.

Lima FRD, Martins GC et al. (2019b) Critical mercury concentration in tropical soils: Impact on plants and soil biological attributes. **Science of The Total Environment** 666:472-479.

Magarelli G, Fostier AH (2005) Influence of deforestation on the mercury air/soil exchange in the Negro River Basin, Amazon. **Atmospheric Environment** 39:7518-7528.

Melo WJ, Melo GMP, Melo VP, Bertipaglia LMA (1998) Experimentação sob condições controladas. Jaboticabal: Funep.

Melendez-Perez JJ, Fostier AH (2013) Assessment of Direct Mercury Analyzer® to quantify mercury in soils and leaf samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 24:1880-1886.

Molina JA, Oyarzun R, Esbrí JM, Higuera P (2006) Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. **Environmental Geochemistry and Health** 28:487-498.

Palmieri HEL, Nalini Jr HA, Leonel LV, Windmüller CC, Santos RC, Brito W (2006) Quantification and speciation of mercury in soils from the Tripuí Ecological Station, Minas Gerais, Brazil. **Science of The Total Environment** 368:69-78.

Patra M, Sharma A (2000) Toxicidade de mercúrio em plantas. **The Botanical Review** 66:379-422.

Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló J (2013) Do toxic ions induce hormesis in plants? **Plant Science** 212:15-25.

Rellán-Álvarez R, Ortega-Villasante C, Álvarez-Fernández A, Campo FFdel, Hernández LE (2006) Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. **Plant and Soil** 279:41-50.

Rodrigues ACD, Santos AM, Santos FS, Pereira ACC, Sobrinho NMBA (2016) Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais potencialmente tóxicos: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química** 8:262-276.

Santos CCG, Rodella AA, Abreu CA, Coscione AR (2010) Vegetable species for phytoextraction of boron, copper, lead, manganese and zinc from contaminated soil. **Scientia Agricola** 67:713-719.

Santos-Gandelman JF, Giambiagi-deMarval M, Muricy G, Barkay T, Laport MS (2014) Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek** 106:585–590.

Sarkar D, Essington ME, Misra KC (2000). Adsorption of mercury(II) by variable charge surfaces of quartz and gibbsite. **Soil Science Society of America Journal** 63:1626-1636.

Sarkar D, Essington ME, Misra KC (2000). Adsorption of mercury(II) by kaolinite. **Soil Science Society of America Journal** 64:1968-1975.

Singh R, Behera M, Kumar S (2019) Nano-bioremediation: An innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety** 7:165–182.

Sinha A, Kumar S, Khare SK (2013) Biochemical basis of mercury remediation and bioaccumulation by *Enterobacter* sp. EMB21. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 169:256-267.

Soares LC, Linhares LA, Egreja Filho FB, Windmüller CC, Yoshida MI (2015) Mercury content in soils of southeastern Brazil without anthropogenic influence and its correlation with soil characteristics. **Brazilian Journal of Soil Science** 29:903-914.

Tangahu BV, Abdullah SRS, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering** 2011:1-32.

Valle CM, Santana GP, Windmüller CC (2006) Mercury conversion processes in Amazon soils evaluated by thermodesorption analysis. **Chemosphere** 65:1966-1975.

Windmüller CC, Durão Jr WA, Oliveira A, Valle CM (2015). The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): Implications for the mercury cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 112:201-211.

Yan H, Gao Y et al. (2019) Potential use of the *Pteris vittata* arsenic hyperaccumulation-regulation network for phytoremediation. **Journal of Hazardous Materials** 368:386-396.

Xu J, Kleja DB, Biester H, Lagerkvist A, Kumpiene J (2014) Influence of particle size distribution, organic carbon, pH and chlorides on washing of mercury contaminated soil. **Chemosphere** 109:99-105.

CAPÍTULO 3- Associação de microrganismos e planta de milho para remediar Latossolo Vermelho eutroférico contaminado com mercúrio

RESUMO - O mercúrio (Hg) é um dos metais mais tóxicos e não essencial para nenhum organismo. Nesse estudo, foi avaliado o potencial de plantas de milho em associação com bactérias para remediar Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) contaminado com Hg^{2+} . Isolaram-se 180 microrganismos do solo do experimento anterior e apenas 12 sobreviveram, *in vitro*, à alta concentração de Hg e 5 foram escolhidas devido à facilidade de cultivo e características morfológicas distintas para serem avaliadas como potenciais remediadoras de Hg associadas à planta de milho. Vasos com 2 kg de LVef foram contaminados com HgCl_2 sólido, em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos: controle (Hg e sem bactéria), tratamento 2 (Hg e bactéria 1), tratamento 3 (Hg e bactéria 2), tratamento 4 (Hg e bactéria 3), tratamento 5 (Hg bactéria 4) e tratamento 6 (Hg e bactéria 5) e 4 repetições. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg^{-1} de Hg^{2+} . A quantificação do Hg total foi por espectrofotometria de absorção atômica e a identificação das bactérias foi realizada por sequenciamento (Sanger). As bactérias foram identificadas como sendo *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. A fitomassa seca da raiz e da parte aérea (PA) apresentou homogeneidade entre os tratamentos analisados. O tratamento 2 (com *Enterobacter* sp.) foi o que translocou maior quantidade de Hg para a PA, acumulando $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg total por fitomassa de PA. O tratamento 6 (com *Bacillus* sp.) acumulou maior quantidade de Hg na raiz e na PA, totalizando $6,99 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg total por planta. Concluiu-se que o LVef adsorveu maior concentração de Hg do que as plantas. O milho apresentou resistência à alta concentração de Hg no solo e o pode ser considerado como planta potencial estabilizadora de Hg^{2+} , pois acumulou maior concentração do metal nas raízes do que na parte aérea.

Palavras-chave: Bactérias, biorremediação, fitorremediação, metais potencialmente tóxicos

CHAPTER 3- Microorganism and maize plant associations to remedy mercury-contaminated Oxisol

ABSTRACT - Mercury (Hg) is one of the most toxic metals and not essential for any organism. In this study, the potential of maize plants in association with bacteria was evaluated to remedy a Hg^{2+} contaminated Oxisol. 180 soil microorganisms were isolated from a previous experiment. Only 12 survived, in vitro, the high concentration of Hg and 5 were chosen due to the ease of cultivation and distinct morphological characteristics to be evaluated as potential Hg remediators associated with maize. Pots with 2 kg of the Oxisol were contaminated with solid HgCl_2 , in a completely randomized design with 6 treatments: control (Hg and no bacteria), treatment 2 (Hg and bacteria 1), treatment 3 (Hg and bacteria 2), treatment 4 (Hg and bacteria 3), treatment 5 (Hg bacteria 4) and treatment 6 (Hg and bacteria 5). All treatments received a dose of $36 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ and 4 repetitions. Total Hg was quantified by atomic absorption spectrophotometry and bacterial identification was performed by sequencing (Sanger). The bacteria were identified as *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. and *Staphylococcus* sp. The root and shoot dry weight showed homogeneity among the treatments. Treatment 2 (with *Enterobacter* sp.) was the one of translocated the highest amount of Hg in the shoot, with $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ total Hg per shoot phytomass. The treatment 6 (with *Bacillus* sp.) accumulated higher amount of Hg in the roots and shoots, with $6,99 \text{ mg kg}^{-1}$ of Hg per plant. It was concluded that the Oxisol adsorbed more Hg than the plants. Maize presented resistance to high soil Hg concentration and can be considered as a potential stabilizing plant for Hg^{2+} because it accumulated higher concentration of the metal in the roots than in the aerial part. It was concluded that the Oxisol adsorbed more Hg than the plants. It was concluded that the soil adsorbed more Hg than the plants. Maize presented resistance to high soil Hg concentration and can be considered as a potential stabilizing plant of Hg^{2+} because it accumulated higher concentration of the metal in the roots than in the shoots.

Keywords: Bacteria, bioremediation, phytoremediation, potentially toxic metal

1. Introdução

A qualidade do solo e da água é essencial para o desenvolvimento dos ecossistemas. Ela proporciona produção agropecuária de excelência para atender as necessidades nutricionais dos seres humanos. No entanto, a contaminação por metais potencialmente tóxicos no ambiente, em escala mundial, prejudica não só a qualidade do solo e dos recursos hídricos, como também toda comunidade biótica e qualidade de vida dos seres humanos (Burges et al., 2018).

O mercúrio (Hg) é um metal altamente tóxico e não essencial para os organismos vivos. Sua concentração no ambiente vem aumentando devido à intensificação das atividades antrópicas, tornando-o um problema ambiental. Por isso, estratégias de fitorremediação e biorremediação têm sido avaliadas para a recuperação de meios contaminados por esse metal.

O uso de culturas como potenciais fitorremediadoras de metais potencialmente tóxicos, como a cultura do milho, vem mostrando eficiência de remediação de metais como arsênio, cádmio, cobre e zinco (Murakami e Ae 2009; Vamerali et al., 2010; Arbaoui et al., 2013; Wang et al., 2018), entre outros. A cultura do milho é bem estudada e de fácil cultivo nas condições brasileiras, tornando-a atrativa para estudo de remediação de solo contaminado com Hg, que ainda é incipiente.

Sabe-se que os microrganismos que colonizam as raízes favorecem a absorção dos metais potencialmente tóxicos, assim como os fazem com os nutrientes das plantas (Vamerali et al., 2010). Embora apresentem mecanismos para reduzir a toxicidade e imobilizar os metais presentes no meio, sem afetar a colonização e o metabolismo, nem todos os microrganismos são capazes de acumular o Hg nos tecidos vegetais e ou favorecer a translocação para a parte aérea das plantas (Naik e Dubey, 2017; Uraguchi et al., 2019).

Diante da procura por alternativas menos onerosas e ambientalmente adequada para a recuperação de áreas contaminadas, avaliou-se o efeito da associação de plantas de milho com diferentes bactérias para remediação de Latossolo Vermelho eutrófico (LVef) contaminado com HgCl_2 em elevada concentração de Hg^{2+} , quantificando o teor de Hg total removido do solo, e acumulado nas raízes e parte aérea (folhas e caule).

2. Material e métodos

2.1. Isolamento das bactérias utilizadas e análises microbiológicas

Os microrganismos utilizados no experimento foram isolados de LVeF contaminado com solução de HgCl_2 nas concentrações de 5, 24 e 36 mg kg^{-1} de Hg^{2+} e cultivado com Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) como descrito no capítulo anterior.

Para o isolamento das bactérias resistentes à presença de Hg, 10 g de solo de cada tratamento foram diluídos em 95 mL de solução de pirofosfato de sódio (0,1%) estéril e misturados em agitador por 30 minutos. Deste conteúdo, retirou-se de cada amostra, 1 mL que foi adicionado a um tubo contendo 9 mL de solução de pirofosfato (0,1%) para realização da diluição seriada que foi de 10^{-1} até 10^{-5} . De cada tubo, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL que foi inoculada em duplicata, em placas de Petri com Ágar Padrão (PCA) e incubados por 48 horas a 37 °C.

Das amostras de solo foram isolados 180 microrganismos que foram inoculados no meio de cultivo Brain Heart Infusion Broth (BHI) com a concentração de 54 mg kg^{-1} de Hg^{2+} (adicionado por HgCl_2 sólido), incubados por 48 horas a 37°C, com o intuito de se isolar bactérias resistentes à elevada concentração de Hg. Deste conteúdo, foram semeadas em placas de Petri com Ágar PCA e incubados até 5 dias a 37°C.

Apenas 12 cepas cresceram nas placas com Ágar PCA, por isso foram consideradas bactérias capazes de resistir a alta concentração de Hg. Essas 12 amostras foram submetidas, em triplicata, ao teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) que foi estimado em caldo BHI com as concentrações 0 (controle positivo= BHI inoculado com bactéria e sem metal), 5, 50, 100, 200 mg L^{-1} de Hg^{2+} (adicionado na forma de HgCl_2) e controle negativo respectivo a cada concentração (BHI sem bactéria e com Hg), seguido de incubação sob agitação a 30°C por 48 horas e determinada pela densidade a 540nm. Considerou-se concentração inibitória aquela que cessou o crescimento microbiano (BHI sem turvação) baseado no controle positivo (Nakamura et al., 1986; Giovanella et al., 2016).

Em razão dos resultados do CMI e da facilidade de cultivo, das 12 cepas isoladas, apenas 5 bactérias foram purificadas e selecionadas para avaliar o efeito

remediador da associação destas bactérias com plantas de milho realizada na etapa seguinte.

O DNA dos 5 isolados bacterianos foi extraído pelo método de Kuramae-Izioka (1997) adaptado, que consiste no crescimento de cada cepa em 1,5 mL de BHI, do qual foi coletado 1,5 µL da suspensão de cada tubo e centrifugado por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi suspenso em 700 µL de tampão de extração [160mM Tris- HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 20mM NaCl e SDS 0.5% (p/v)]. A solução foi homogeneizada e deixada em banho maria a 65°C por 40 minutos. Feito isso, em cada amostra, adicionaram-se 300 µL de acetato de potássio (5M), incubados por 30 minutos no gelo, seguido de adição de 650 µL de solução de clorofórmio e álcool isomálico [24:1 (v/v)].

Então, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm e a 10°C. Do sobrenadante de cada amostra, retirou-se 400 µL que foram adicionados em novos tubos de 1,5 mL, adicionando 400 µL de isopropanol, seguido de inversão dos tubos para mistura do conteúdo e centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado para não eliminar o pellet de DNA, e em cada amostra adicionaram-se 200 µL de etanol (95%) refrigerado, seguido de lenta inversão manual de cada tubo e mantidos a -20°C “overnight”. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e a 10°C. Os “pellets” de DNA foram secos por 30 minutos em temperatura ambiente para evaporação do etanol e ressuspensos com 30 µL de TE (10 µM Tris-HCl, pH 7.3, 0.1 µM EDTA).

Uma vez extraídos, a amplificação do 16S rDNA foi feita utilizando os primers universais P027F e 1378R. Para tanto, cada Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi conduzida em volume de 20 µL contendo 2 µL de DNA molde, 0,4 µL de solução de dNTPs (10 mM), 1.0 µL de cada iniciador a 5 pM, 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (1.5 U/µL), 2,0 µL de solução tampão (10 X) para a reação de PCR com 0.8 µL de MgCl₂ (50 mM) e o restante, até completar 20 µL, de água ultrapura (Milli Q) previamente esterilizada.

A mistura foi submetida a um termociclador a 95 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), temperatura de anelamento de 63 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto (extensão).

Então, os DNAs foram encaminhados para purificação e identificação no Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) da Unicamp, SP e sequenciadas (Sanger) com protocolo para Hitachi 4500 ABI, com aplicação de bioinformática (Basecall, Alinhamento, Blastn) e comparadas as sequências depositadas banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Genbank.

2.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tratamentos: T1: controle negativo, sem inoculação de bactéria; T2: inoculação de bactéria 1; T3: inoculação de bactéria 2; T4: inoculação de bactéria 3; T5: inoculação de bactéria 4; T6: inoculação de bactéria 5. Em todos os tratamentos, foi adicionado a dose de $36 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ via HgCl_2 sólido.

2.3. Preparo do solo

O solo (LVef), argiloso (argila = 556 g kg^{-1} , silte = 381 g kg^{-1} e areia = 63 g kg^{-1} Silva, 2019), sem histórico de contaminação por Hg, foi coletado na camada 0-0,20 m, em Jaboticabal, SP. Retirou-se uma amostra que foi seca ao ar e à sombra, passada por peneira com abertura de 2 mm e encaminhada à análise química.

Os resultados foram pH (CaCl_2)= 5,5, matéria orgânica= 20 g dm^{-3} , fósforo= 22 mg dm^{-3} , enxofre = 7 mg dm^{-3} , cálcio = $30 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, magnésio = $12 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, potássio= $4,0 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, alumínio = $0 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, acidez potencial (H+Al)= $19 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, capacidade de troca catiônica (CTC) = $65 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, saturação de base= 71, boro = $0,30 \text{ mg dm}^{-3}$, cobre= $4,6 \text{ mg dm}^{-3}$, ferro= 8 mg dm^{-3} , manganês= $9,5 \text{ mg dm}^{-3}$, zinco= $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$ e Hg total= $0,099 \text{ mg kg}^{-1}$. O fósforo e a matéria orgânica foram determinados por espectrofotometria e o enxofre por turbidimetria. Os demais elementos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o Hg total absorção atômica no DMA-80.

Por 3 dias consecutivos, o solo foi autoclavado por 30 minutos, a 121°C e 1 atm. O solo seco foi acondicionado na quantidade 2 kg em vasos revestidos com sacos plásticos para evitar perdas por lixiviação.

A contaminação foi feita com HgCl_2 sólido, homogeneizando manualmente. Durante todo o experimento foi utilizada água deionizada estéril na proporção de 70% da capacidade de campo do solo.

Após a contaminação, foi realizada a fertilização do solo (Tabela 3.1), conforme Melo et al. (1998). Os fertilizantes empregados no experimento apresentaram concentração de Hg de $0,38 \text{ mg kg}^{-1}$ para o sulfato de amônio, $0,056 \text{ mg kg}^{-1}$ para superfosfato simples e $0,008 \text{ mg kg}^{-1}$ para cloreto de potássio.

Tabela 3.1. Fertilização mineral em todos os tratamentos.

Fertilizante	por vaso	Semeadura	20 dias
Sulfato de amônio (g)	4	0,8	1,6
Superfosfato Simples (g)	13,6	4	4,8
Cloreto de Potássio (g)	1,6	0,4	0,6
Solução C (mL)	10,8	10,8	--
Solução D (mL)	3,6	3,6	--

Solução C: 0,96 g H_3BO_3 , 1,97 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 7,33 g ZnSO_4 , 3,08 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Completar a 1000 mL. Solução D: 24,98 g FeSO_4 , 33,20 g EDTA, 80 mL NaOH 1 mol L^{-1} . Completar a 1000 mL. Agitar 1 noite no escuro.

2.4. Plantio e manejo do milho

No 8º dia após a contaminação do solo, amostras foram coletadas para determinação do pH. Em seguida, as sementes de milho, cultivar 2B710PW (Dow Agrosiences), foram imersas por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio (10%), lavadas com água destilada estéril, e semeadas, colocando-se 5 unidades por vaso. Imediatamente foi aplicada a fertilização de semeadura (Melo et al., 1998) e a inoculação das bactérias. O desbaste foi realizado quando as plantas atingiram 0,10 m, mantendo apenas uma planta por vaso.

2.5. Preparo e aplicação dos microrganismos no solo contaminado com mercúrio

A partir de uma suspensão de colônias puras, cultivadas de forma individual em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), foram preparados os inóculos na concentração de 6×10^8 UFC (Vivas et al., 2006) de acordo com escala de MacFarland e, a cada 7 dias, foi aplicado 1 mL de inóculo por vaso.

2.6. Coleta de raízes, parte aérea de plantas de milho e do solo ao final do experimento

A coleta foi realizada 30 dias após o desbaste. No preparo das raízes, todo o solo aderido às mesmas foi cuidadosamente removido, seguido de lavagem com solução aquosa de detergente neutro (1 mL L^{-1}), água corrente, água destilada e água deionizada. A parte aérea (PA), do mesmo modo, foi lavada.

As amostras foram secas em estufa a $67 \text{ }^\circ\text{C}$ com circulação forçada de ar até obtenção de massa constante, pesadas para obtenção de fitomassa seca, moídas em moinho tipo Willey com peneira de 40 mesh e armazenadas em sacos plásticos.

Os 2 kg de solo de cada vaso foram passados por peneira com 5 mm de diâmetro de malha. Em seguida foi retirado 0,5 kg de cada amostra, por quarteamento manual, e encaminhado para quantificação do Hg total e avaliação do pH do solo no final do experimento.

2.7. Quantificação de mercúrio total nas amostras de solo e planta

A quantificação do Hg total de todas as amostras foi realizada no Instituto de Química da Unicamp, SP. Todas as amostras foram trituradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido para obtenção de material mais homogêneo e, portanto, uma melhor precisão analítica. A quantificação do mercúrio total nas amostras sólidas foi realizada usando o equipamento Direct Mercury Analyzer® (DMA-80 TRICELL; Milestone Inc., Itália). Este método combina a combustão de amostras (para redução térmica de Hg e vaporização) com espectrometria de absorção atômica (Melendez-Perez e Fostier, 2013).

Duas curvas analíticas foram construídas nas faixas lineares de 0,2 a 10 ng de Hg e 150 a 1.000 ng de Hg (Figura 3.1). Para tanto, soluções padrão de Hg (10, 100 e $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas, diluindo-se solução padrão de Hg ($1.000 \pm 0,003 \text{ mg mL}^{-1}$, Tec-Lab® Hexis, Jundiaí, Brasil) em água deionizada com 10% de HNO_3 subdestilado.

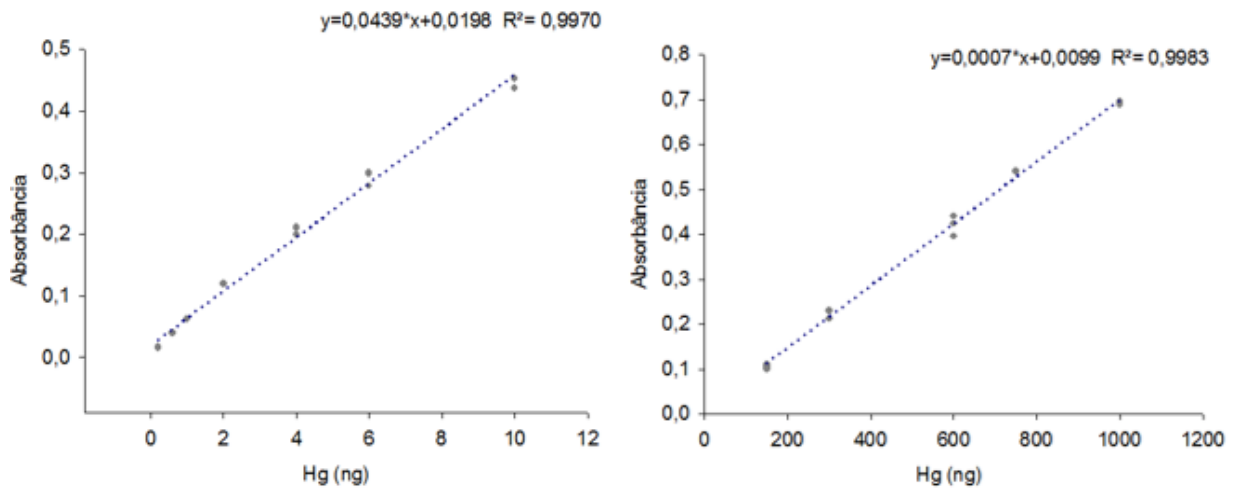


Figura 3.1. Curvas analíticas de calibração.

Os parâmetros de validação do método analítico incluíram linearidade e limite de quantificação (LOQ). A precisão foi verificada diariamente pela análise de materiais de referência padrão de folhas de tomate (SRM NIST 1573) e solo (solo de Montana SRM NIST 2711). A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo de todas as réplicas analíticas do SRM. Cada amostra experimental também foi analisada em duplicata.

Para cada réplica, uma massa de amostra entre 10 e 200 mg foi analisada, dependendo da concentração esperada, totalizando 120 amostras analisadas.

Os excedentes de todas as amostras não utilizadas foram devidamente armazenados em recipientes fornecidos pela FCAV/Unesp. A água utilizada para lavagem das raízes bem como os materiais e meios de cultura contaminados foram armazenados para devido descarte por empresa própria contratada pela instituição.

2.8. Validação do método analítico

Os coeficientes de correlação para as curvas de calibração de 0,2 a 10 ng e 150 a 1000 ng foram 0,9941 e 0,9966, respectivamente. Os percentuais de recuperação para amostras de referência padrão de solo e folhas foram de 105 e 106%, respectivamente. A precisão do material de referência padrão (19 e 9 replicações analíticas realizadas no solo e folha, respectivamente) foi inferior a 4%. O coeficiente de variação para as amostras analisadas em duplicata foi <10%.

2.9. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística no programa AgroEstat (2015), com aplicação do teste de Duncan para comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Identificação das bactérias

A concentração mínima inibitória mostrou que 58,34% (7 amostras) dos 12 isolados avaliados tiveram seu crescimento reduzido a partir da concentração de 5 mg L⁻¹ de Hg²⁺, 33,33% (4 amostras) a partir de 50 mg L⁻¹ de Hg²⁺ e apenas 8,33% (1 amostra) a partir de 100 mg L⁻¹ de Hg²⁺.

Os 5 isolados que tiveram o crescimento inibido nas maiores concentrações do metal apresentaram características morfológicas distintas. A bactéria 1 apresentou colônia de coloração branca e opaca, a bactéria 2 apresentou colônia branca leitosa e com meio pouco amarelado, a bactéria 3 com coloração amarelada com círculo no meio e borda irregular, a bactéria 4 com cor amarelo bem forte e borda regular e a bactéria 5 apresentou colônia elevada, com cor esbranquiçada, leitosa e borda irregular.

Após o sequenciamento das 5 bactérias escolhidas para posterior avaliação do potencial efeito de biorremediação de Hg, foram identificadas como bactéria 1: *Enterobacter cloacae* (95%), bactéria 2: *Bacillus subtilis* (93%), bactéria 3: *Enterobacter* sp. (96%), bactéria 4: *Staphylococcus epidermidis* (95%) e bactéria 5: *Bacillus* sp. (93%). Como a similaridade foi inferior a 97%, apenas o gênero dos isolados podem ser considerados.

3.2. Influência das condições de cultivo no pH do solo

Em relação ao pH do solo, não houve diferença entre os tratamentos no mesmo período de avaliação. No entanto, o pH final foi significativamente menor (0,3 a 0,4 unidade de pH) que o pH inicial nos tratamentos 2, 4 e 6 (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Valores de pH em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ do solo do experimento do cultivo do milho com inoculação de diferentes cepas de bactérias.

Tratamentos	pH inicial	pH final
T1	5,7aA	5,5aA
Desvio padrão	0,13	0,17
CV(%)	2,28	3,17
T2	5,7aA	5,4bA
Desvio padrão	0,14	0,08
CV(%)	2,48	1,39
T3	5,7aA	5,5aA
Desvio padrão	0,13	0,28
CV(%)	2,20	5,10
T4	5,7aA	5,3bA
Desvio padrão	0,06	0,10
CV(%)	1,02	1,86
T5	5,7aA	5,5aA
Desvio padrão	0,10	0,20
CV(%)	1,67	3,66
T6	5,8aA	5,4bA
Desvio padrão	0,06	0,19
CV(%)	1,00	3,47

T1= Hg^{2+} e sem bactéria, T2= Hg^{2+} + *Enterobacter* sp., T3= Hg^{2+} + *Bacillus* sp., T4= Hg^{2+} + *Enterobacter* sp., T5= Hg^{2+} + *Staphylococcus* sp., T6= Hg^{2+} + *Bacillus* sp. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg^{-1} de Hg^{2+} . As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

3.3. Influência das condições de cultivo nas variáveis de crescimento do milho

A fitomassa seca da raiz apresentou homogeneidade em todos os tratamentos testados, variando entre 6,6 a 9,22g. A fitomassa seca de PA também apresentou homogeneidade, exceto no tratamento 5 (que recebeu a bactéria *Staphylococcus* sp.) que foi estatisticamente menor (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Fitomassa seca das raízes e de parte aérea de milho cultivado em solo contaminado com mercúrio e na presença de diferentes bactérias

Tratamentos	Fitomassa seca de raiz	Fitomassa seca de parte aérea
	----- g -----	
T1	8,4a	31,25a
Desvio padrão	1,16	6,29
CV(%)	13,79	20,13
T2	8,21a	26,25ab
Desvio padrão	1,77	10,31
CV(%)	21,54	39,27
T3	6,61a	29,00ab
Desvio padrão	2,48	4,32
CV(%)	37,49	14,90
T4	8,66a	23,75ab
Desvio padrão	0,68	2,50
CV(%)	7,86	10,53
T5	8,8a	18,75b
Desvio padrão	1,97	8,54
CV(%)	22,36	45,54
T6	9,22a	21,25ab
Desvio padrão	1,49	6,29
CV(%)	16,18	29,61

T1=Hg²⁺ e sem bactéria, T2= Hg²⁺+ *Enterobacter* sp., T3= Hg²⁺ + *Bacillus* sp., T4= Hg²⁺ + *Enterobacter* sp., T5= Hg²⁺ + *Staphylococcus* sp., T6= Hg²⁺ + *Bacillus* sp. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg⁻¹ de Hg²⁺. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As raízes do milho em contato com Hg, não apresentaram diferença visual de tamanho e nem sintomas visuais de toxicidade ao metal (Figura 3.2).

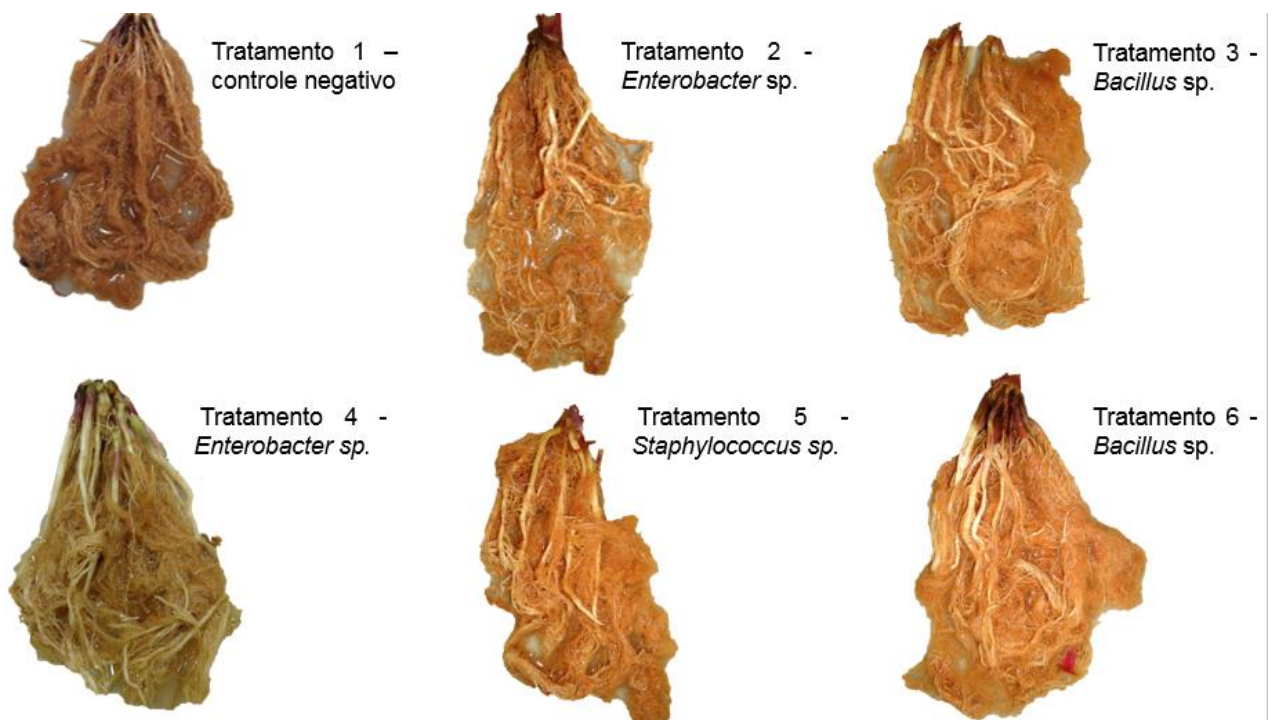


Figura 3.2. Raízes de milho mantidas em Latossolo Vermelho eutroférrico contaminado com alta concentração de mercúrio Hg^{2+} .

3.4. Concentrações de mercúrio total nos compartimentos solo, raiz e parte aérea do milho

Após 7 dias da contaminação dos vasos de acordo com cada tratamento, as concentrações de Hg total encontradas no solo no momento da semeadura do milho apresentaram resultados que mostraram falhas de homogeneização, visto que o solo foi contaminado com $HgCl_2$ sólido e falhas de amostragem (Tabela 3.4), por isso o alto coeficiente de variação (CV%). Observou-se que no tratamento controle, que não foi adicionado o metal, houve deposição de Hg atmosférico oriundo da volatilização dos tratamentos contaminados.

Tabela 3.4. Média das concentrações de mercúrio total no Latossolo Vermelho eutroférico esperada no início (momento da semeadura) e a encontrada.

Tratamentos	[Hg] solo esperado	[Hg] solo encontrado	Desvio padrão	CV %
	início -----mg kg ⁻¹ -----			
T1	36,1	40,75	29,98	73,57
T2	36,1	26,02	7,00	26,89
T3	36,1	39,36	28,24	71,75
T4	36,1	53,42	42,02	78,65
T5	36,1	59,60	44,80	75,17
T6	36,1	36,47	7,89	21,65

T1=Hg²⁺ e sem bactéria, T2= Hg²⁺+ *Enterobacter* sp., T3= Hg²⁺+ *Bacillus* sp., T4= Hg²⁺+ *Enterobacter* sp., T5= Hg²⁺+ *Staphylococcus* sp., T6= Hg²⁺+ *Bacillus* sp. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg⁻¹ de Hg²⁺.

Após 44 dias da concentração de Hg total no solo não apresentou diferença entre os tratamentos testados, com valores entre de 18,54 a 20,43 mg kg⁻¹ de Hg²⁺ (Tabela 3.5). O acúmulo de Hg²⁺ total nas raízes variou entre 4,29 a 6,84 e foi estatisticamente maior no tratamento 6 (com bactéria do gênero *Bacillus* sp.) comparado com o tratamento controle (T1) e com o tratamento 3 (também com bactéria do gênero *Bacillus* sp.) (Tabela 3.5).

O tratamento 2 (com bactéria do gênero *Enterobacter* sp.) foi mais efetivo em translocar o metal para a PA e acumulou em ~357% mais Hg²⁺ que o tratamento 1 (controle), 625% mais Hg²⁺ que o tratamento 4 (com bactéria *Enterobacter* sp.) e ~833% mais Hg²⁺ que o tratamento 5 (com bactéria do gênero *Staphylococcus* sp.) (Tabela 3.5). O Hg²⁺ total encontrado na planta na (raiz e PA) variou de 4,42 a 6,99 entre os tratamentos analisados. O tratamento 6 (*Bacillus* sp.) foi ~51% mais efetivo que o tratamento controle (T1) mas não diferiu dos tratamentos 2 e 4 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Concentração de Hg total no Latossolo Vermelho eutroférico no final do experimento e acúmulo de Hg na fitomassa seca de raiz e parte aérea.

Tratamentos	[Hg] solo final	Hg acumulado na fitomassa seca raiz	Hg acumulado na fitomassa seca parte aérea	Hg total na planta (raiz+PA)
	mg kg ⁻¹	-----mg kg ⁻¹ /vaso-----		mg kg ⁻¹ / vaso
T1	20,18a	4,56b	0,07b	4,63b
Desvio padrão	1,83	1,09	0,01	1,10
CV(%)	9,07	23,93	19,59	23,82
T2	20,34a	5,15ab	0,25a	5,40ab
Desvio padrão	2,46	1,37	0,18	1,34
CV(%)	12,10	26,61	70,98	24,84
T3	18,54a	4,29b	0,13ab	4,42b
Desvio padrão	1,48	1,90	0,03	1,92
CV(%)	7,99	44,19	24,46	43,45
T4	19,19a	5,66ab	0,04b	5,7ab
Desvio padrão	0,73	1,18	0,02	1,19
CV(%)	3,78	20,84	39,64	20,96
T5	20,09a	4,94ab	0,03b	4,97b
Desvio padrão	3,88	0,15	0,02	0,15
CV(%)	19,30	2,97	71,48	2,97
T6	19,64a	6,84a	0,15ab	6,99a
Desvio padrão	0,17	0,84	0,11	0,91
CV(%)	0,86	12,32	74,20	13,06

T1=Hg²⁺ e sem bactéria, T2= Hg²⁺+ *Enterobacter* sp., T3= Hg²⁺ + *Bacillus* sp., T4= Hg²⁺ + *Enterobacter* sp., T5= Hg²⁺ + *Staphylococcus* sp., T6= Hg²⁺ + *Bacillus* sp. Todos os tratamentos receberam a dose de 36 mg kg⁻¹ de Hg²⁺. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

No que tange ao grau de associação linear entre as variáveis, que pode variar de -1 a 1 (Bussab e Morettin, 2017), a concentração de Hg (mg kg⁻¹) do solo apresentou alta correlação negativa (p<0,01) com o pH do solo, assim como o pH apresentou alta correlação (p<0,01) com o acúmulo de Hg²⁺ na PA e alta correlação com o Hg acumulado na raiz e na PA. A concentração de Hg no solo apresentou média correlação (p<0,05) com o peso da fitomassa seca da PA, média correlação do peso da fitomassa seca da raiz com o Hg acumulado na raiz e média correlação do Hg acumulado na raiz e acumulado na PA. Os demais valores de correlação foram baixos e não significativos (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Correlação das variáveis das plantas de milho.

	pH solo final	fitomassa seca raiz	fitomassa seca parte aérea	Acúmulo Hg fitomassa seca raiz	Acúmulo Hg fitomassa seca PA
[Hg] solo final	-0,86**	-0,13 ^{NS}	0,51**	-0,016 ^{NS}	-0,28 ^{NS}
Acúmulo Hg fitomassa seca raiz	0,28 ^{NS}	0,45*	-0,28 ^{NS}	-	0,38*
Acúmulo Hg fitomassa seca PA	0,89**	0,16 ^{NS}	-0,61**	0,38*	—

NS= não significativa; (*) = significância a 5% de probabilidade; (**) =significância a 1% de probabilidade.

4. Discussão

A presença de microrganismos em ambientes contaminados com diversos contaminantes está relacionada aos mecanismos e habilidades de resistência que estes possuem e desenvolvem ao longo do tempo

A capacidade de resistência do *Bacillus* sp. ao Hg está relacionada a eficiência de volatilizar o Hg²⁺, principalmente nas primeiras 8 horas em contato com o metal e por apresentar o gene *merA*, que é responsável pelo mecanismo de detoxificação por via da redução do Hg²⁺ à Hg⁰, uma forma menos tóxica do elemento. Condições ambientais também podem influenciar o comportamento do Hg no solo (Hart et al., 1998; Chen et al., 2019; Pushkar et al., 2019).

Os genes *mer* atuam na codificação das proteínas vinculadas ao transporte, regulação, redução e decomposição dos compostos de Hg (Matsui e Endo, 2018) e funcionam como estratégia de sobrevivência das bactérias em meios contaminados.

O gene *merA* do *Bacillus* sp. codifica a enzima mercúrio redutase (Giri et al., 2014; Amin e Latif, 2016; Dash et al., 2017) e apresenta atividade ótima em pH 6 e a 37°C (Purkan et al., 2017). Essas condições são próximas às de nosso estudo e a ação sinérgica do *Bacillus* sp. com as plantas de milho favoreceram a remediação do Hg²⁺ total pela planta (raiz+ PA) no tratamento 6.

A remediação por esse gênero bacteriano pode ocorrer pela biossorção do Hg²⁺. Esse processo é favorecido com aumento do pH próximo de 5 e mais eficiente em locais com baixo teor de Hg²⁺ (Wang et al., 2010, Wang et al., 2014).

Em solos contaminados com Hg, como na Baía de Minamata, no Japão, *Bacillus* sp. foi o microrganismo encontrado com maior predominância em sedimentos (Nakamura et al., 1988). Este microrganismo também foi o mais resistente em solo contaminado com Hg conforme estudos de Figueiredo et al. (2016) e Purkan et al. (2017).

A bactéria *Enterobacter* sp., apresentou resistência a alta concentração de Hg²⁺ por também possuir o gene *merA* e ser biorredutoras do metal. Do mais, *Enterobacter* sp. também é capaz de bioacumular o Hg²⁺ (Sinha et al., 2013; Chen et al., 2018a; Chen et al., 2018b; Pushkar et al., 2019). A literatura tem demonstrado o potencial do *Enterobacter* sp. em reduzir o Hg²⁺ a Hg⁰ e acumular o Hg no citoplasma

(Sinha e Khare, 2012; Sinha et al., 2013; Amin e Latif, 2017). No tratamento 2, esse gênero foi responsável pela maior translocação do metal para a PA.

O gênero *Enterobacter* sp. previamente isolado de solo contaminado com Hg^{2+} no presente estudo, foi também isolado por Amin e Latif (2016) e apresentou resistência ao Hg *in vitro*, em meio de cultivo com $20 \mu g mL^{-1}$ de $HgCl_2$. Ainda segundo os autores, esta bactéria possui alto potencial de fixação de nitrogênio, assim com o *Bacillus* sp., e significativa produção de IAA (auxina).

Além disso, na literatura já é conhecido o potencial de crescimento de *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp. em solo contaminado com e sem $HgCl_2$ e cultivado com trigo (Amin e Latif, 2016). Os autores identificaram que a inoculação em consórcio destas bactérias resultou em aumento da germinação de sementes, massa fresca da raiz e parte aérea, número de vagens/planta, quando comparado com o solo controle que não recebeu bactéria e foi contaminado com Hg.

Em nosso estudo, observamos que os tratamentos 2 e 6, inoculados separadamente com essas bactérias apresentaram germinação mais rápida em comparação ao controle negativo (T1), sugerindo que o uso dessas bactérias contribua para diminuir o estresse em plantas de milho cultivadas em solos com alta concentração de Hg. Enquanto não houve o contato físico das raízes com o solo, os microrganismos podem ter utilizado os mecanismos moleculares para estimular o crescimento vegetal (Pérez-Flores et al., 2017) e assim beneficiar a germinação dos tratamentos que receberam inoculação de microrganismos.

No presente estudo, *Staphylococcus* sp. apresentou resistência a elevada concentração de Hg^{2+} . Essa resistência é explicada devido a presença dos genes *merA*, *merR*, *merC* e *merT* e eficiência intracelular para reduzir o Hg Hg^{2+} a Hg^0 em pH 6 e a $37^\circ C$ (Yu et al., 2014). O potencial biorremediador desta bactéria é pouco relatado na literatura, sendo descrito pela primeira vez por Yu et al. (2014).

Esse gênero que foi isolado em solo da cidade de Lanzhou, China, e apresentou elevada resistência a presença de Hg, com eficácia de redução de Hg^{2+} e a presença do gene *merA*. Esta bactéria apresentou crescimento ótimo em $37^\circ C$ e em pH de 5,6 a 8,5 (Yu et al., 2014). Contudo, ao ser utilizada no presente estudo, o gênero *Staphylococcus* sp. não expressou todo seu potencial remediador.

De modo geral, a germinação mais rápida dos tratamentos que foram contaminados com Hg^{2+} e receberam a inoculação semanal de bactérias pode ter sido favorecida pelo fato dos microrganismos transformarem os contaminantes em formas menos tóxicas, que logo, beneficiaram o processo germinativo frente ao estresse da contaminação do meio e com potencialização do crescimento inicial.

Em função de suas características, estas bactérias podem atuar sozinhas ou em associação com outros microrganismos na detoxificação do Hg (Santos-Gandelman et al. 2014) e proporcionar condições mais favoráveis para o ecossistema. Embora a presença desses genes proporcione tolerância ao metal, não significa que favoreça a translocação e acúmulo do Hg nas plantas (Uraguchi et al., 2019).

O pH e teor de matéria orgânica do solo (MOS) são os fatores mais importantes e que atuam diretamente na disponibilidade dos metais potencialmente tóxicos no meio. O Hg^{2+} apresenta maior afinidade com a MOS e seus compostos sulfurados, do que com complexos inorgânicos (Adriano, 2001; Zeng et al., 2011; Leterme e Jacques, 2015).

De modo geral, valores mais altos de pH e CTC do solo favorecem diretamente os sítios de carga negativa disponíveis, e conseqüentemente, aumenta a adsorção do Hg no solo (Soares et al., 2015). Por esta razão, não foi realizada a calagem com o intuito de favorecer a disponibilidade do Hg.

No entanto, o Hg apresenta afinidade com óxidos de Fe e Al (Durão Jr. et al., 2009) e por isso os Latossolos atuam fortemente no processo de adsorção e complexação do Hg, pois são ricos em óxidos de Fe (Harris-Hellal et al., 2011), o que pode ter reduzido a disponibilidade do metal no meio e influenciado na remoção do metal do L_{Vef} pelas plantas e bactérias no presente estudo.

A adsorção do Hg a argila e aos óxidos de ferro e alumínio limitam sua mobilidade. As argilas favorecem a retenção dos íons metálicos em sua superfície, por ser a fração mais reativa, em função de sua maior superfície específica (Soares et al., 2015).

Por isso, a biodisponibilidade do metal do solo tende a ser baixa e com tendência para acumular nas raízes, pois a endoderme atua como uma barreira para diminuir a absorção do Hg pelas plantas. Como mecanismo de defesa, o Hg é

translocado em menor quantidade para o xilema, acumulando o metal em suas raízes (Adriano, 2001; Debeljak et al., 2013).

Em nosso estudo essa afirmação se confirma, pois observamos maior acúmulo do metal nas raízes do que na fitomassa da PA, corroborando com Debeljak et al. (2013). O acúmulo nas raízes de milho cultivado em meio contaminado com Hg também pode ser potencializado com a associação de micorrizas arbusculares (Debeljak et al., 2018).

A especiação química do Hg tem influência direta na translocação do metal (Adriano, 2001), como também a espécie vegetal utilizada no processo de remediação. Uma vez que o elemento é translocado pela planta de milho, ele tende a acumular mais nas folhas e caules do que nos grãos, o que pode ser uma estratégia de desintoxicação que as plantas de milho utilizam (Fu et al., 2014).

Algumas plantas podem ser consideradas como volatilizadoras, ou seja, são capazes de absorver os metais potencialmente tóxicos, translocar para a parte aérea e volatilizar para a atmosfera (Tangahu et al., 2011). Este processo poderia, portanto, ter favorecido a eliminação do Hg inicialmente presente no solo contaminado. Uma outra hipótese, é que parte do Hg tenha sido perdido por volatilização devido à redução do Hg^{2+} para Hg^0 .

Perdas por lixiviação podem ser desconsideradas uma vez que o solo estava armazenado em sacos plásticos com o intuito de minimizar essas perdas. Wang et al., (2003), após contaminar o solo com HgCl_2 ($2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$) e incubar por 2 meses, descobriram que apenas 0,14% do metal estava na forma de HgCl_2 , 11,25% convertidos à Hg^0 e o restante para outras formas. A forma gasosa pode ser transferida do solo para a atmosfera e depois ser absorvida pelas folhas, via estômatos.

A emissão de Hg^0 pelos solos depende de vários fatores (propriedades do solo, temperatura, radiação luminosa) (Magarelli et al., 2005; Carpi et al., 2014). Desta maneira, a nossa hipótese é que parte do Hg encontrado na parte aérea da planta seja devida à volatilização do Hg do solo.

Na vegetação de tundra antártica, Obrist et al. (2017) mostraram que o Hg encontrado é predominantemente proveniente de deposição atmosférica, com maior deposição no início da primavera, quando a vegetação cresce e nela se acumula o

Hg⁰. A deposição de Hg atmosférico foi também observada em florestas dos EUA (Risch et al., 2017) e da região amazônica que, por possuírem elevada área foliar e serem perenifólias são capazes de aprisionar o Hg atmosférico. O ciclo se completa com a queda das folhas que transferem o Hg atmosférico para o solo, onde pode novamente ser estocado ou absorvido pelas (Ericksen et al., 2003; Fostier et al., 2015).

Diante do exposto, a adsorção do Hg no solo, perdas por volatilização e proporção de acúmulo do metal nas raízes e na parte aérea das plantas podem variar de um local para o outro devido às características intrínsecas de cada região, principalmente relacionadas a fatores ambientais e atributos do solo, pode variar de acordo com o cada tipo de espécie vegetal e da associação com microrganismos resistentes a presença de Hg, que podem potencializar o processo de remediação do metal do solo.

5. Conclusão

O Latossolo Vermelho eutroférico utilizado, devido a suas características químicas, foi responsável pela maior retenção do mercúrio do que as plantas. Perdas por volatilização do Hg também foram consideradas.

O tratamento 6 que recebeu *Bacillus* sp. semanalmente, apresentou maior acúmulo do Hg na planta de milho (raiz e parte aérea). Já o tratamento 2, com *Enterobacter* sp., apresentou maior potencial de translocação do metal para a parte aérea da planta de milho.

Após serem mantidas por 44 dias em contato com o Hg, as plantas de milho apresentaram tolerância a alta concentração de Hg^{2+} sem apresentar sintomas visuais de toxicidade.

O milho foi capaz de acumular maior proporção do metal nas raízes do que na parte aérea da planta. Por esta razão, pode ser considerado como planta potencial estabilizadora de Hg^{2+} .

No entanto, outros estudos são necessários para identificar o potencial da associação destas bactérias com planta de milho para remediar Hg do solo e o efeito de sua aplicação em grandes áreas contaminadas.

Referências

Adriano DC (2001) Trace elements in terrestrial environments – Biogeochemistry, bioavailability and risk of metals, second ed. Springer, New York.

Amin A, Latif Z (2017) Cloning, expression, isotope labeling, and purification of transmembrane protein MerF from Mercury Resistant *Enterobacter* sp. AZ-15 for NMR studies. **Frontiers in Microbiology** 8:1-11.

Arbaoui S, Evlard A, Mhamdi MEW, Campanella B, Paul R, Bettaieb (2013) Potential of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and corn (*Zea mays* L.) for phytoremediation of dredging sludge contaminated by trace metals. **Biodegradation** 24:563-567.

Burges A, Alkorta I, Epelde L, Garbisu C (2018) From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. **Journal International Journal of Phytoremediation** 20:384-397.

Bussab WO, Morettin PA (Eds.) (2017) Estatística básica. São Paulo: Saraiva, 548p.

Carpi A, Fostier AH, Orta OR, Santos JC, Gittings M (2014) Gaseous mercury emissions from soil following forest loss and land use changes: Field experiments in the United States and Brazil. **Atmospheric Environment** 96:423-429.

Chen J, Dong J, Shen S, Mei J, Chang J (2019) Isolation of the Hg(II)-volatilizing *Bacillus* sp. strain DC-B2 and its potential to remediate Hg(II)-contaminated soils. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 94:1433-1440.

Chen SC, Lin WH, Chien CC, Tsang DCW, Kao CM (2018b) Development of a two-stage biotransformation system for mercury-contaminated soil remediation. **Chemosphere** 200:266-273.

Chen SC, Sheu YT, Surampalli RY, Zhang TC, Kao, CM (2018a) Application of microbial transformation to remediate hg-contaminated water: strain isolation and laboratory microcosm study. **Journal of Environmental Engineering** 144:1-11.

Dash HR, Sahu M, Mallick B, Das S (2017) Functional efficiency of MerA protein among diverse mercury resistant bacteria for efficient use in bioremediation of inorganic mercury. **Biochimie** 142:207-215.

Debeljak M, Elteren Tvan, Spruk A, Izmer A, Vanhaecke F, Vogel-Mikus K (2018) The role of arbuscular mycorrhiza in mercury and mineral nutrient uptake in maize. **Chemosphere** 212:1076-1084.

Debeljak M, Elteren van T, Vogel-Mikus K (2013) Development of a 2D laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry mapping procedure for mercury in maize (*Zea mays* L.) root cross-sections. **Analytica Chimica Acta** 787:155-162.

Durão Jr. WA, Palmiere HEL, Trindade MC, Branco OEA, Carvalho Filho CA, Fleming PM, Silva JBB, Windmüller CC (2009) Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Environmental Monitoring** 11:1056-1063.

Ericksen JA, Gustin MS, Schorran DE, Johnson DW, Lindberg SE, Coleman JS, (2003) Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. **Atmospheric Environment** 37:1613-1622.

Figueiredo NL, Canário J, O'driscoll NJ, Duarte A, Carvalho C (2016) Aerobic mercury-resistant bacteria alter mercury speciation and retention in the Tagus Estuary (Portugal). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 124:60-67.

Fostier AH, Melendez-Perez JJ, Richter L (2015) Litter mercury deposition in the Amazonian rainforest. **Environmental Pollution** 206:605-610.

Fu Z, Li W, Zhang Q, Zhang X, Song G, Fu Z, Ding D, Liu Z, Tang J (2014) Quantitative trait loci for mercury accumulation in maize (*Zea mays* L.) identified using a RIL population. **Plos One** 9:107243.

Giovanella P, Carbal L, Bento FM, Gianello C, Camargo FAO (2016) Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A. **New Biotechnology** 33:216-223.

Giri S, Dash HR, Das S (2014) Mercury Resistant bacterial population and characterization of *Bacillus* sp., isolated from sediment of solid waste discharged point of steel industry. **National Academy Science Letters** 37:237-243.

Harris-Hellal J, Grimaldi M, Garnier-Zarli E, Bousserhine N (2011) Mercury mobilization by chemical and microbial iron oxide reduction in soils of French Guyana. **Biogeochemistry** 103:223-234.

Hart MC, Elliott GN, Osborn AM, Ritchie DA, Strike P (1998) Diversity amongst *Bacillus* MerA genes amplified from mercury resistant isolates and directly from mercury polluted soil. **FEMS Microbiology Ecology** 27:73-84.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar** 19:683-689.

Leterme B, Jacques D (2015) A reactive transport model for mercury fate in contaminated soil—sensitivity analysis. **Environmental Science of Pollution Research** 22:16830-16842.

Magarelli G, Fostier AH (2005) Influence of deforestation on the mercury air/soil exchange in the Negro River Basin, Amazon. **Atmospheric Environment** 39:7518–7528.

Matsui K, Endo G (2018) Mercury bioremediation by mercury resistance transposon-mediated in situ molecular breeding. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102:3037-3048.

Melo WJ, Melo GMP, Melo VP, Bertipaglia LMA (1998) Experimentação sob condições controladas. Jaboticabal: Funep.

Melendez-Perez JJ, Fostier AH (2013) Assessment of Direct Mercury Analyzer® to quantify mercury in soils and leaf samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 24:1880-1886.

Murakami M, Ae N (2009) Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Hazardous Materials** 162:1185-1192.

Naik MM, Dubey SK (2017) Lead- and mercury-resistant marine bacteria and their application in lead and mercury bioremediation. **Marine Pollution and Microbial Remediation** 29-40.

Nakamura K, Fujisaki T, Tamashiro H (1986) Characteristics of Hg-resistant bacteria isolated from Minamata Bay sediment. **Environmental Research** 40:58-67.

Nakamura K, Fujisaki T, Shibata Y (1988) Mercury-resistant bacteria in the sediment of Minamata Bay. **Nippon Suisan Gakkaishi** 54:1359-1363.

Obrist D, Agnan Y, Olson MJCL, Colegrove DP, Hueber J, Moore CW, Sonke JE, Helming D (2017) Tundra uptake of atmospheric elemental mercury drives Arctic mercury pollution. **Nature International Journal of Science** 547:201-204.

Pérez-Flores P, Valencia-Cantero E, Altamirano-Hernández J, Pelagio-Flores R, López-Bucio, J (2017) *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. **Protoplasma** 254:2201-2213.

Purkan P, Nuzulla YF, Hadi S, Prasetyawati ET (2017) Biochemical properties of mercuric reductase from local isolate of *Bacillus* sp for bioremediation agente. **Molekul** 12:182-188.

Pushkar B, Sevak P, Singh A (2019) Bioremediation treatment process through mercury-resistant bacteria isolated from Mithi river. **Applied Water Science** 9:1-10.

Risch MR, Dewild JF, Gay DA, Zhang L, Boyer EW, Krabbenhoft DP (2017) Atmospheric mercury deposition to forests in the eastern USA. **Environmental Pollution** 228:8-18.

Sinha A, Khare SK (2012) Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. **Biodegradation** 23:25–34.

Sinha A, Kumar S, Khare SK (2013) Biochemical basis of mercury remediation and bioaccumulation by *Enterobacter* sp. EMB21. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 169:256-267.

Soares LC, Linhares LA, Egreja Filho FB, Windmüller CC, Yoshida MI (2015) Mercury content in soils of southeastern Brazil without anthropogenic influence and its correlation with soil characteristics. **Brazilian Journal of Soil Science** 29:903-914.

Tangahu BV, Abdullah SRS, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering** 2011:1-32.

Uraguchi S, Sone Y, Kamezawa M, Tanabe M, Hirakawa M, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M (2019) Ectopic expression of a bacterial mercury transporter MerC in root epidermis for efficient mercury accumulation in shoots of Arabidopsis plants. **Scientific Reports** 9:1-9.

Vamerali T, Bandiera M, Mosca G (2010) Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. **Environmental Chemistry Letters** 8:1-17.

Vivas A, Biró B, Németh T, Barea JM, Azcón R (2006) Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. **Soil Biology and Biochemistry** 38:2694-2704.

Wang D, Shi X, Wei S (2003) Accumulation and transformation of atmospheric mercury in soil. **Science of The Total Environment** 304:209-214, 2003.

Wang S, Pan S, Shah GM, Zhang Z, Yang L, Yang S (2018) enhancement in arsenic remediation by maize (*Zea mays* L.) using EDTA in combination with arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Ecology and Environmental Research** 16:5987-5999

Wang T, Sun H, Mao H, Zhang Y, Wang C, Zhang Z, Wang B, Sun L (2014) The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials** 278:483-490.

Wang XS, Li FY, He W, Miao HH (2010) Hg(II) removal from aqueous solutions by *Bacillus subtilis* biomass. **Clean- Soil, Air, Water** 38:44-48.

Yu Z, Li J, Li Y, Wang Q, Zhai X, Wu G, Liu P, Li X (2014) A mer operon confers mercury reduction in a *Staphylococcus epidermidis* strain isolated from Lanzhou reach of the Yellow River. **International Biodeterioration & Biodegradation** 90:57-63.

Zeng F, Ali S, Zhang H, Ouyang Y, Qiu B, Wu F, Zhang G (2011) The Influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. **Environmental Pollution** 159:84-91.