

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
VANESSA NESSNER KAVAMURA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *CEDRELA FISSILIS*
(ANGIOSPERMA) PARA RECUPERAÇÃO DE SOLOS
CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS

Mogi das Cruzes, SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
VANESSA NESSNER KAVAMURA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *CEDRELA FISSILIS*
(ANGIOSPERMA) PARA RECUPERAÇÃO DE SOLOS
CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS

Dissertação apresentada ao
Curso de Mestrado em
Biotecnologia da Universidade
de Mogi das Cruzes como parte
dos requisitos para a conclusão
do curso.

Área de Concentração: Ciências
Ambientais.

Orientadora: Dra. Elisa Esposito

Mogi das Cruzes, SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Kavamura, Vanessa Nessner

Avaliação do potencial de *Cedrela fissillis* (*Angiosperma*) para recuperação de solos contaminados por metais pesados / Vanessa Nessner Kavamura. -- 2008.

155 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Esposito

1. Metais pesados 2. Poluição do solo 3. *Cedrela fissillis* 4. Rizosfera 5. Microorganismos I. Título II. Esposito, Elisa

CDD 628.55

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

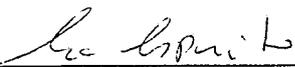
Às quatorze horas do dia seis de junho de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Avaliação do Potencial de Cedrela fissilis (Angiosperma) para Recuperação de Solos Contaminados por Metais Pesados" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Vanessa Nessner Kavamura**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Elisa Esposito e Vitor Fernandes Oliveira de Miranda da Universidade de Mogi das Cruzes e Fernando Dini Andreote da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/Meio Ambiente, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

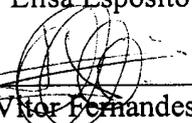
Mogi das Cruzes, 06 de JUNHO de 2008.

Comissão Examinadora

Julgamento



Prof.ª Dr.ª Elisa Esposito



Prof. Dr. Vitor Fernandes O Miranda



Prof. Dr. Fernando Dini Andreote

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))



(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

Dedico

A meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram em meu potencial. Muito obrigada por tudo. Ich liebe euch!

Ofereço

Oma, "ota" (em memória), ba e di, meus queridos avós...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, humildemente agradeço.

À Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e à FAPESP processo número 05/54617-2 pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento do material de pesquisa, respectivamente.

À minha orientadora, Dra. Elisa Esposito, que me acolheu e confiou em meu trabalho, muito obrigada por esses anos de amizade, incentivo e orientação.

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, muito obrigada pelos conselhos, dicas e correções imprescindíveis ao trabalho e também pelas facilidades concedidas no Laboratório de Genética de Microrganismos do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da UMC.

Ao Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, obrigada pelas dicas e correções e também pela concessão da utilização dos equipamentos para contagem de células epidérmicas e estômatos.

Ao Dr. Fernando Dini Andreote, obrigada pelos vários conselhos e correções que aprimoraram este presente trabalho e pela amizade conquistada!

À professora Maria Cecília Brandt, muito obrigada pelas dicas.

À Daniela Maria Piauilino Prates (Dani), que me auxiliou no isolamento dos microrganismos e em outras práticas laboratoriais. Agradeço também pelas horas de descontração.

À Rafaela Almeida Ferrari (Rafa), por sempre estar disposta a ajudar!

Ao técnico do Núcleo de Ciências Ambientais (NCA), Fábio Fernandes Carvalho Silva, pela ajuda no preparo dos materiais, meios e demais atividades!

À Clarissa Naomi Irie (Clá), pelo grande auxílio em tudo! Assim, não posso deixar de agradecer aos colegas (que ainda estão e que já passaram) pelo Laboratório de Química Biológica e Biotecnologia (LAQUIBBIO), com os quais dividi alegria, amizade, dedicação e trabalho: Beatriz de Oliveira (Bia), Bruno Haddad Paraventi, Caio César de Sousa Yoshioka, Cristiéle Silva Ribeiro (Cris), Daniel Pereira Borges Junior, Ecauê Pereira da Costa, Edelmar Chagas da Silva, Fernando Claret Oliveira, Gabriel Inácio de Moraes Honorato de Souza, João Paulo Slupko da Silva, Joel Alexandre Meira, Kelly Cristina Rosa, Letícia Hiromi Ozaki (Lê), Luís Fabiano Silva Araújo (Binho), Luciene Sousa, Marisa Soares de Almeida Reis, Maurício Takahama, Paola Lumazini de Moraes, Paulo Henrique Gomes Ferreira, Renata

Falque de Mello. Um agradecimento especial à Vanessa Ap. Rocha Oliveira Vieira (Van), pelo auxílio e discussão nas questões relacionadas à estatística!

Aos colegas conquistados dos outros laboratórios pertencentes ao NCA, obrigada por permitirem o uso de alguns equipamentos.

Ao pessoal do *Herbarium Mogiense*, Renata Lisboa e Thiago Lisboa Pereira, pelo auxílio no uso dos equipamentos de microscopia.

À Josimara da Silva Rosa (Josi), obrigada pelo auxílio em questões relacionadas à química!

À técnica do laboratório de microbiologia, Suzana Cristina Pinto, pelo auxílio em algumas técnicas microbiológicas.

À Danice Mazzer Luvizotto, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), que gentilmente ensinou algumas técnicas moleculares. Assim, não posso deixar de agradecer todo o pessoal do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ, que do mesmo modo, permitiu a realização de alguns experimentos em seu laboratório. À Dra. Joelma Marcon, muito obrigada pelas dicas!

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Microrganismos do NIB, que da mesma forma permitiu a realização dos experimentos, em especial à Emy Tiyo Mano, Almir José Ferreira e Flávia Mendes da Cunha Holanda, por todo o auxílio nas técnicas moleculares, obrigada de coração!

Aos meus familiares, pelo apoio e especialmente aos meus pais queridos, Teruo Kavamura e Maria Catarina Nessner Kavamura, que sempre me incentivaram nos estudos e em todas as questões que a vida nos proporciona, apoiando-me da melhor forma possível.

Ao Tomio, pelo carinho, companheirismo, auxílio e acima de tudo, pela compreensão nas horas em que permaneci realizando este trabalho.

*“Somos o que repetidamente fazemos.
A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito.”*

Aristóteles

RESUMO

A contaminação de solos por metais pesados tem sido amplamente estudada, pois os metais desempenham um papel importante em algumas reações celulares, entretanto, em altas concentrações ocasionam efeitos citotóxicos, afetando diretamente a microbiota do solo. Inúmeros métodos foram desenvolvidos de modo a descontaminar esses ambientes. Um método de biorremediação bastante promissor é a utilização de plantas (fitorremediação) em combinação com os microrganismos presentes na rizosfera (volume de solo adjacente à raiz) de plantas. Estes microrganismos apresentam mecanismos de transformações dos metais, tornando-os mais ou menos disponíveis à absorção pelas plantas. Assim, no presente trabalho foi proposto um estudo para avaliar o potencial de *Cedrela fissilis* (Angiosperma) na recuperação de um solo contaminado por metais pesados. O trabalho teve como objetivos específicos avaliar o crescimento de *Cedrela fissilis* em solo com diferentes concentrações de contaminação (0% - controle (não-contaminado); 30% contaminado; 60% contaminado e 100% contaminado); determinar o potencial de *Cedrela fissilis* para uso em programas de fitorremediação, por meio da bioacumulação de metais nos órgãos, assim como índice de translocação e remoção; determinar o efeito da contaminação por metais pesados no índice estomático de *Cedrela fissilis*; caracterizar as bactérias cultiváveis presentes em um solo contaminado por metais pesados e um solo controle através da técnica de seqüenciamento da região 16S DNAr; caracterizar as bactérias cultiváveis presentes na rizosfera de *Cedrela fissilis* e relacionar com o tempo de contato com os metais pesados no solo empregando a técnica de seqüenciamento da região 16S DNAr; determinar a resistência dos microrganismos isolados frente a Cd^{2+} , para enfim, determinar alguns parâmetros que possam posteriormente auxiliar em projetos de recuperação de solos contaminados por metais pesados. Os níveis dos metais presentes no solo contaminado não afetaram o crescimento de cedro, talvez devido ao fato de: os metais como Cu, Zn, B, Mn e Fe não estarem biodisponíveis em pH alcalino ou então de os microrganismos rizosféricos estarem produzindo quelantes capazes de complexar os metais, tornando-os indisponíveis à absorção pela planta; *Cedrela fissilis* pode ser adequada para programas de fitorremediação, devido aos elevados índices de translocação, tolerância aos metais em seus tecidos e índices de remoção superiores a 1% para Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn; o índice estomático de *Cedrela fissilis* não foi afetado pela contaminação; as amostras obtidas do solo controle e do solo contaminado por metais pesados afiliaram-se a representantes dos gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Rhodococcus* e *Serratia*; as amostras obtidas de solo rizosférico de *Cedrela fissilis* coletada no tempo zero, após um mês de plantio e após três meses em solo 100% contaminado, afiliaram-se a representantes dos gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Serratia*. A maior frequência de um grupo morfológico em detrimento de outro, pode estar relacionada à presença de contaminantes, visto que a frequência dos microrganismos foi afetada pela contaminação por metais pesados. Com relação à resistência a Cd^{2+} , alguns isolados mostraram-se mais resistentes que outros, como podendo ser utilizados em consórcio para um processo de rizerremediação.

Palavras-chave: Microrganismos, metais pesados, rizosfera, *Cedrela fissilis*.

ABSTRACT

The contamination of soils by heavy metals has been widely studied. They play an important role in some cellular reactions, however, in high concentrations they can cause cytotoxic effects, affecting the soil microbiota directly. Countless methods have been developed in order to decontaminate those environments. One very promising method of bioremediation is the use of plants (phytoremediation) in association with microorganisms that are indigenous to the rhizosphere (volume of soil near to roots) of plants. The microorganisms have mechanisms of metal transformations turning the metals into more or less available forms to the absorption by plants. In the present work it was proposed to evaluate the potential of *Cedrela fissilis* (Angiospermae) in the remediation of a soil contaminated by heavy metals. So, the work had specific goals such as evaluate the growth of *Cedrela fissilis* submitted to soil with different levels of contamination (0% - control (uncontaminated); 30% contaminated; 60% contaminated and 100% contaminated); determine the potential of *Cedrela fissilis* in phytoremediation programs, by measuring the bioaccumulation of metals in the tissues of the plant, as well as the translocation and removal indexes; determine the effect of contamination in the stomatal index of *Cedrela fissilis*; characterize the culturable bacteria present in a soil contaminated by heavy metals and in an uncontaminated one by sequencing the 16S rDNA region; characterize the culturable bacteria present in the rhizosphere of *Cedrela fissilis* and establish a relation with the time that they have been exposed to the heavy metals by sequencing the 16S rDNA region; determine the resistance of the microorganisms isolated to Cd²⁺, to determine some parameters that could be helpful in future projects of remediation of soils contaminated by heavy metals. The levels of metals present in the contaminated soil did not affect the growth of cedar, perhaps because of the fact that the metals such as Cu, Zn, B, Mn and Fe are not available in a basic pH or because the rhizospheric microorganisms are producing chelating agents that aggregate the metals, turning them unavailable to the absorption by plant; *Cedrela fissilis* can be an adequate model to phytoremediation programs, because of the high levels of translocation, tolerance to metals in its tissues and removal indexes higher than 1% to Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni and Zn; the stomatal index was not affected by the contamination; the samples obtained from the soil showed affiliation to representants of the genus *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Rhodococcus* and *Serratia*; the samples obtained from *Cedrela fissilis* rhizospheric soil showed affiliation to representants of the genus *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Serratia*. The higher frequency of a morphological group despite another can be related to the presence of contaminants, since the frequency of the microorganisms was affected by the heavy metal contamination. In relation to the Cd²⁺ resistance, some isolates showed to be more resistant than others, being able to be used in a consortium to a rhizoremediation process.

Keywords: Microorganisms, heavy metals, rhizosphere, *Cedrela fissilis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxicidade de íons metálicos em <i>E. coli</i> . O íon metálico mais tóxico testado está representado por mercúrio (Hg^{2+}) e o menos tóxico por manganês (Mn^{2+}). Fonte: Modificado de Mergeay et al. (1985).....	29
Tabela 2	Métodos de biorremediação, seus princípios e exemplos de algumas aplicações.....	33
Tabela 3	Descrição dos pontos de coleta amostrados na área de estudo e suas respectivas descrições.....	49
Tabela 4	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	58
Tabela 5	Análises realizadas no solo controle e no solo contaminado de uma média de três repetições.....	64
Tabela 6	Análises realizadas no solo controle e no solo contaminado de uma média de três repetições.....	65
Tabela 7	Análise de micronutrientes realizada no solo controle e no solo contaminado. Em vermelho, encontram-se os valores cujas concentrações de metais apresentam-se maiores no solo contaminado. Em azul, os valores cujos metais foram detectados apenas no solo contaminado. Valores obtidos de uma média de três repetições.....	66
Tabela 8	Comparação entre os valores orientadores para metais em solo estipulados pela Cetesb com os teores de metais totais obtidos no ponto 8 e no solo controle de uma média de três repetições.....	67
Tabela 9	Análise de macronutrientes realizada no solo controle e contaminado de uma média de três repetições.....	68
Tabela 10	Níveis de metais em plantas ($mg.g^{-1}$), demonstrando os teores normais e as concentrações críticas.....	75
Tabela 11	Coeficiente de impacto no teor proporcional (CITR) de metal entre a raiz (R) e a parte aérea (PA) de <i>Cedrela fissilis</i>	81
Tabela 12	Índice de remoção (%) de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn em mudas de <i>Cedrela fissilis</i> crescidas em solo controle e solo contaminado.....	83
Tabela 13	Frequência de bactérias (%) quanto à morfologia, coloração de Gram, existência da enzima catalase e potencial de fermentar a lactose de isolados de solo controle (CTR), solo contaminado (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3).....	85
Tabela 14	Número de isolados de espécies que apresentaram maior similaridade determinada pelo BLAST para seqüências de 16S DNAr obtidas de solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) e seus respectivos ribotipos.....	93

Tabela 15	Exemplos da ocorrência de microrganismos isolados em solos contaminados por diferentes metais pesados.....	94
Tabela 16	Exemplos da ocorrência de microrganismos isolados da rizosfera de diferentes espécies vegetais.....	96
Tabela 17	Índice de Shannon obtido para análise da comunidade microbiana obtida de solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3).....	101
Tabela 18	Exemplos de espécies de microrganismos capazes de tolerar altas concentrações de cádmio.....	104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema do perfil de um solo, mostrando os vários horizontes presentes. O horizonte O é caracterizado por uma camada de material vegetal não decomposto; o horizonte A é representado pelo solo superficial; o horizonte B é denominado de subsolo e o horizonte C constitui a base do solo. Fonte: Modificado de Brock et al. (1994)	20
Figura 2	Esquema da constituição de uma partícula de solo. Observe a presença de partículas de diferentes tamanhos, água, ar e matéria orgânica entre os espaços existentes, assim como a presença de microrganismos. Fonte: Modificado de Brock et al. (1994).....	21
Figura 3	Valores orientadores de metais pesados para solo e água no estado de São Paulo. Fonte: Cetesb (2005).....	26
Figura 4	Esquema das etapas fundamentais para o diagnóstico da contaminação de uma área.....	32
Figura 5	<i>Cedrela fissilis</i> selecionada para o estudo em questão, é uma espécie de porte arbóreo (A). Em B, detalhe para as folhas. Fonte: Lorenzi (1998).....	41
Figura 6	Esquema representando a raiz de uma planta. No detalhe, a raiz, com a linha pontilhada delimitando a rizosfera. Fonte: Modificado de The Vital Earth News (1996).....	42
Figura 7	Etapas da execução do estudo denominado avaliação do potencial de <i>Cedrela fissilis</i> (Angiosperma) para recuperação de solos contaminados por metais pesados, Mogi das Cruzes, SP, 2008.....	47
Figura 8	Esquema mostrando a localização da área de estudo, sendo pertencente à região metropolitana de São Paulo, cidade de Mogi das Cruzes. No detalhe, vista aérea da área de estudo, com mais de 48,4 hectares. Fonte: Modificado de Instituto Geográfico e Cartográfico (IGC).....	48
Figura 9	Imagem obtida de satélite da área de estudo, mostrando os pontos de coleta de solo da área de estudo representados pelos pontos 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6 e 8. Fonte: Modificado de Google Earth.....	49
Figura 10	Teores totais de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn (mg.g^{-1}) obtidos nos diferentes pontos de coleta de uma média de três repetições.....	62
Figura 11	Teor total de Fe (mg.g^{-1}) obtido nos diferentes pontos de coleta de uma média de três repetições.....	63
Figura 12	Ponto 8 localizado na área de estudo e selecionado para o estudo em questão. A e B – Malha de carvão, C – Cratera com material vitrocerâmico, D – Pneu queimado. Fotos da autora.....	64
Figura 13	Esquema do experimento realizado em uma casa de vegetação rústica montada no campus da UMC, mostrando as diferentes proporções de solo contaminado utilizadas (B) e o número realizado de repetições (A).....	69
Figura 14	Altura de <i>Cedrela fissilis</i> em centímetros, medida no tempo zero (inicial) e após três meses de plantio (final) em solo controle (0%), 30% contaminado, 60% contaminado e 100% contaminado, obtido de uma média de três plantas. As letras de tamanhos iguais no gráfico não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).....	70

Figura 15	A – Folhas de <i>Cedrela fissilis</i> crescendo em solo controle e B – Em solo contaminado. Observe que a coloração da planta crescendo em solo contaminado apresenta-se em um verde mais intenso.....	71
Figura 16	Imagem obtida através do programa Motic Images Plus 2.0, representando a folha de <i>Cedrela fissilis</i> , mais especificamente, a superfície abaxial, para realização de contagem de estômatos e células epidérmicas em uma área de 4,52 mm ² do campo de visualização.....	72
Figura 17	<i>Cedrela fissilis</i> coletada após seis meses de plantio e após lavagem com água de torneira. Observe na figura B a ausência de folhas em ambos os tratamentos.....	74
Figura 18	Gráfico demonstrando a massa seca (g) de <i>Cedrela fissilis</i> obtida de folha, caule e raiz (de uma média de três plantas por tratamento) após a secagem a 105°C. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	74
Figura 19	Alumínio (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	76
Figura 20	Cádmio (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	76
Figura 21	Cálcio (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	77
Figura 22	Cobre (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	77
Figura 23	Cromo (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	78
Figura 24	Ferro (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	78
Figura 25	Magnésio (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	79
Figura 26	Manganês (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).....	79
Figura 27	Níquel (mg.g ⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i>	

	após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).....	80
Figura 28	Zinco (mg.g^{-1}) determinado em folha, caule e raiz de <i>Cedrela fissilis</i> após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).....	80
Figura 29	Índice de translocação (%) de Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn em mudas de <i>Cedrela fissilis</i> crescidas em solo controle e solo contaminado.....	82
Figura 30	Densidade bacteriana por tratamento, obtida a partir do isolamento em tampão PBS e após diluição e inoculação em meio de cultura. Solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3). Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). As médias referem-se à análise de três repetições constituídas de plantas distintas.....	84
Figura 31	Resultado do gel após amplificação do gene 16S DNAr. Observe a banda que representa o fragmento amplificado de aproximadamente 1340 pares de base (pb). Os isolados estão representados pelos números.....	87
Figura 32	Técnica de ARDRA, com marcador molecular de 100 pares de base representado pela letra M. Quadrados coloridos representam alguns ribotipos obtidos, sendo o quadrado vermelho ribotipo A e quadrado azul escuro ribotipo C. Os isolados estão indicados pelo código seguido de um número.....	87
Figura 33	Frequência dos ribotipos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3).....	88
Figura 34	Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Firmicutes, mostrando a identificação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> . A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de <i>bootstrap</i> ($n = 1000$ réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.....	90
Figura 35	Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Proteobacteria, mostrando a identificação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de	

	<i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por <i>Bacillus megaterium</i> . A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de <i>bootstrap</i> (n= 1000 réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.....	91
Figura 36	Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Actinobacteria, mostrando a identificação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por <i>Bacillus megaterium</i> . A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de <i>bootstrap</i> (n= 1000 réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.....	92
Figura 37	Lixo encontrado na área de estudo proveniente tanto da construção civil quanto de lixo domiciliar. Fotos da autora.....	101
Figura 38	Frequência de bactérias (%) isoladas de solo controle (CTR), solo contaminado (CTM), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> no tempo zero (RZ0), rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após 1 mês de plantio (RZ1) e rizosfera de <i>Cedrela fissilis</i> após 3 meses de plantio (RZ3) com habilidade para crescer em diferentes concentrações de CdCl ₂ (mM).....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AIA – Ácido Indol Acético

APA – Área de Proteção Ambiental

ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado)

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CE – Células Epidérmicas

CESP – Companhia Energética de São Paulo

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CITR – Coeficiente de Impacto da contaminação no Teor Relativo

COSIM – Companhia Siderúrgica de Mogi das Cruzes

CTT – Cloreto de Trifenil Tetrazólio

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DO – Densidade Ótica

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DTPA – Ácido Dietileno Triamino Pentaacético

ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IE – Índice Estomático

IGC – Instituto Cartográfico e Geográfico

IR – Índice de Remoção

IT – Índice de Translocação

LAPEQ – Laboratório de Pesquisa em Química Analítica e Físico-Química

LAQUIBBIO – Laboratório de Química Biológica e Biotecnologia

ML – Malte-Levedura

MLA – Malte-Levedura-Agar

MO – Microscópio Óptico

NCA – Núcleo de Ciências Ambientais

NE – Número de Estômatos

NIB – Núcleo Integrado de Biotecnologia

PCBs – *Polychlorinated Biphenyls* (Bifenilas Policloradas)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação de Cadeia da Polimerase)

RDP – *Ribosomal Database Project*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RISA – *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*

TFSA – Terra Fina Seca ao Ar

TGGE – *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

T-RFLP – *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*

TSA – *Tryptone Soya Agar*

TSB – *Tryptone Soya Broth*

TTF – Trifenilformazam

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UMC – Universidade de Mogi das Cruzes

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O solo	20
1.1.1 Caracterização	20
1.1.2 Contaminação dos solos	22
1.1.2.1 Situação da contaminação no Brasil	23
1.1.2.2 Contaminação por metais pesados	24
1.1.3 Microbiota do solo – estrutura e ferramentas de análise	26
1.1.3.1 Microrganismos e a contaminação por metais pesados	29
1.1.4 Diagnóstico da qualidade do solo	31
1.2 Métodos de biorremediação	34
1.2.1 Fitorremediação	37
1.2.1.1 Plantas metalófitas	39
1.2.1.1.1 <i>Cedrela fissilis</i> Vell.	40
1.3 Interação entre microrganismos e plantas	42
1.3.1 Rizorremediação	44
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo geral	46
2.2 Objetivos específicos	46
3. MÉTODO	47
3.1 Área de estudo	47
3.2 Coleta das amostras de solo	50
3.2.2 Caracterização do solo	50
3.2.2.1 Caracterização físico-química	50
3.2.2.1.1 Determinação dos metais totais	50
3.2.2.1.2 Determinação dos metais biodisponíveis	51
3.2.2.1.3 Extração com DTPA dos metais biodisponíveis	51
3.2.2.2 Caracterização da atividade biológica	52
3.3 Ensaio da espécie vegetal selecionada	52
3.3.1 Plantio	52
3.3.2 Determinação do índice estomático de <i>Cedrela fissilis</i>	53

3.3.3	Determinação de metais pesados em folha, caule e raiz.....	54
3.4	Cultivo e isolamento de bactérias.....	55
3.4.1	Do solo.....	55
3.4.2	Da rizosfera	55
3.5	Identificação dos isolados bacterianos.....	56
3.5.1	Caracterização morfo-fisiológica	56
3.5.2	Identificação molecular	56
3.5.2.1	Extração de DNA genômico.....	56
3.5.2.2	Amplificação da região 16s DNAr.....	57
3.5.2.3	Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA - <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>).....	58
3.5.2.4	Purificação.....	59
3.5.2.5	Seqüenciamento e análise das seqüências.....	59
3.5.2.6	Construção dos dendrogramas.....	59
3.5.2.7	Cálculo do índice de diversidade.....	60
3.6	Ensaio dos microrganismos isolados frente a Cd ²⁺	60
3.7	Análise dos resultados	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	Caracterização físico-química	62
4.1.1	Do solo da área de estudo.....	62
4.1.2	Do solo do ponto 8 e do solo controle	63
4.1.2.1	Caracterização da atividade biológica.....	68
4.2	Ensaio da espécie vegetal selecionada.....	69
4.2.1	Plantio	69
4.2.2	Determinação do índice estomático de <i>Cedrela fissilis</i>	71
4.2.3	Determinação de metais em folha, caule e raiz.....	73
4.3	Cultivo e isolamento de bactérias.....	83
4.4	Identificação dos isolados bacterianos.....	84
4.4.1	Caracterização morfo-fisiológica	84
4.4.2	Identificação molecular	86
4.5	Ensaio dos microrganismos isolados frente a Cd ²⁺	102
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	105
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	137

APÊNDICES	141
------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SOLO

1.1.1 CARACTERIZAÇÃO

Pode-se definir o solo como a camada de material mineral que é usada pelas plantas para desempenho de suas funções (PAUL; CLARK, 1996), podendo ser dividido em quatro camadas principais denominadas horizontes O, A, B e C (Figura 1) (BROCK et al., 1994).

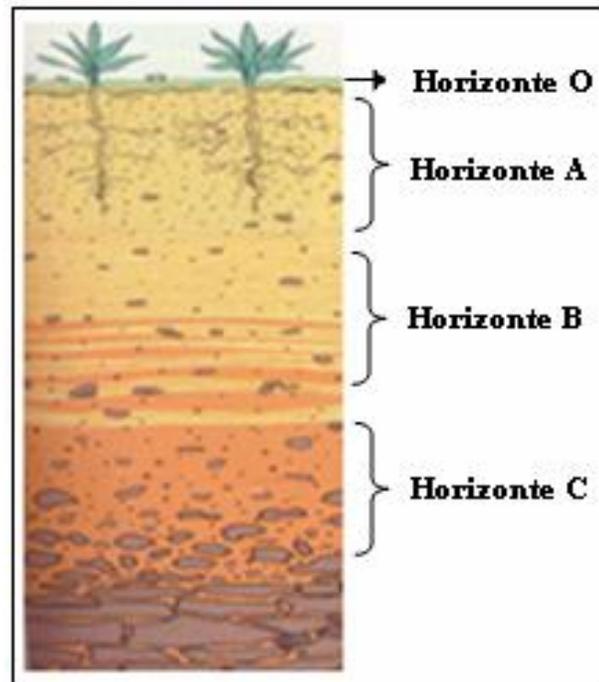


Figura 1 - Esquema do perfil de um solo, mostrando os vários horizontes presentes. O horizonte **O** é caracterizado por uma camada de material vegetal não decomposto; o horizonte **A** é representado pelo solo superficial; o horizonte **B** é denominado de subsolo e o horizonte **C** constitui a base do solo.

Fonte: Modificado de Brock et al. (1994).

Segundo Brock et al. (1994), o horizonte O é constituído de uma camada de material vegetal não decomposto; o horizonte A, superficial, é constituído de alta quantidade de matéria orgânica, sendo propício ao crescimento e desenvolvimento de plantas e microrganismos, sendo a atividade microbiana elevada. O horizonte B, denominado subsolo, é formado por minerais e substâncias lixiviadas das camadas superiores e é constituído por pouca matéria orgânica, tornando a atividade microbiana menor que na camada anterior. Por fim, há o horizonte C que se desenvolve diretamente a partir da camada inferior composta por rochas. A atividade microbiana, por sua vez, é geralmente muito reduzida.

Esta definição, embora simples, esconde uma intrincada relação entre os microrganismos, o solo e os vegetais, que juntos formam um sistema em equilíbrio. Segundo Teixeira et al. (2001) o solo é o produto das intempéries em conjunto com a ação da atmosfera, hidrosfera e a biosfera, consistindo numa mistura heterogênea de partículas minerais de diversas formas e tamanhos com alguns componentes como ar, água e substâncias dissolvidas entre os espaços existentes (Figura 2).

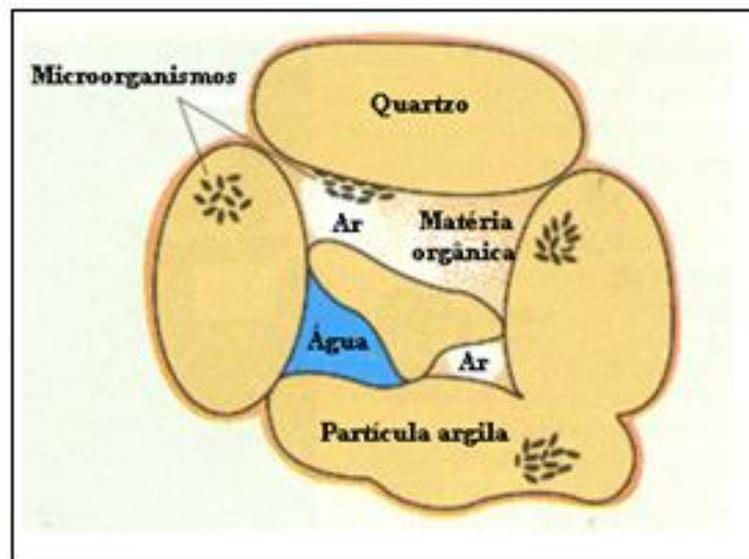


Figura 2 - Esquema da constituição de uma partícula de solo. Observe a presença de partículas de diferentes tamanhos, água, ar e matéria orgânica entre os espaços existentes, assim como a presença de microrganismos.

Fonte: Modificado de Brock et al. (1994).

Para sua caracterização, é necessário efetuar uma análise de parâmetros físico-químicos como: pH, umidade, estrutura, cor, presença de colóides e textura, por exemplo. Esta última dependerá da proporção de partículas diferentes presentes no solo e dependendo do tamanho destas, o solo pode ser arenoso, médio, argiloso, muito argiloso e siltoso (OLIVEIRA et al., 1992; PAUL; CLARK, 1996). Já a estrutura do solo é definida pelo tamanho, forma e arranjo das partículas e agregados de partículas (SMILES, 1988).

1.1.2 CONTAMINAÇÃO DOS SOLOS

Os solos, assim como os sistemas aquáticos, são alvos de inúmeros poluentes que podem variar tanto em composição, quanto em concentração. Estes poluentes invadem o sistema como resultado de inúmeras ações, como aplicações intencionais, práticas inadequadas de disposição de resíduos, derramamentos acidentais e padrões de uso do solo, por exemplo (KNAEBEL et al., 1994). Há a poluição por compostos inorgânicos como nitratos, fosfatos e perclorados, estes últimos provenientes do descarte inadequado de resíduos da manufatura de fogos de artifício e fósforo (NOZAWA-INOUE et al., 2005); explosivos como hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) e octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX) provenientes de sua manufatura e testes (KITTS et al., 1994); hidrocarbonetos monoaromáticos de petróleo como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (conhecidos como BTEX) provenientes de derramamentos superficiais de produtos de petróleo e vazamentos de tanques de armazenamento (ROONEY-VARGA et al., 1999); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) provenientes de derramamentos acidentais (WANG et al., 1990); herbicidas variados como diuron, linuron e chlorotoluron usados para o controle de ervas daninhas (FANTROUSSI et al., 1999) e ainda por metais pesados (GLICK, 2003).

1.1.2.1 Situação da contaminação no Brasil

De acordo com a Constituição Federal de 1988, título VII da ordem social, capítulo VI do meio ambiente, artigo 225, “Todos têm o direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações” (BRASIL, 1988).

Ainda, segundo a Lei Federal n. 6938, de 31 de agosto de 1981, artigo 3º, entende-se por poluição a degradação da qualidade ambiental resultante de atividade que direta ou indiretamente, a) prejudiquem a saúde, segurança e o bem-estar da população; b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; c) afetem desfavoravelmente a biota; d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente; e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos (BRASIL, 1981).

Deste modo, a contaminação dos solos é um tipo de poluição que além de causar danos à fauna e flora existentes, ocasionando um desequilíbrio no ecossistema, também pode afetar a população tanto direta, quanto indiretamente.

Segundo Cesteb (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (2007) com relação ao número de áreas contaminadas cadastradas no Estado de São Paulo foi observado um aumento no número de áreas contaminadas, partindo de 255 no ano de 2002, para 2272 em novembro de 2007. A principal fonte de contaminação (77% dos casos) provém de atividades realizadas por postos de combustíveis, seguida de 14% proveniente de atividades industriais e o restante, de outras atividades como comércio, resíduos e acidentes. Além da constatação das fontes de contaminação, também foram constatados os principais grupos de contaminantes, sendo observados os solventes aromáticos (1495 casos), combustíveis líquidos (1455 casos), HPAs (902 casos), metais pesados (276 casos), solventes halogenados (142 casos), dentre outros.

De modo a tentar descontaminar esses ambientes, as principais medidas de remediação implantadas para as áreas contaminadas no estado de São Paulo também foram determinadas pela Cetesb (2007), sendo o bombeamento para posterior tratamento a técnica mais usada (472 casos). A biorremediação, embora ainda pouco empregada (16 casos), é uma alternativa bastante viável em termos de custos, embora seu efeito não seja imediato.

1.1.2.2 Contaminação por metais pesados

O termo metal pesado é usado erroneamente, na maioria das vezes, para designar um grupo de metais e semi-metais associados à poluição e ao potencial de apresentar toxicidade ao meio ambiente (DUFFUS, 2002). O mesmo autor ainda revisa todas as definições encontradas para o termo baseadas na densidade, peso atômico, número atômico e toxicidade, persistindo na idéia de que agrupar os metais e certos compostos tóxicos em um único grupo, deve ser abandonada e, além disso, afirma que é necessária uma classificação dos metais e dos compostos, baseada nas propriedades químicas para fornecer bases para associar à sua toxicidade e por último, acredita que para se definir sua toxicidade, é necessária uma investigação sobre sua biodisponibilidade. De acordo com Alloway (1995), metal pesado é um termo aplicado a um grande grupo de elementos-traço, com densidade maior que 6g.cm^{-3} , importantes industrialmente e biologicamente.

A contaminação do solo por metais pesados tem sido constantemente relatada e estudada, pois os metais podem penetrar na cadeia trófica, desestruturando todo o sistema. Em humanos, sabe-se que a exposição prolongada a arsênico está ligada a um aumento no risco de câncer de pulmão. Acredita-se também que exposição a compostos de cromo hexavalente e níquel pode estar associada a câncer nasal e de pulmão (HAYES, 1997; SILVA; PEDROZO, 2001). Hengstler et al. (2003) observaram que a co-exposição a metais como o chumbo, pode causar efeitos genotóxicos. Já a exposição a manganês tem como órgãos-alvo os pulmões e o sistema nervoso central (MARTINS; LIMA, 2001). A exposição a cádmio pode levar a danos pulmonares e renais e até mesmo ao surgimento de câncer (CARDOSO; CHASIN, 2001). O cobre, embora em pequenas concentrações seja essencial a algumas atividades enzimáticas, atuando como cofator, altas doses deste metal podem ocasionar problemas gastrointestinais e danos hepático e renal, por exemplo, (PEDROZO; LIMA, 2001). Além de afetar a população humana, também pode afetar os animais e as plantas. Em estudo realizado com anfíbios expostos a alguns metais pesados, foi observado um atraso na metamorfose, além de redução da resposta de fuga a predadores (LEFCORT et al., 1998). Nas plantas, os metais podem causar alguns efeitos negativos, como atraso na divisão celular e redução do crescimento radicular (STEINKELLNER et al., 1998). Para se ter idéia do efeito fitotóxico de cádmio, por exemplo, foi realizado um

estudo sobre o efeito do metal em *Eucalyptus maculata* e após algumas semanas de tratamento, a espécie exibiu pontuações avermelhadas nas nervuras, clorose internerval, necrose, murchamento das folhas e escurecimento das raízes (SOARES et al., 2005).

De acordo com Glick (2003), a contaminação por metais pesados pode ser uma conseqüência de atividades industriais que lançam resíduos no solo e a longo prazo, promovem o acúmulo destes. A maioria das fontes de contaminação é proveniente de ação antropogênica como indústrias metalúrgicas e de mineração que têm problemas com estocagem, descarte e transporte dos minérios (ADRIANO, 1986). Entre os metais encontrados com maior freqüência, é possível citar cádmio, chumbo, cobalto, cobre, mercúrio, níquel, selênio e zinco. Para cádmio, chumbo, cobre e zinco, a toxicidade aumenta conforme a ordem: chumbo < zinco < cobre < cádmio (BÅÅTH, 1989), sendo dependente de inúmeros fatores abióticos e bióticos.

De modo a nortear as medidas de remediação a serem tomadas, as agências governamentais disponibilizam valores de referência, prevenção e intervenção. Por exemplo, a Cetesb estipulou alguns valores para águas subterrâneas e solos contaminados por metais pesados (Figura 3), sendo que para cádmio, por exemplo, o valor de referência é menos que $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$; valor de prevenção é de $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ e uma medida de intervenção é necessária quando o valor for de 3 mg.kg^{-1} para áreas agrícolas e 20 mg.kg^{-1} para áreas industriais (CETESB, 2005).

Substância	CAS Nº	Solo (mg.kg ⁻¹ de peso seco) ⁽¹⁾					Água Subterrânea (µg.L ⁻¹) Intervenção
		Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção			
				Agrícola APMax	Residencial	Industrial	
Inorgânicos							
Alumínio	7429-90-5	-	-	-	-	-	200
Antimônio	7440-36-0	<0,5	2	5	10	25	5
Arsênio	7440-38-2	3,5	15	35	55	150	10
Bário	7440-39-3	75	150	300	500	750	700
Boro	7440-42-8	-	-	-	-	-	500
Cádmio	7440-48-4	<0,5	1,3	3	8	20	5
Chumbo	7440-43-9	17	72	180	300	900	10
Cobalto	7439-92-1	13	25	35	65	90	5
Cobre	7440-50-8	35	60	200	400	600	2.000
Cromo	7440-47-3	40	75	150	300	400	50
Ferro	7439-89-6	-	-	-	-	-	300
Manganês	7439-96-5	-	-	-	-	-	400
Merúrio	7439-97-6	0,05	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	7439-98-7	<4	30	50	100	120	70
Níquel	7440-02-0	13	30	70	100	130	20
Nitrato (como N)	797-55-08	-	-	-	-	-	10.000
Prata	7440-22-4	0,25	2	25	50	100	50
Selênio	7782-49-2	0,25	5	-	-	-	10
Vanádio	7440-62-2	275	-	-	-	-	-
Zinco	7440-66-6	60	300	450	1000	2000	5.000

Figura 3 - Valores orientadores de metais pesados para solo e água no estado de São Paulo.
Fonte: Cetesb (2005).

1.1.3 MICROBIOTA DO SOLO - ESTRUTURA E FERRAMENTAS DE ANÁLISE

O solo, assim como vários outros ecossistemas existentes, é um importante *habitat* para milhares de organismos macro e microscópicos que a ele estão associados. Dentre os seres microscópicos, há uma grande diversidade de fungos, actinobactérias, algas, protozoários e bactérias dos mais variados tipos fisiológicos como autotróficas e heterotróficas, mesófilas e termófilas, aeróbias e anaeróbias, entre outras (PELCZAR et al., 1981). Os microrganismos podem ocorrer em associação com partículas de argila ou matéria orgânica, e ainda, na rizosfera de plantas e em pequenas colônias nos pequenos poros entre as partículas de solo (FOSTER, 1988). Em termos quantitativos, os microrganismos existentes no solo podem variar com a profundidade deste, sendo que a densidade microbiana torna-se reduzida à medida que a profundidade do solo torna-se maior (ALEXANDER, 1977). Kuske et al. (2002) realizaram uma contagem de bactérias em solo árido, observando que na camada mais superficial (0-10 cm) a contagem foi significativamente maior que na profundidade de 20-30 cm e também, que a

quantidade de DNA extraído foi reduzida com o aumento da profundidade. Além disso, a culturabilidade também decresce com o incremento da profundidade (SAIT et al., 2002). Torsvik e Goksoyr (1990) concluíram que a diversidade genética bacteriana presente no solo de uma floresta decídua é extremamente elevada, com identificação de cerca de 4000 genótipos diferentes, excluindo-se aqueles cujas bactérias não são cultiváveis. Recentemente foi discutido por Gewin (2006) a emergência de uma nova era na ecologia microbiana baseando-se na genômica, onde se espera seqüenciar o genoma do solo (visto que em torno de 99% dos microrganismos não são cultiváveis) para se descobrir a diversidade presente, para então elucidar os mecanismos de como as comunidades microbianas participam dos processos ecológicos .

As técnicas para obtenção de informações a respeito das comunidades microbianas presentes no solo podem ser baseadas tanto nos métodos dependentes, quanto nos independentes de cultivo. Entretanto, os métodos dependentes de cultivo, são conhecidos por sua seletividade e não representam a real diversidade existente (AMANN et al., 1995). Portanto, devido a essas limitações, torna-se necessária a utilização complementar de ferramentas moleculares de identificação.

Assim sendo, a complexidade das interações existentes em diferentes *habitat* pode ser estudada utilizando-se métodos moleculares baseados na utilização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), por exemplo. Dentre estas técnicas encontram-se: a) DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*); b) TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*); c) RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); d) ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); e) T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*); f) RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*); g) Caracterização por microsátélites (KIRK et al., 2004). Além disso, a disponibilidade de um grande número de seqüências da região do gene 16S ribossomal (16S DNAr) depositadas em um banco de dados - RDP (*Ribosomal Database Project*) (<http://rdp.cme.msu.edu>) tem permitido que essa informação molecular seja amplamente utilizada para o agrupamento filogenético. A associação entre estrutura da comunidade com sua atividade e funcionalidade nos sistemas ambientais constitui o foco central de estudo na essência da ecologia microbiana.

A técnica de ARDRA envolve a digestão com enzimas de restrição específicas de seqüências de 16S DNAr amplificadas por PCR, seguida de separação dos fragmentos clivados em géis de agarose (RANJARD et al., 2000). Esta técnica tem sido amplamente usada no estudo

de alterações genéticas em comunidades microbianas submetidas a mudanças nas condições ambientais ou exposições a compostos exógenos tóxicos (SMIT et al., 1997). Outra técnica também bastante usada é a DGGE que se baseia na amplificação por PCR, entretanto, não necessita de uma biblioteca de clones. Esta técnica identifica diferenças estabelecidas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA que, submetida a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (uréia e formamida), se separa em fragmentos, formando um padrão de bandas. Tem sido amplamente usada em estudos onde é realizada uma comparação da estrutura genética de comunidades microbianas de diferentes tipos de solos e também naqueles submetidos a distúrbios ambientais (RANJARD et al., 2000).

Deste modo, através de alguns métodos como extração de DNA, amplificação da região 16S DNAr e seqüenciamento de DNA, conseguiu-se caracterizar linhagens pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (JANSSEN et al., 2002; JOSEPH et al., 2003; SAIT et al., 2002), além dos filos *Verrucomicrobia* (JANSSEN et al., 2002; JOSEPH et al., 2003) e *Gemmatimonadetes* (JOSEPH et al., 2003). Além desses filos, em solo contaminado por metais pesados foram encontrados os seguintes gêneros: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brochothrix*, *Comamonas*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rathayibacter*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Variovorax* e *Xanthomonas* (ELLIS et al., 2003).

Entretanto, a existência desses microrganismos pode ser influenciada por vários fatores como a presença de nutrientes, o pH e principalmente o teor de umidade e a temperatura (ROITMAN et al., 1991; ZILLI et al., 2003). Alexander (1977) também cita que a aeração, o cultivo, a estação e a profundidade são fatores relevantes. Além disso, a composição de bactérias de solo de regiões tropicais difere daquela de regiões temperadas (GILLER et al. 1997), sendo maior nas áreas com clima mais quente (ALEXANDER, 1977). Øvreas e Torsvik (1998) demonstraram que a diversidade bacteriana é maior em solos orgânicos do que em solos arenosos. Em estudo realizado por Silva e Nahas (2002), foi comprovado que a diversidade bacteriana foi aumentada nas amostras submetidas à calagem, diferentes cultivos de plantas e em solos não fertilizados.

O tamanho das partículas de solo também pode alterar a estrutura da comunidade microbiana, sendo que a riqueza tende a ser maior em frações de solos com partículas menores (SESSITSCH et al., 2001). A microbiota associada ao solo desempenha importante função na

reciclagem de compostos orgânicos, sendo que a grande diversidade é responsável por exercer um efeito positivo na eficiência da ciclagem de nutrientes, contribuindo no aumento dos processos ecológicos do ecossistema, promovendo, deste modo, a manutenção da boa qualidade do solo (LOREAU, 2001).

1.1.3.1 Microrganismos e a contaminação por metais pesados

Os metais desempenham algumas importantes funções em determinadas reações bioquímicas, sendo essenciais ao crescimento e desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais (HIGGINS; BURNS, 1975). Entretanto, em altas concentrações, os metais podem formar complexos inespecíficos nas células, ocasionando efeitos citotóxicos (NIES, 1999). Além disso, os metais apresentam diferenças com relação à sua importância biológica, pois cátions trivalentes ou tetravalentes como cério, estanho, gálio, tório e zircônio não apresentam influência biológica. Ferro, manganês e molibdênio são importantes elementos-traço e apresentam baixa toxicidade. Cobalto, cobre, cromo, níquel, tungstênio, vanádio e zinco são tóxicos com alta importância como elementos-traço. Já antimônio, arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio, prata e urânio, são altamente tóxicos, possuindo função biológica bastante limitada. Mergeay et al. 1985 testaram a concentração inibitória mínima (CIM) de alguns íons metálicos para *Escherichia coli*, estando os resultados representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Toxicidade de íons metálicos em *E. coli*. O íon metálico mais tóxico testado está representado por mercúrio (Hg^{2+}) e o menos tóxico por manganês (Mn^{2+}).

CIM (mM)	Íons metálicos
0,01	Hg^{2+}
0,02	Ag^+ , Au^{3+}
0,2	Pd^{2+}
0,5	Pt^{4+} , Cd^{2+}
1,0	Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}
2,0	Tl^+ , La^{3+} , Y^{3+} , Sc^{2+} , Ru^{3+} , Al^{3+}
5,0	Pb^{2+} , Ir^{3+} , Os^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{2+} , In^{3+} , Rh^{2+} , Ga^{3+} , Cr^{3+} , V^{3+} , Ti^{3+} , Be^{2+}
10,0	Cr^{2+}
20,0	Mn^{2+}

Fonte: Modificado de Mergeay et al. (1985).

Sabe-se que a alta concentração de metais pesados pode afetar diretamente a microbiota do solo por meio da modificação da diversidade e atividade. Entretanto, é comprovado que fungos e bactérias são afetados diferentemente pela toxicidade apresentada pelos metais pesados (RAJAPAKSHA et al., 2004). Em um estudo realizado por Kandeler et al. (1996), foi observado que a elevação na concentração de metais pesados no solo tem influência negativa sobre a atividade da biomassa microbiana, resultando em uma redução na diversidade funcional da comunidade de microrganismos existentes no solo. Em outro estudo que corrobora a afirmação, foi observada uma significativa redução na atividade de algumas enzimas quando submetidas a altas concentrações de metais pesados no solo (KANDELER et al., 2000) como desidrogenase, fosfatase ácida e β -glucosidase (LEE et al., 2002). Valsecchi et al. (1995) observaram um efeito adverso dos metais na microbiota do solo, pois à medida que a concentração de metais era elevada, foi observado um aumento no acúmulo de matéria orgânica, devido à microbiota ser menos efetiva na mineralização da matéria orgânica do solo mediante a contaminação. Nordgren et al. (1983) estudaram a atividade de alguns fungos presentes em um solo com altos teores de cobre e zinco, concluindo haver uma redução da biomassa, respiração e comprimento dos micélios, além de alteração na composição das espécies. Além disso, na presença de metais pesados, alguns fungos micorrízicos arbusculares apresentam uma redução na germinação dos esporos e essa redução é proporcional ao aumento na concentração de metais (DEL VAL et al., 1999). Babich e Stotzky (1977) estudaram a tolerância de alguns fungos a altas concentrações de cádmio, concluindo que *Cunninghamella echinulata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* e *Trichoderma viride*, toleraram o metal e, além disso, a presença de montmorillonita, um tipo de argila, ofereceu proteção parcial ou total contra o efeito fungicida de cádmio.

De modo a sobreviver sob condições estressantes de metais, os microrganismos desenvolveram mecanismos de tolerância aos metais, incluindo o efluxo de metais para o exterior da célula, acúmulo e complexação destes intracelularmente e redução a formas menos tóxicas (NIES, 1999). Além disso, vêm sendo desenvolvidas pesquisas que estudam essa resistência (SILVER; PHUNG, 1996) possivelmente devido à produção de quelantes que agrupam os metais e reduzem sua toxicidade às plantas (CROWLEY et al., 1991) devido à forte capacidade de ligação aos metais (BIRCH; BACHOFEN, 1990) além de mecanismos de tolerância e de desintoxicação (GADD; GRIFFITHS, 1977). Há compostos que se combinam a alguns metais, seqüestrando-os em solução, denominados agentes quelantes, que podem agrupar chumbo, ouro e

urânio em plantas, aumentando a solubilidade do metal e conseqüentemente, sua translocação da raiz para a parte aérea (McGRATH, et al., 2001). Há também outros agentes quelantes que aumentam a dissolução de ferro e sua mobilidade e biodisponibilidade. Na tentativa de estudar a capacidade de produção desses agentes por *Pseudomonas aeruginosa*, a bactéria foi exposta a altas concentrações de tório e urânio, observando uma produção de vários agentes (PREMUZIC et al., 1985). Foram identificados sideróforos denominados em inglês de *pyoverdines* em *Pseudomonas fluorescens* com alta afinidade por Fe^{3+} (MIRLEAU et al., 2001). Em estudo com *Bacillus megaterium*, com o aumento da concentração de alumínio, foi observado um aumento na produção de sideróforos, corroborando o fato de eles serem quelantes de alumínio (HU; BOYER, 1996). Shenker et al. (2001) observaram que a adição de fitosideróforos – compostos quelantes produzidos pelas plantas em resposta a uma deficiência de nutrientes, não apenas facilitou a absorção de ferro, como também a translocação e acumulação de outros íons no tecido vascular de trigo e cevada. Além das bactérias, há relato da produção de sideróforos por um fungo ectomicorrízico do gênero *Wilcoxina* (PRAHBU et al., 1996). Muitos fungos produzem uma grande variedade de sideróforos que abrangem diferentes propriedades físico-químicas, o que os possibilita viver em ambientes adversos (GUENTHER, 2007).

1.1.4 DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO SOLO

A avaliação de uma área supostamente contaminada pode ser esquematizada conforme mostrado na Figura 4. As análises físico-químicas, geomorfológicas e biológicas são imprescindíveis para verificar o estado de um solo, facilitando a tomada de decisões com relação aos métodos de recuperação ambiental adequados à situação.

Constatando-se a não-contaminação de uma área, o solo não necessitará de quaisquer medidas de descontaminação, podendo ser imediatamente utilizado. Há casos em que o solo encontra-se impactado por algum contaminante e concomitantemente está ocorrendo um processo de atenuação natural, onde os microrganismos existentes naquele local estão degradando o poluente. Nestes casos, há apenas a necessidade de se realizar um monitoramento de modo a checar periodicamente os níveis de contaminação e realizar algumas análises físico-químicas para

verificar se as condições do solo ainda são propícias ao desenvolvimento dos microrganismos e biológicas, checando sua atividade. Por fim, se a contaminação for constatada em níveis muito elevados e os processos de atenuação natural não forem possíveis (como no caso de contaminação por metais pesados, que não são biodegradados), é necessário realizar uma análise de todas as características deste local, assim como do nível da contaminação, para recorrer a algum método de remediação. São muitos os métodos propostos, tanto físicos, químicos quanto biológicos. Entretanto, serão discutidos aqui apenas os biológicos. A Tabela 2 mostra alguns métodos de biorremediação e sua aplicabilidade.

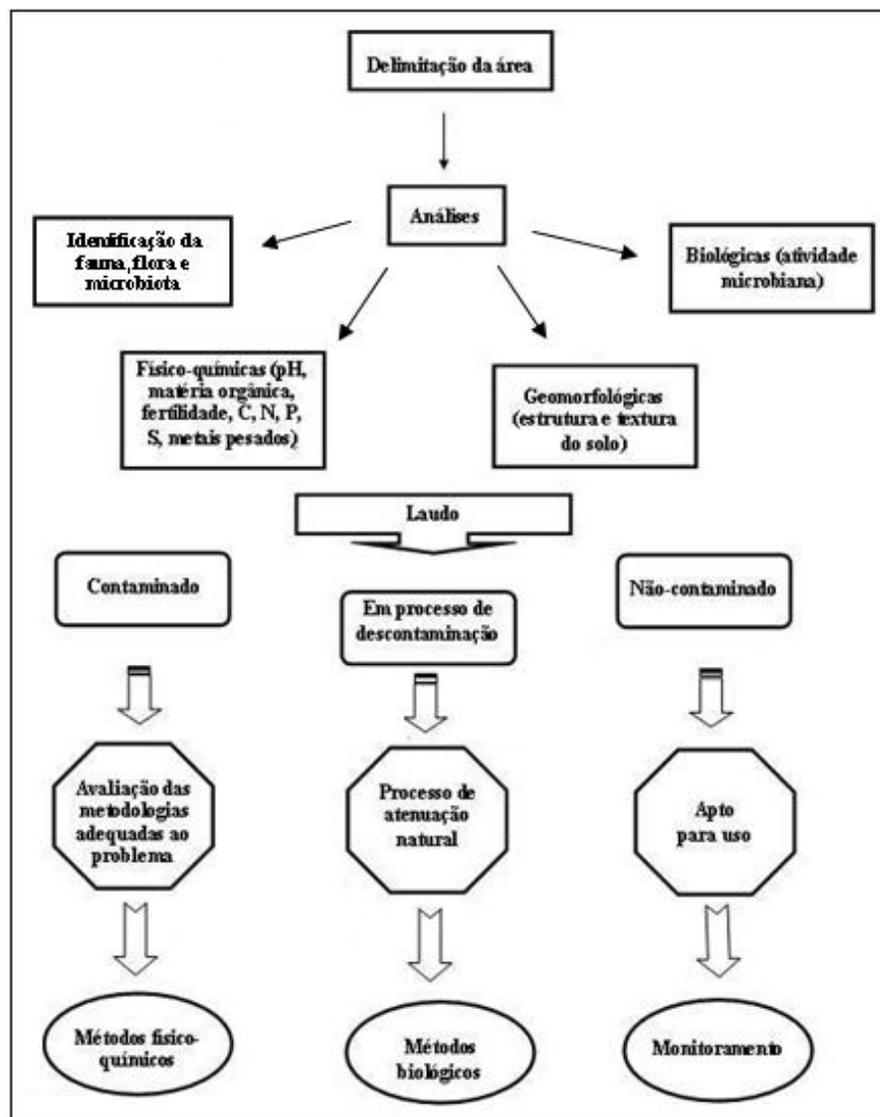


Figura 4 - Esquema das etapas fundamentais para o diagnóstico da contaminação de uma área.

Tabela 2 - Métodos de biorremediação, seus princípios e exemplos de algumas aplicações.

Métodos	Princípios	Exemplos de Aplicações
Atenuação natural	Existência de microrganismos nativos capazes de degradar os contaminantes	Solo contaminado por óleo diesel (MARGESIN; SCHINNER, 2001)
Bioaugmentação	Adição de microrganismos exógenos para dar início à degradação	Aquíferos contaminados por pentaclorofenóis (STORMO; CRAWFORD, 1992).
Bioestimulação	Adição de nutrientes que estimulam o crescimento e desenvolvimento de microrganismos nativos, aumentando a atividade metabólica e desta forma a degradação	Aquífero contaminado por urânio (ANDERSON et al., 2003)
Biolixiviação ou Biohidrometalurgia	Microrganismos específicos como <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> e <i>T. thiooxidans</i> promovem a solubilização de metais	Solo contaminado por metais pesados (WHITE et al., 1998)
Biofiltros	Aplicação de bactérias em filtros para descontaminação de águas contaminadas	Água contaminada por tricloroetileno (TAYLOR et al., 1992)
Biopilhas	O material a ser tratado é amontoado e a ele são adicionados nutrientes e ar	Solo contaminado por hidrocarbonetos (MOHN et al., 2001)
Biossorção	Adsorção de metais e outros íons de uma solução aquosa por meio de materiais biológicos	Biossorção de cádmio por <i>Trichoderma reesei</i> (KIM et al., 2003)
Bioventilação	Combinação de ventilação do solo que remove os componentes voláteis do solo com biorremediação que utiliza o oxigênio da ventilação do ar para degradação dos contaminantes orgânicos remanescentes	Solo contaminado por hidrocarbonetos (LEE; SWINDOLL, 1993; ZENKER et al., 2005); compostos orgânicos (SUI et al., 2007)
Compostagem	Solo é adicionado de nutrientes, e então é misturado para aeração do material, com conseqüente ativação dos microrganismos nativos	Solo contaminado por creosoto (AHTIAINEN et al., 2002); trinitrotolueno (TNT) (BRUNS-NAGEL et al., 1998)
Fitorremediação	Uso de plantas para extrair, seqüestrar e / ou descontaminar os poluentes do solo ou sistemas aquáticos	Solo contaminado por herbicida atrazina (BURKEN; SCHNOOR, 1996); Solo contaminado por arsênico (VISOOTTIVISETH et al., 2002)
<i>Landfarming</i>	Solo é organizado em leiras e periodicamente revirado por práticas agrícolas para estimular a degradação pelos microrganismos existentes	Solo contaminado por PAHs (AL-AWADHI et al., 1996; JACQUES et al., 2007; MANCINI et al., 2005; SAADOUN; AL-GHZAWI, 2005)
Rizorremediação	Planta libera exsudatos que ocasionarão um aumento dos microrganismos rizosféricos, auxiliando no crescimento da planta e na degradação dos contaminantes	Solo contaminado por tricloroetileno (YEE et al., 1998); bifenilas policloradas (PCBs) (VILLACIEROS et al., 2005); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (MOLOBELA, 2005)

1.2 MÉTODOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos para degradar ou transformar contaminantes em suas formas menos tóxicas (VIDALI, 2001). A técnica é baseada na premissa da existência de uma imensa variedade de microrganismos que têm a capacidade de degradar ou modificar quimicamente moléculas orgânicas e inorgânicas (NESTER et al., 1995). Foi primeiramente empregada em 1988 para limpar resíduos industriais tóxicos e posteriormente em casos de derramamento de petróleo (SAADOUN; AL-GHZAWI, 2005; TORTORA et al., 2003).

As estratégias de biorremediação podem ser aplicadas *in situ* ou *ex situ*, dependendo do local em que serão aplicadas. *In situ* é o tratamento realizado no local da contaminação e *ex situ*, é aquele em que há remoção da água ou solos contaminados para posterior tratamento (GRUIZ; KRISTON, 1995; SAADOUN; AL-GHZAWI, 2005; SASIKUMAR; PAPINAZATH, 2003; VIDALI, 2001).

Há uma enorme variedade de tecnologias desenvolvidas nos últimos anos como a biosorção, ou seja, ligação de metais à superfície celular de bactérias (VECCHIO et al., 1998) e lixiviação de metais por algumas bactérias. Esta última consiste na recuperação de metais por microrganismos que são capazes de dissolvê-los do meio (GARCIA JR., 1997). Neste caso, é possível citar o gênero *Thiobacillus* que pode realizar a lixiviação microbiológica de metais como cobre, prata, urânio e zinco através da oxidação dos componentes, causando a liberação de prótons que podem substituir os metais adsorvidos às partículas de solo, ou então, oxidação, seguida de transferência de elétrons ao oxigênio, ocasionando a solubilização dos metais (RULKENS et al., 1995). A técnica denominada *landfarming* é empregada com sucesso, especialmente em solos contaminados por petróleo (AL-AWADHI et al., 1996; JACQUES et al., 2007; MANCINI et al., 2005; SAADOUN; AL-GHZAWI, 2005). Al-Awadhi et al., (1996) reportaram uma redução de mais de 80% no teor de HPAs em solo após 15 meses de tratamento. Recentemente Jacques et al. (2007) caracterizaram um consórcio microbiano isolado de processos de *landfarming* de petróleo, eficiente na degradação de HPAs. A compostagem também pode ser empregada na descontaminação de solos com HPAs. Ahtiainen et al. (2002) observaram uma redução significativa tanto na concentração total de HPAs quanto na sua toxicidade após cinco meses de tratamento. Já Bruns-Nagel et al. (1998) realizaram a

compostagem, tanto aeróbica quanto anaeróbica para descontaminação de solo contendo trinitrotolueno (TNT) e não obtiveram o mesmo sucesso, pois foi detectada a transformação de grande parte do composto em outros metabólitos de difícil degradação. Há ainda a técnica de bioventilação, que pode ser aplicada *in situ*, onde a ventilação fornece oxigênio para que o processo de biorremediação tenha início (LEE; SWINDOLL, 1993). Zenker et al. (2005) avaliaram o uso passivo da técnica de bioventilação numa refinaria de petróleo, sendo o método ideal para locais que apresentam ventos com velocidade média acima de 24 km.h⁻¹. Suko et al. (2006) estudaram o fenômeno de transporte de solutos voláteis em solo durante a aplicação da tecnologia de bioventilação e demonstraram que a volatilização tem um papel preponderante nos primeiros dias seguindo-se da biodegradação após este período. A simulação da remediação de vários contaminantes orgânicos simultaneamente por bioventilação foi estudada por Sui et al. (2007).

Na tentativa de descontaminar um solo poluído por óleo diesel pelo uso de veículos motorizados no preparo das corridas de esqui, Margesin e Schinner (2001) compararam o processo de atenuação natural e o de bioestimulação com fertilizante N-P-K, observando que o solo fertilizado teve uma perda de cerca de 72% da contaminação contra aproximadamente 50% do solo não-fertilizado (isto é, solo submetido à atenuação natural) após a terceira temporada de verão. Entretanto, concluíram que a bioestimulação foi mais efetiva durante o primeiro verão, sendo que seus efeitos positivos não duraram até a conclusão dos estudos, enquanto que o processo de atenuação natural tanto no segundo verão quanto no terceiro, promoveu altas taxas de desaparecimento do óleo, provando ser efetivo por longos períodos.

Há ainda o uso de tecnologias alternativas como a que foi empregada por Grman et al. (2001), em que foi utilizado o EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) combinado a algumas espécies de plantas na tentativa de aumentar a extração de metais pesados como cádmio, chumbo e zinco do solo. A técnica foi eficiente com relação à fitoextração de metais por *Brassica rapa*, sendo observada uma maior concentração dos metais na parte aérea da espécie, reduzindo significativamente a concentração desses metais nas raízes. Entretanto, o uso do EDTA foi tóxico para *Trifolium pratense* e inibiu também a formação de micorrizas. Margesin e Schinner (1998) utilizaram a bioestimulação de microrganismos pela adição de nutrientes inorgânicos a uma temperatura de 10°C para descontaminação de wastewater contaminada com surfactantes aniônicos como SDS (*Sodium Dodecil Sulphate*) e óleo diesel. Conte et al. (2005) testaram a

utilização de água, dois surfactantes sintéticos e um surfactante natural (ácido húmico) na lavagem de um solo contaminado por HPAs, concluindo que a utilização do ácido húmico parece ser a melhor alternativa devido ao fato do surfactante natural ser capaz de promover a atividade microbiana, podendo proporcionar a longo prazo, uma atenuação natural. No caso da contaminação de sedimentos e água por selênio, Frankenberger; Arshad (2001) observaram que *Enterobacter cloacae* é bastante ativa na redução de oxiânions tóxicos de selênio em sua forma menos tóxica e insolúvel, sendo uma alternativa de biorremediação bastante viável. Outra técnica muito interessante é a aplicação da bactéria metanotrófica *Methylosinus trichosporium* em filtros (biofiltros) para a descontaminação de água contaminada com tricloroetileno (TAYLOR et al., 1992).

As técnicas, além de representarem uma tecnologia emergente, apresentam a grande vantagem de serem mais baratas quando comparadas aos métodos tradicionais de remediação, pois, na maioria das vezes, utilizam os microrganismos nativos existentes capazes de degradar os compostos. Mas em vários estudos realizados, houve a necessidade de inocular bactérias juntamente com nutrientes, para aumentar o potencial de degradação de poluentes, resultando num resultado efetivo. Mishra et al. (2001), observaram que a adição de nutrientes e de consórcio bacteriano aprimorou as condições físico-químicas do solo contaminado com óleo. O desenvolvimento de inóculos bacterianos encapsulados tem obtido bons resultados, podendo estes inóculos serem aplicados em processos de biorremediação de aquíferos contaminados com pentaclorofenóis, por exemplo (STORMO; CRAWFORD, 1992). Entretanto, há algumas desvantagens, como os efeitos apenas poderão ser observados a longo prazo; a atividade da comunidade microbiana estará sujeita a variações sazonais devido à exposição direta a mudanças nos fatores ambientais que não poderão ser controlados e a adição de aditivos para aumentar a eficiência de determinados microrganismos, poderá ser prejudicial àqueles nativos (SASIKUMAR; PAPINAZATH, 2003). Mas, é extremamente difícil para qualquer linhagem tanto introduzida quanto nativa de alcançar a dominância, a menos que se consiga eliminar o isolamento espacial (ZHOU et al., 2002).

De forma mais cotidiana, a biorremediação também pode ser usada em processos de descontaminação de bueiros e até mesmo como agentes desengordurantes. Com relação à descontaminação de solos, há estudos recentes do potencial da utilização da técnica em solos contaminados com herbicidas, como o apresentado por Pires et al. (2003). Além disso, também

há o interesse da aplicação da técnica para descontaminação de solos contaminados por metais pesados (LOVLEY; COATES, 1997) em conjunto com as técnicas que empregam as plantas no auxílio na extração desses metais do solo (CUNNINGHAM; OW, 1996; DIETZ; SCHONNOR, 2001; SALT et al., 1998).

No caso de remediação de solos, há vários fatores que devem ser considerados, como o tipo de solo, tipo e concentração dos contaminantes e o estado físico do contaminante (RULKENS et al., 1995). Nestes casos, é interessante a utilização de métodos de remediação combinados, como o realizado por Lei et al. (1994), em que foram utilizadas biopilhas com biofiltros na tentativa de descontaminar um solo com hidrocarbonetos. Além disso, solos contaminados por metais são mais persistentes para descontaminar, pois não podem ser simplesmente destruídos (CUNNINGHAM et al., 1995), deste modo, também devem ser descontaminados utilizando-se algumas práticas simultaneamente, como o uso de fitorremediação em conjunto com alguns microrganismos (rizorremediação).

1.2.1 FITORREMEDIAÇÃO

O termo fitorremediação tornou-se popular a partir de 1980 pelas obras de Cunningham e Brooks (PLETSCH et al., 2008). A possibilidade da utilização de plantas em processos de descontaminação ambiental teve um aumento nos últimos anos, sendo várias pesquisas conduzidas, de modo que o processo tornou-se uma alternativa emergente para a recuperação de áreas contaminadas (AZADPOUR; MATTHEWS, 1996; GARBISU et al., 2002; PAQUIN et al., 2004; SINGH et al., 2003; VASSILEV et al., 2004). Visoottiviseth et al. (2002), por exemplo, estudaram o potencial de 36 espécies de plantas na fitorremediação de um solo tailandês contaminado por arsênico, sendo apenas *Pityrogramma calomelanos* (Adiantaceae), *Pteris vittata* (Pteridaceae), *Mimosa pudica* (Fabaceae) e *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae), ideais para este processo. Pulford et al. (2002) testaram 20 espécies de *Salix* (Salicaceae) com relação ao seu potencial fitorremediador, sendo que apenas 11 espécies mostraram um bom potencial, combinando uma sobrevivência e uma boa produção de bioamassa com alta absorção de metais pesados. Koller et al. (2008) compararam o acúmulo de arsênico, cobre e cromo por *Pteris vittata* e

Pteris umbrosa (Pteridaceae), sendo que *Pteris vittata* foi mais eficiente em acumular As e demais metais nas raízes e também mais eficiente na translocação de arsênico. Sabreen e Sugiyama (2008) avaliaram o potencial de 8 espécies de gramíneas na fitoextração de cádio, observando que *Lolium multiflorum* (Poaceae) apresentou o mais alto acúmulo de Cd ($116,46 \mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$), exibindo altos níveis de tolerância e capacidade de fitoextração. Entretanto, a fitorremediação por ser uma metodologia não muito simples, há necessidade do entendimento dos vários fatores intrínsecos que contribuem para o sucesso da técnica.

A fitorremediação é guiada por três princípios básicos: a) extração do contaminante do solo e translocação para a parte aérea; b) seqüestro do contaminante pelas raízes para evitar que seja lixiviado; c) conversão do contaminante para formas menos tóxicas.

A fitorremediação pode ser classificada de acordo com a técnica a ser empregada e/ou da natureza química do contaminante. Deste modo, existem várias denominações: a) fitoextração – envolve a absorção do contaminante pela raiz, o qual é armazenado nela ou enviado para partes aéreas da planta; b) fitoestabilização – onde o contaminante orgânico ou inorgânico é incorporado à lignina da parede vegetal ou ao húmus do solo; c) fitoestimulação – a raiz em crescimento promove a proliferação de microrganismos rizosféricos capazes de degradar o poluente, usando exsudatos radiculares como fonte de carbono e energia; d) fitovolatilização – alguns íons de elementos dos subgrupos II, V e VI da tabela periódica, mais especificamente, mercúrio, selênio e arsênio, são absorvidos pelas raízes, convertidos em formas não tóxicas e depois liberados; e) fitodegradação – os contaminantes orgânicos são degradados ou mineralizados dentro das células vegetais por enzimas específicas; f) rizofiltração – utiliza plantas terrestres para absorver, concentrar e/ou precipitar os contaminantes no meio aquoso (CARNEIRO et al., 2001; CHANEY et al., 1997; LASAT, 2002; SALT et al., 1995; VASSILEV et al., 2004). Alguns dos processos acima citados, só são viáveis devido ao potencial que determinadas plantas possuem de acumular metais pesados em diferentes tecidos.

1.2.1.1 Plantas metalófitas

Plantas metalófitas são plantas que possuem mecanismos biológicos distintos de outras plantas, tornando-as tolerantes a altas concentrações de metais em seus tecidos (WHITING et al., 2004). O termo hiperacumulador foi introduzido em 1976 por Jaffré et al. para descrever a planta *Sebertia acuminata* (Sapotaceae) que acumula elevados teores de níquel. Segundo o mesmo autor, plantas hiperacumuladoras são aquelas capazes de armazenar níveis de metais acima de 0,1 ou 1% da massa seca. A capacidade que estas plantas apresentam, provavelmente tem origem na seleção natural de plantas que foram expostas a milhões de anos em substratos com elevadas taxas de metais (WHITING et al., 2002). Acredita-se que a hiperacumulação de metais em plantas pode ter uma base genética, havendo evidências de variações genéticas quantitativas nesta habilidade, tanto entre as populações quanto dentro de mesmas populações (POLLARD et al., 2002). Desta forma, as plantas podem ser consideradas acumuladoras, exclusoras e indicadoras, de acordo com a concentração de metais que é encontrada em seus tecidos (BAKER, 1981). Há ainda as hiperacumuladoras, sendo conhecidos mais de 400 táxons de plantas terrestres que acumulam uma grande variedade de metais (BAKER; BROOKS, 1989). *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), uma espécie conhecida por hiperacumular zinco e cádmio (ASSUNÇÃO et al., 2003), seqüestrou zinco na sua forma solúvel nos vacúolos presentes nas folhas e suas células mesófilas toleraram cerca de 60 mM de zinco na sua seiva (KÜPPER et al., 1999). A tolerância da planta aos metais também vem sendo relacionada à produção de peptídeos denominados fitoquelatinas, peptídeos derivados da glutatona, que seqüestram os metais, ligando-os e conferindo, deste modo, proteção às enzimas sensíveis aos metais (COBBETT, 2000; HALL, 2002; MENDOZA-COZATL et al., 2008; ZENK, 1996). Assim sendo, as espécies que têm a capacidade de viver em solos contaminados são aquelas que apresentam a capacidade de tolerar os metais (BAKER, 1987). Lee et al. (2003) expressaram o gene de *E. coli* *ZntA* codificante para uma bomba de Pb (II), Cd (II) e ZN (II) em células de *Arabidopsis* sp. (Brassicaceae), observando uma maior resistência aos metais, assim como um menor acúmulo destes. Marques et al. (2000) avaliaram o crescimento e o teor de 20 espécies arbóreas com potencial de recomposição florística de áreas degradadas, além do acúmulo e distribuição dos metais nos tecidos dessas espécies (SOARES et al., 2001). Com relação ao crescimento, observaram que

várias espécies, como *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), foram capazes de reter os metais nas raízes, evitando sua translocação à parte aérea. Algumas, por outro lado, tiveram seu crescimento inibido pela contaminação por metais. Já *Cedrella fissilis* foi pouco afetada pelos metais, sendo até estimulada a crescer. A conclusão mais importante é que nem todos os metais são igualmente retidos nas raízes, sugerindo que a tolerância de determinada espécie a um metal nem sempre garante a tolerância a outro (MARQUES et al. 2000). Para a escolha da espécie há vários fatores que devem ser considerados, como idade da planta (KHAN, 2005), tipo de metabolismo e ainda os microrganismos que a ela estão associados. No caso do uso da fitorremediação, é interessante aplicar primeiramente plantas forrageiras de rápido crescimento até que os níveis de contaminação tornem-se menos elevados, seguida de retirada da vegetação, incineração e recuperação dos poluentes. Esta medida torna possível o plantio de arbóreas para estabilizar o restante dos contaminantes, visto que se forem aplicadas diretamente em um nível de contaminação alto, há probabilidade dos poluentes serem transferidos ao longo da cadeia alimentar (através da herbivoria) ou então, deles retornarem ao solo pelo processo de perda das folhas. É interessante, entretanto, atentar para os valores aceitáveis estabelecidos pelas instituições regulamentadoras, além de verificar previamente, a tolerância aos contaminantes das espécies candidatas aos programas de fitorremediação.

1.2.1.1.1 *Cedrela fissilis* Vell.

O cedro (Figura 5), também conhecido como cedro-rosa ou cedro-cetim, é uma espécie de origem na América do Sul (Brasil) e basicamente de clima tropical e subtropical, de ocorrência desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente em florestas semidecídua e atlântica (LORENZI, 1998). É decídua e secundária tardia, com reprodução anual ou em intervalos maiores (FERRAZ et al. 1999).

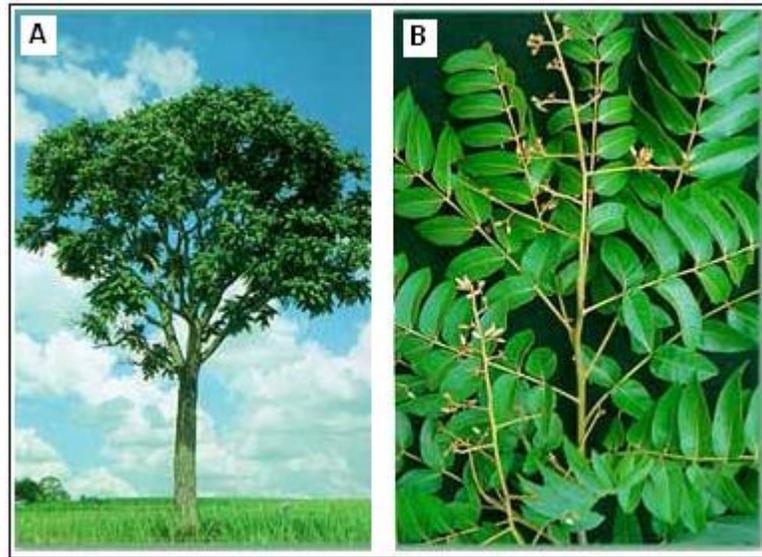


Figura 5 - *Cedrela fissilis* selecionada para o estudo em questão, é uma espécie de porte arbóreo (A). Em B, detalhe para as folhas.
Fonte: Lorenzi (1998).

Segundo o sistema de APG II (2003), *Cedrela fissilis* enquadra-se no clado das Eurosídeas II.

A espécie *Cedrela fissilis* floresce de setembro a janeiro em São Paulo (PINHEIRO et al. 1990) e frutifica de junho a setembro. O processo reprodutivo inicia-se entre 10 e 15 anos de idade. A dispersão de frutos e sementes se dá pela quebra das sementes no solo, dentro do fruto ou pela ação dispersante do vento (ALCÁNTARA et al. 1997). É uma espécie arbórea, podendo atingir até 40 metros de altura na idade adulta (ESPÉCIES FLORESTAIS BRASILEIRAS).

A espécie, *Cedrela fissilis*, foi escolhida neste estudo devido à sua elevada tolerância a metais pesados (MARQUES et al., 2000) e rápido crescimento (1,5 a 2 metros ao ano).

1.3 INTERAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS

Além dos microrganismos presentes no solo, há um grupo de microrganismos associados às plantas que também são de extrema importância ao seu metabolismo. Eles encontram-se em sinergismo com as raízes das plantas e são denominados microrganismos rizosféricos.

A rizosfera (Figura 6) foi definida no início do século XX, por Hiltner, como sendo o volume de solo que recebe influência das raízes das plantas (HILTNER, 1904; PAUL; CLARK, 1996; STOLP, 1988; VARGAS et al., 2002).

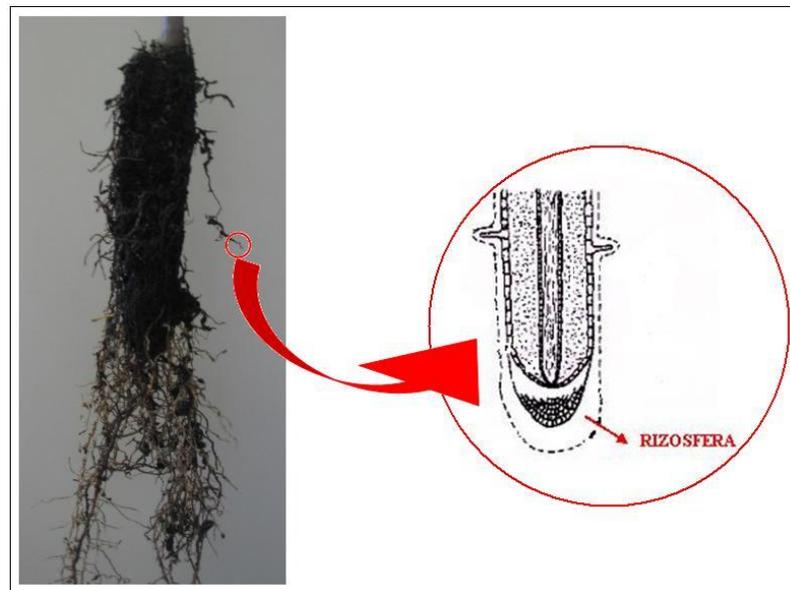


Figura 6 - Esquema representando a raiz de uma planta. No detalhe, a raiz, com a linha pontilhada delimitando a rizosfera.

Fonte: Modificado de The Vital Earth News (1996).

Este termo veio sendo cada vez mais investigado e segundo Lynch (1990), pode ser definido como três unidades interagindo entre si: a planta, o solo e os microrganismos. Já Paul e Clark (1996) apresentaram uma definição mais aprofundada como sendo a parte do solo sob influência das raízes que permite a proliferação de microrganismos. Possui intensa atividade microbiana devido à presença de matéria orgânica em abundância que compreende os exsudatos

radiculares e mucilagem composta de polissacarídeos produzidos pelas células da coifa e tecidos vegetais mortos (STOLP, 1988). Além disso, a composição da estrutura microbiana da rizosfera é altamente delineada pelo tipo de planta, pela quantidade e composição dos exsudatos radiculares e ainda pelas diferentes zonas radiculares (MARSCHNER et al., 2004; YANG; CROWLEY, 2000). O número de microrganismos na vizinhança das raízes, comparado ao presente no solo, varia de acordo com o solo e a planta, podendo ser algumas ordens de magnitude maior. Chegaram a essa conclusão Tam et al. (2001) que mediram o índice de diversidade de Shannon-Wiener em amostras de solo ártico canadense rizosférico e não-rizosférico, observando que as amostras de solo rizosférico eram significativamente mais diversas.

Os microrganismos associam-se às raízes, podendo facilitar a captura de nutrientes pelas plantas (TINKER, 1984) e ainda, auxiliar em alguns processos, como a fixação de nitrogênio atmosférico, por exemplo. Este é um processo bastante conhecido em que bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às raízes de leguminosas produzem um efeito benéfico sobre o solo, tornando-o propício a outros cultivos. Outro caso também muito conhecido é o de associação entre raízes e fungos. A associação micorrízica, assim denominada, aumenta a eficiência na absorção de minerais do solo pela planta, melhorando seu desempenho e conseqüentemente, aprimorando a qualidade do solo (BAREA, et al. 2002; ROITMAN et al., 1991). Foi isso o que alguns pesquisadores comprovaram, relatando haver um aumento na captação de fósforo por plantas associadas aos fungos (BOLAN, 1991). Entretanto, antes se acreditava que somente os fungos micorrízicos proporcionavam uma ligação entre os solos e as raízes, alterando a disponibilidade e a toxicidade dos metais às plantas (LEYVAL et al., 1997). Atualmente, sabe-se que as bactérias rizosféricas também podem desempenhar essa função.

As plantas metalófitas têm sua eficácia controlada pela disponibilidade dos metais no meio. Os microrganismos, desta forma, são importantes, pois se acredita que eles apresentem vários mecanismos que resultam em transformações dos metais entre suas formas solúveis e insolúveis (GADD, 2000). Frederickson et al., (2000) e Kashefi e Lovley (2000) demonstraram que alguns microrganismos são capazes de reduzir alguns metais como cromo, ferro, manganês, telúrio e urânio, tornando-os mais ou menos disponíveis à absorção pelas plantas. Isso pode ser devido a alguns fatores, mas principalmente está relacionado à solubilização dos metais pelos microrganismos, tornando-os mais disponíveis aos vegetais. Por outro lado, algumas bactérias

têm a capacidade de reduzir a solubilidade, como consequência, a mobilidade de alguns metais, minimizando sua toxicidade à planta (LASAT, 2000).

Benisse et al. (2004) observaram populações de bactérias rizosféricas e não rizosféricas quanto à tolerância à toxicidade de zinco, sugerindo que os efeitos tóxicos do zinco são reduzidos em solos rizosféricos de plantas metalófitas. Com relação ao cromo, há alguns estudos sobre a diminuição da toxidez de cromo - Cr (VI) através de sua redução à forma menos tóxica – Cr (III) pela bactéria *Enterobacter cloacae* assim como uma linhagem específica de *Bacillus* sp. (CAMPOS et al., 1995; WANG et al., 1989).

Entretanto, ainda há muito para se descobrir. Por exemplo, como realmente se dá essa associação entre os diferentes microrganismos com as raízes da planta e de que modo esta associação suplementa a transferência e mobilização dos elementos para as plantas (KHAN, 2005).

1.3.1 RIZORREMEDIAÇÃO

Embora haja um grande número de espécies de plantas capazes de hiperacumular metais pesados em alguns de seus tecidos, a fitorremediação não pode ser empregada em áreas com contaminação simultânea de vários contaminantes (WU et al., 2006). Desse modo, é interessante empregar essas plantas combinadas a alguns microrganismos, de modo a aumentar a eficiência na extração dos contaminantes do solo, técnica esta, denominada rizorremediação. Chaudhry et al. (2005) citam que a utilização da associação sinérgica entre plantas e microrganismos associados pode aumentar significativamente a extração de poluentes orgânicos do ambiente, de modo que os microrganismos da rizosfera aumentam a disponibilidade dos componentes e as plantas auxiliam na remoção e degradação destes. É uma associação benéfica para ambos, pois as plantas fornecem substratos e nutrientes para os microrganismos, que crescem e se multiplicam, incrementando a capacidade de degradação pelas plantas ou então, reduzindo a fitotoxicidade do solo contaminado (SICILIANO; GERMIDA, 1998). A técnica tem sido utilizada no tratamento de tricloroetileno (YEE et al., 1998), bifenilas policloradas (do termo em inglês - PCBs) (VILLACIEROS et al., 2005) e HPAs (MOLOBELA, 2005). Inoculando-se bactérias da espécie

Pseudomonas putida, geneticamente modificadas, na raiz de girassol (*Helianthus annuus* - Asteraceae), observou-se um aumento no acúmulo de cádmio pela planta (cerca de 40%) e uma notável redução de sua fitotoxicidade (WU et al., 2006). É interessante notar esse sinergismo entre os organismos, porém pouco se sabe sobre os fatores que geram essas respostas positivas. Existe um tipo de comunicação celular, mais especificamente denominado como *quorum sensing* entre os microrganismos rizosféricos e a planta, estabelecendo, deste modo, uma relação benéfica. Sabe-se que este tipo de mecanismo é utilizado como uma forma de regulação da expressão gênica em resposta a flutuações na densidade celular, por exemplo. Além disso, bactérias gram-positivas e gram-negativas utilizam a comunicação via *quorum sensing* como uma forma de regular várias atividades fisiológicas (MILLER; BASSLER, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo principal avaliar o potencial de *Cedrela fissilis* (Angiosperma) na recuperação de um solo contaminado por metais pesados. Adicionalmente, foi discutida a microbiota cultivada presente em solo contaminado por metais pesados e em um solo não-contaminado e solo da rizosfera de *Cedrela fissilis* submetida à contaminação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento de *Cedrela fissilis* em solo com diferentes concentrações de contaminação (0% - controle (não-contaminado); 30% contaminado; 60% contaminado e 100% contaminado);
- Determinar o potencial de *Cedrela fissilis* para uso em programas de fitorremediação, por meio da bioacumulação de metais nos órgãos, assim como índice de translocação e remoção;
- Determinar o efeito da contaminação por metais pesados no índice estomático de *Cedrela fissilis*;
- Caracterizar as bactérias cultiváveis presentes em um solo contaminado por metais pesados e um solo controle através da técnica de seqüenciamento da região 16S DNAr;
- Caracterizar as bactérias cultiváveis presentes na rizosfera de *Cedrela fissilis* e relacionar com o tempo de contato com os metais pesados no solo empregando a técnica de seqüenciamento da região 16S DNAr;
- Determinar a resistência dos microrganismos isolados frente a Cd^{2+} ;

3 MÉTODO

As etapas de execução da pesquisa podem ser observadas na Figura 7.

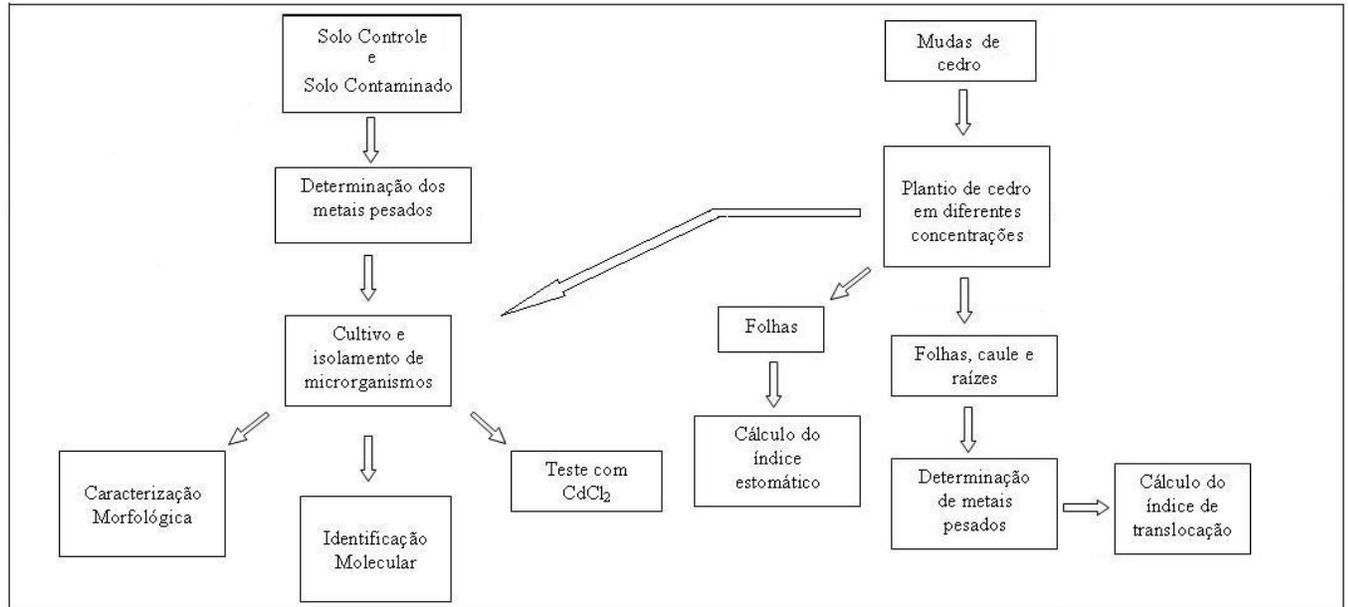


Figura 7 - Etapas da execução do estudo denominado avaliação do potencial de *Cedrela fissilis* (Angiosperma) para recuperação de solos contaminados por metais pesados, Mogi das Cruzes, SP, 2008.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo (Figura 8) está localizada na cidade de Mogi das Cruzes, na bacia hidrográfica do Rio Tietê, região complexa por abrigar significativos remanescentes de Mata Atlântica e os mananciais mais ricos do Estado de São Paulo, sendo assim, prioritária nos programas de conservação. O Parque Municipal “Nagib Najjar”, com 484408 m², foi criado pelo Decreto Municipal número 4792, em 08 de julho de 1998 - Cód. CADLOG 022.053-00 – S 012, Q 095 – e encontra-se inserido dentro dos limites da Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Tietê, dentro dos limites urbanos, a 1,8 Km do centro da cidade. Esta área contém um histórico de mais de 40 anos (de 1944 até meados da década de 80) de descarte de resíduos sólidos da Companhia Siderúrgica de Mogi das Cruzes (COSIM), já desativada, especializada na produção de ferro, aço e laminação.

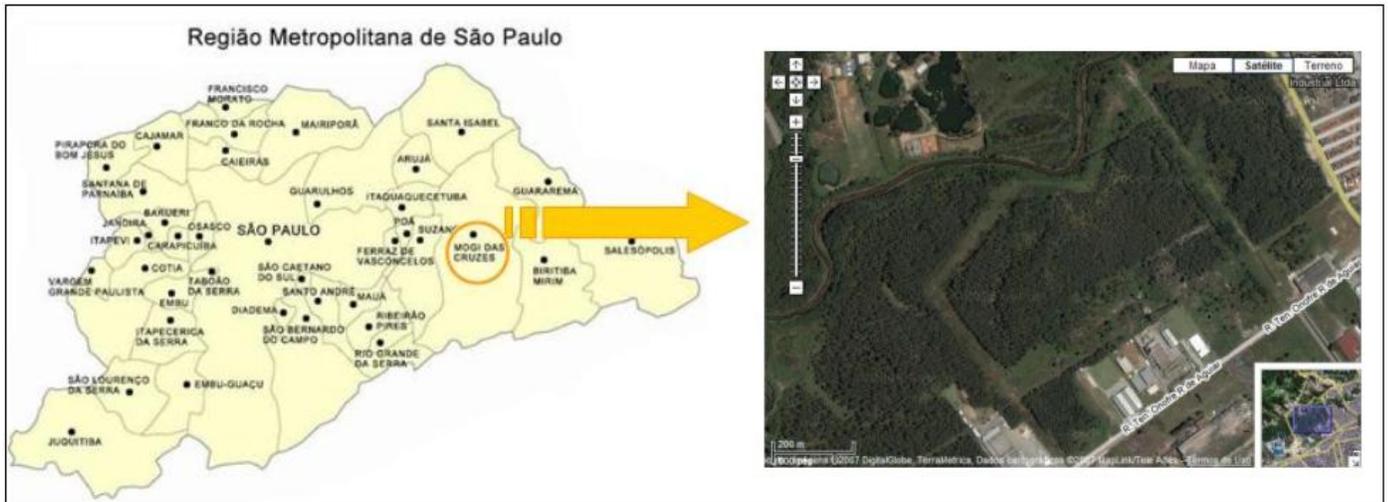


Figura 8 - Esquema mostrando a localização da área de estudo, sendo pertencente à região metropolitana de São Paulo, cidade de Mogi das Cruzes. No detalhe, vista aérea da área de estudo, com mais de 48,4 hectares.
 Fonte: Modificado de Instituto Geográfico e Cartográfico (IGC).

De modo a mapear a contaminação da área, foram realizadas várias coletas em diferentes pontos (Figura 9), sendo estes descritos na Tabela 3. O teor biodisponível e o teor total de metais foram determinados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica e Físico-Química (LAPEQ) da UMC, coordenado pelo Prof. Dr. André Fernando de Oliveira.



Figura 9 - Imagem obtida de satélite da área de estudo, mostrando os pontos de coleta de solo da área de estudo representados pelos pontos 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6 e 8.

Fonte: Modificado de Google Earth.

Tabela 3 - Descrição dos pontos de coleta amostrados na área de estudo e suas respectivas descrições.

Ponto amostrado	Coordenadas	
	W	S
1A	46°12'49.6''	23°31'03.6''
1B	46°12'50.6''	23°31'07.2''
2	46°12'49.0''	23°31'08.1''
3	46°12'48.0''	23°31'08.5''
4	46°12'44.2''	23°31'09.9''
5	46°12'39.6''	23°31'18.6''
6	46°12'39.5''	23°31'19.1''
8	46°12'52.0''	23°31'26.5''

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO

O solo foi coletado da área de estudo, sendo a amostragem realizada em diferentes profundidades do solo: 0-40 cm; 40-80 cm e 80-120 cm, totalizando em torno de 400 L de solo. As amostras foram misturadas e colocadas em sacos plásticos de 100 L e transportadas até o viveiro da UMC.

Como controle foi utilizada uma amostra de solo não-contaminado da Mata Atlântica, retirada de uma área não-impactada, pertencente à Serra do Itapeti (Parque Municipal Francisco Affonso de Mello), no município de Mogi das Cruzes. Em torno de 300 L deste solo foi coletado e armazenado da mesma forma.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

3.2.2.1 Caracterização físico-química

A determinação das características físico-químicas do solo como pH, umidade e composição foi realizada segundo metodologia de Van Raij et al. (2001) pelo LAPEQ da UMC.

3.2.2.1.1 Determinação dos metais totais

Para a determinação dos metais totais no solo, as amostras foram secas em estufa a 105°C, trituradas e homogeneizadas. Então, as amostras foram pesadas diretamente nos módulos de digestão em forno de microondas em sistema fechado (Milestone Ethos Plus), onde cerca de 0,5 g da amostra seca em estufa a 105°C foi adicionada de 10 mL de ácido nítrico concentrado e conectados adequadamente no forno de microondas utilizando o programa para digestão indicado

para solos. Após a digestão e resfriamento dos módulos, eles foram abertos cuidadosamente para que os gases internos pudessem ser expelidos. As amostras digeridas foram diluídas em balões de 25 mL com água Tipo 1. Em seguida, foram separadas alíquotas das amostras em recipientes de plástico (polietileno) e aditivadas de acordo com o metal desejado. Para os metais Ca, Cd, Cu, Mg, e Zn, foram utilizados 10 mL de amostra sem aditivo. Para a determinação de Al, foi utilizado 5 mL de amostra com aditivo KCl 25 % (m/v) na proporção de 20 µL de aditivo para 1 mL de amostra diluída. Para a determinação de Fe e Mn totais, 5 mL das amostras foram tratadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 3,75 % (m/v) na proporção de 10 µL de aditivo para 1 mL de amostra diluída. Após estes procedimentos anteriores, os metais foram medidos e foram determinadas as curvas analíticas dos padrões para cada metal quantificado, considerando as diluições e massa das amostras, a fim de saber a concentração real do analito nas amostras. Para as amostras que necessitaram de diluição, foi utilizado HNO_3 5,6 mol.L⁻¹ como diluente e como branco das amostras.

3.2.2.1.2 Determinação dos metais biodisponíveis

Para a determinação dos metais biodisponíveis nas amostras, foram feitas extrações com o agente quelante DTPA (Ácido Dietileno Triamino Pentaacético), para formar complexos solúveis com os íons metálicos presentes no solo. Para a determinação de cálcio, que está presente no extrator DTPA-TEA, foi realizada uma extração com KCl.

3.2.2.1.3 Extração com DTPA dos metais biodisponíveis

Foram pesados aproximadamente 20 g das amostras de terra fina seca ao ar (TFSA) em frascos coletores e acrescentados 40 mL da solução extratora DTPA. Essa mistura foi agitada em mesa agitadora (Orbital MA 376 Marconi) durante duas horas a 120 rpm. Após a agitação foram filtrados de um dia para o outro em papel de filtro e foram determinados os metais dos extratos

obtidos. A determinação de Ca, Cd, Cu, Mg e Zn foi realizada diretamente, após as diluições. Para a determinação de Al, foi utilizado cloreto de potássio 25% (m/v) como aditivo na proporção 20 µL de aditivo para 1 mL de amostra diluída. Para a determinação de Fe e Mn totais as amostras foram tratadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 3,75% (m/v) na proporção de 10 µL de aditivo para 1 mL de amostra diluída. Em seguida, os metais foram medidos e foram determinadas as curvas analíticas dos padrões para cada metal quantificado, considerando as diluições e massa das amostras, a fim de saber a concentração real do analito nas amostras. Para as amostras que necessitaram de diluição foi utilizado DTPA como diluente e como branco das amostras.

3.2.2.2 Caracterização da atividade biológica

A caracterização da atividade biológica do solo foi realizada medindo-se a atividade da enzima desidrogenase, segundo metodologia descrita por Alef (1995), onde 5 g de cada solo (controle e contaminado) foram adicionados a 5 mL de solução 0,3% de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) em tubos que posteriormente selados e incubados no escuro a 37°C durante 24 horas. O controle continha 5 mL de tampão Tris HCl 100 mM (pH 8,0), sem o CTT. Após o tempo de incubação, foram adicionados 20 mL de metanol aos tubos que foram agitados por 1 minuto e centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. Então, foi medido o trifetil formazan (TTF) formado, por espectrofotometria a 485 nm contra o branco.

3.3 ENSAIO DA ESPÉCIE VEGETAL SELECIONADA

3.3.1 PLANTIO

As mudas da espécie selecionada, *Cedrela fissilis*, foram obtidas de uma mesma matriz do viveiro de produção de mudas da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado na

cidade de Paraibuna. O plantio foi realizado em vaso de plástico (21 x 19 cm) contendo solo contaminado por metais pesados, sem a realização de fertilização e correção, com as seguintes proporções: 0, 30, 60 e 100% (v/v) de solo contaminado.

A fertilização do solo controle foi realizada de forma homogênea, utilizando-se adubo químico N.P.K. 4.12.8 e cal, onde cada vaso recebeu em torno de 3 L ou 3,5 kg de solo. O delineamento experimental foi realizado em esquema 4x3, sendo quatro diferentes proporções de solo e três réplicas.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ESTOMÁTICO DE *CEDRELA FISSILIS*

Após os 6 meses em que as plantas ficaram submetidas às diferentes concentrações de metais, foi realizada a caracterização dos estômatos, pois é uma variável fortemente influenciada por condições ambientais como altas concentrações de sais, por exemplo. Foi empregada a técnica de impressão de epiderme em adesivo a base de éster de cianoacrilato (“*Super Bonder*”) utilizada por Mendonça (2000). Deste modo, uma gota do adesivo foi colocada em uma lâmina de microscopia e a superfície abaxial (única face com estômato na espécie – DUZ et al., 2004) da folha foi colocada voltada para a cola, pressionando-a contra a lâmina. Após secagem, a folha foi retirada cuidadosamente, seguida da contagem de estômatos e células epidérmicas com a utilização de uma câmera (Modelo Moticam 1000) acoplada a um microscópio Motic BA400 com aumento de 400X, por meio da utilização do programa Motic Images Plus 2.0, para uma área de 4,52 mm², equivalente ao campo observado. O desenho experimental consistiu de um ensaio aleatorizado com dois tratamentos (solo controle (0%) e solo contaminado (100%)), três folhas por planta e cinco observações por folha. Então, foi realizado o cálculo sugerido por Wilkinson (1979) para descoberta do índice estomático (IE):

$$IE = \frac{NE}{CE + NE} \times 100$$

Onde, NE é o número de estômatos observados no campo de observação e CE é o número de células epidérmicas.

3.3.3 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM FOLHA, CAULE E RAIZ

Após 6 meses de plantio, as plantas foram coletadas, lavadas cuidadosamente com água de torneira para remoção de partículas de poeira e solo, enxaguadas em água deionizada e secas ao ar. Em seguida, as plantas foram separadas em raiz, caule e folhas com o auxílio de uma tesoura e cada parte foi pesada, determinando-se a massa úmida. O material foi seco em estufa a 105°C durante uma noite e deixado em um dessecador por duas horas. O material foi novamente pesado, sendo determinada, assim, a massa seca. O material foi moído com o auxílio de um moedor de café até que a amostra virasse pó. Antes da trituração de cada amostra, o material a ser utilizado fora previamente lavado com detergente Extran, tratado com ácido nítrico 10% por uma hora e lavado novamente com água deionizada. Então, foi realizada a digestão nítrico-perclórica do material em forno de microondas para determinação dos metais por espectrofotometria de absorção atômica pelo LAPEQ.

Com base nas concentrações e produção de massa seca, foram calculadas as quantidades acumuladas dos metais nas folhas, caule e raiz. Foi calculada a porcentagem de acúmulo de metais para cada parte da planta em relação ao acúmulo total e o índice de translocação (IT) dos metais segundo a fórmula proposta por Abichequer e Bohnen (1998):

$$IT = \frac{\text{Quantidade acumulada na parte aérea (folha + caule)}}{\text{Quantidade acumulada na planta}} \times 100$$

Também foi calculado o índice de remoção (IR) dos metais por *Cedrela fissilis*, segundo a fórmula abaixo:

$$IR = \frac{\text{Quantidade acumulada (mg / vaso)} \times 100}{\text{Quantidade a ser removida por vaso (mg / vaso)}}$$

O coeficiente de impacto da contaminação no teor relativo (CITR) foi obtido por meio do cálculo da razão entre o teor de cada elemento na raiz e na parte aérea (R/PA) no tratamento com o solo contaminado, pela razão entre o teor na raiz e na parte aérea (R/PA) no tratamento com o solo controle.

3.4 CULTIVO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

3.4.1 DO SOLO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Biológica e Biotecnologia (LAQUIBBIO) do NCA da UMC, coordenado pela Dr. Elisa Esposito.

Para obtenção dos microrganismos, a amostragem foi realizada em triplicata, onde foram retiradas subamostras de 5 gramas de solo controle e contaminado que foram adicionadas a Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de tampão PBS (ANEXO A) (ARAÚJO et al. 2002.). À essa solução foram adicionadas pérolas de vidro e incubada a 28°C, 150 rpm, durante 1 hora. Após incubação, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , seguida de retirada de alíquotas de 100 µL da última diluição para plaqueamento em meio TSA e MLA e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Após incubação a 28°C, por 24 horas, foi verificado o crescimento das bactérias. Então, os isolados bacterianos foram purificados e armazenados em meio TSB em tubos de 2,0 mL contendo glicerol 60% em freezer -20°C.

3.4.2 DA RIZOSFERA

Para isolamento dos microrganismos da rizosfera, foi realizada a mesma metodologia citada anteriormente, sendo que a raiz de cedro foi coletada no tempo zero e no terceiro mês após o plantio de cedro na concentração de 100% (v/v) de solo contaminado (ITEM 3.3.1). O solo

rizosférico foi obtido separando-se o solo aderido à raiz com o auxílio de uma pinça. A amostragem foi realizada em triplicata, onde cerca de 5 g de solo rizosférico foi pesado e transferido para Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de tampão PBS (ANEXO A) (ARAÚJO et al. 2002). À essa solução foram adicionadas pérolas de vidro e incubada a 28°C, 150 rpm, durante 1 hora. Após a incubação, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , seguida de retirada de alíquotas de 100 μ L da última diluição para plaqueamento em meio TSA e MLA e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Após incubação a 28°C, por 24 horas, foi verificado o crescimento das bactérias. Então, os isolados bacterianos foram purificados e armazenados em meio TSB em tubos de 2,0 mL contendo glicerol 60% em freezer -20°C.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

3.5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA

Para caracterização das bactérias, foi realizada, inicialmente, a coloração diferencial de Gram mediante observação ao Microscópio Óptico (MO). Além disso, foi realizada a prova bioquímica de produção de catalase com H_2O_2 3% e ainda foi utilizado o meio diferencial MacConkey (Accumedia) para verificar a fermentação da lactose.

3.5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.5.2.1 Extração de DNA genômico

As técnicas moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do NIB da UMC, coordenado pelo Dr. Welington Luiz de Araújo. Após a obtenção dos isolados,

foi realizada a extração de DNA destes. Os isolados foram crescidos em 5 mL de meio TSB a 28°C por 24 h. Ao precipitado obtido pela centrifugação das amostras foram adicionados 500 µL de tampão TE (Tris-HCl (pH 7,5); EDTA (pH 8,0) 0,5M), seguido de ressuspensão e centrifugação por 5 minutos a 14000 x g, com descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados novamente 500 µL de tampão TE, seguido de ressuspensão e adição de 30 µL de SDS 10%, deixando a amostra 10 minutos em um termobloco a uma temperatura de 70°C. Então, foram adicionados cerca de 0,5 g de “glass beads” (0,1 mm de diâmetro – Biospec Products), seguido de agitação da suspensão no Homogeneizador de Células (Ação Científica) por 60 segundos a 5000 rpm e mantida no gelo durante 5 minutos. Então, foram adicionados 500 µL de fenol e misturados por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a etapa do fenol foi repetida. Então, foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio, misturando por inversão. Foi realizada a centrifugação a 14000 x g durante 5 minutos, seguida de transferência do sobrenadante para tubos novos. Foram adicionados 0,1 volume de NaCl (5M) e 0,6 volume de isopropanol, misturando por inversão, seguido de centrifugação por 10 minutos a 14000 x g e de descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 300 µL de etanol 70% gelado, seguido de ressuspensão e centrifugação durante 3 minutos a 9700 x g, com descarte do sobrenadante. O tubo foi então deixado a 37°C para que o excesso de etanol fosse evaporado, e em seguida, foram adicionados 50 µL de água Milli-Q autoclavada e o DNA foi então mantido a -20°C. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8 %, a 3 volts. cm⁻¹ juntamente com o marcadores de DNA λ clivado com *Hind*III nas concentrações de 25 ng. µL⁻¹ e 100 ng. µL⁻¹. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL⁻¹) e fotografado.

3.5.2.2 Amplificação da região 16S DNAr

Após a obtenção de DNA, foi realizada a amplificação da região 16S DNAr, com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores R1387 e PO27F (Tabela 4). As reações de PCR foram realizadas para um volume de 49 µL, contendo 34,4 µL de água Milli-Q autoclavada, 5 µL de tampão de PCR (10X) (Fermentas), 5,0 µL de MgCl₂ (25mM) (Fermentas), 4,0 µL de dNTP (2,5

mM), 0,1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5 μL de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 1 μL de DNA molde (0,5 a 10 ng). As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de trinta e cinco ciclos de 30 segundos a 94°C; um minuto a 62,5°C; um minuto a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 3 volts. cm^{-1} , juntamente com o marcador de peso molecular 1kb para a observação do fragmento de aproximadamente 1400 pb amplificado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL^{-1}) e fotografado.

Tabela 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Oligonucleotídeos iniciadores	DNA alvo	Seqüência 5' \rightarrow 3'
R1387	Bactéria 16S DNAr	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
PO27F	Bactéria - universal	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG

3.5.2.3 Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Com a amplificação do gene que codifica a região 16S DNAr, teve início a análise da variabilidade genética por ARDRA por meio da clivagem do fragmento amplificado. Para isso, aproximadamente 1 μg do produto amplificado foi digerido com 2U da enzima de restrição *HhaI* (10U. μL^{-1}) (Invitrogen), 2,5 μL de tampão REact₂ (10X) (Invitrogen) e 5,04 μL de água Milli-Q autoclavada. O produto de digestão foi separado em gel de agarose a 2 % a 5 V. cm^{-1} .

O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL^{-1}) e fotografado.

Após o término das reações de clivagem por ARDRA, as fotos foram analisadas, caracterizando-se o número e o tamanho das bandas observadas, de modo que cada padrão de clivagem foi definido como um ribotipo.

3.5.2.4 Purificação

Todas as amostras de produto de PCR foram purificadas utilizando-se o kit *Ultra Clean – PCR Clean-Up* (MOBIO), onde foram adicionados 5 μ L de *SpinBind* do kit à reação de PCR, seguida de mistura com a pipeta. O conteúdo foi transferido para o filtro e centrifugado por 30 segundos a 10000 x g. O líquido que passou foi descartado e ao filtro foram adicionados 300 μ L do tampão *SpinClean* do kit, centrifugando-se por 30 segundos a 10000 x g. O líquido que passou foi novamente descartado e o filtro, foi transferido para um novo tubo de coleta. Então, foram adicionados 50 μ L de tampão de eluição (10 mM de Tris pH 8,0) no filtro, centrifugando-se a 10000 x g por 60 segundos. O DNA recolhido foi então quantificado para seqüenciamento (20ng) e armazenado a -20°C.

3.5.2.5 Seqüenciamento e análise das seqüências

Dos isolados obtidos, 50% foram selecionados e enviados ao setor de Seqüenciamento de DNA, localizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). Para identificação dos isolados, as seqüências obtidas foram analisadas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (www.ncbi.nlm.nih.gov) contra o banco de dados do GenBank da coleção de nucleotídeos (nr/nt), que compara a seqüência submetida à base de dados. Então, foram selecionadas as seqüências que apresentarem maior similaridade para posterior análise.

3.5.2.6 Construção dos dendrogramas

De modo a avaliar a similaridade das seqüências dos isolados obtidos com seqüências conhecidas do GenBank, foi utilizado o programa Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007). O alinhamento foi realizado com a utilização do aplicativo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e

as seqüências alinhadas foram então usadas para construção dos dendogramas, por meio do método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) segundo o modelo de Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) com um *bootstrap* de 1000 réplicas.

3.5.2.7 Cálculo do índice de diversidade

O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') que relaciona o número de espécies (riqueza) com a sua abundância relativa foi calculado baseando-se na fórmula abaixo:

$$H' = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Onde, $p_i = n_i/N$; n_i = valor de importância de cada espécie; N = total dos valores de importância.

A análise estatística do índice foi realizada por meio do teste t:

$$t = \frac{H'_1 - H'_2}{(\text{var } H'_1 + \text{var } H'_2)}$$

Onde, H'_1 representa a diversidade obtida para a amostra 1 e $\text{var } H_1$ representa sua variância. Os graus de liberdade podem ser calculados por:

$$gl = \frac{(\text{var } H'_1 + \text{var } H'_2)}{\frac{(\text{var } H'_1)^2}{N_1} + \frac{(\text{var } H'_2)^2}{N_2}}$$

3.6 ENSAIO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A Cd^{2+}

De modo a testar a resistência bacteriana ao cátion metálico Cd^{2+} , os isolados bacterianos foram plaqueados em meio M9-Tris Agar (ANEXO B) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) na

presença de uma fonte de carbono adicional, acrescido de uma solução de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 0,0005 mM, 0,005 mM, 0,05 mM, 0,5 mM e 1,0 mM. As placas foram incubadas a 28°C durante 24 horas, e em seguida foi avaliado o crescimento, diferenciando-o em termos como excelente (++), limitado (+) e ausência de crescimento (-).

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados de forma a tentar correlacionar a microbiota existente no solo e na rizosfera com a planta e as características físico-químicas do solo. Para isso, os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico BioEstat 4.0 (AYRES et al., 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.1.1 DO SOLO DA ÁREA DE ESTUDO

De modo a mapear a contaminação, as amostras de solo obtidas dos diferentes pontos de coleta foram analisadas, sendo determinados os teores totais de cádmio, cobre, cromo, ferro, manganês, níquel e zinco (Figuras 10 e 11).

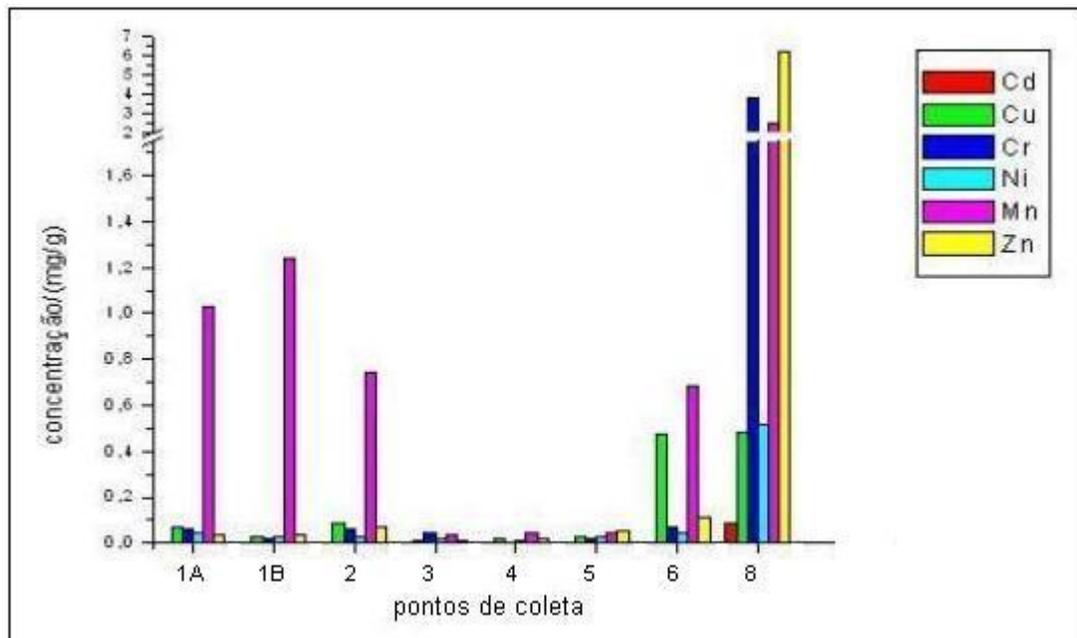


Figura 10 - Teores totais de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) obtidos nos diferentes pontos de coleta de uma média de três repetições.

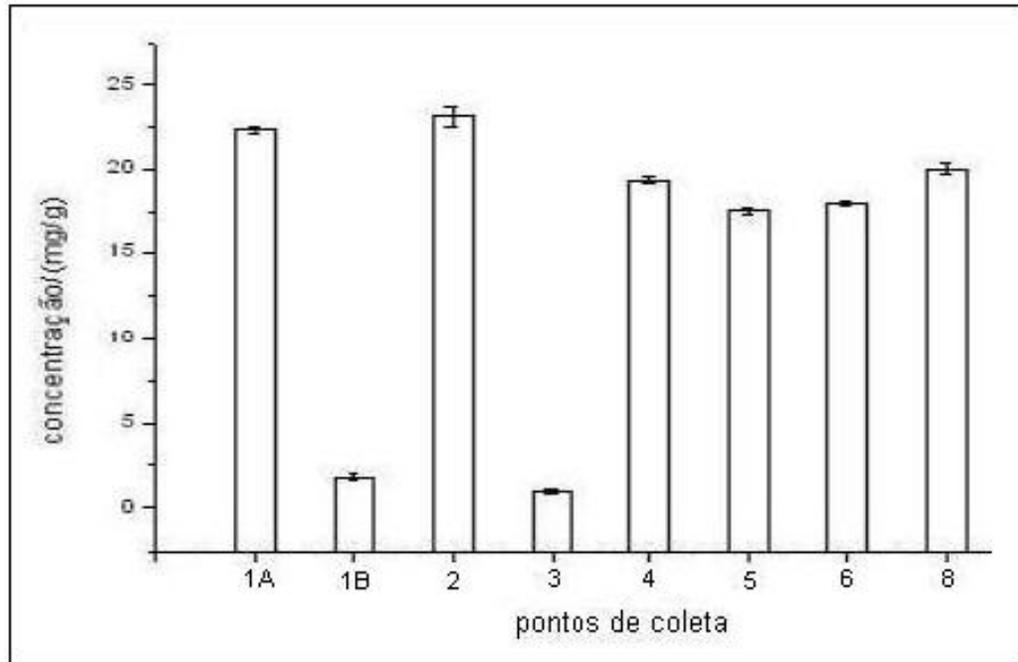


Figura 11 - Teor total de Fe (mg.g^{-1}) obtido nos diferentes pontos de coleta de uma média de três repetições.

Após análise, determinou-se que o ponto de coleta 8 apresentava um nível de contaminação mais elevado, sendo, portanto, o selecionado para o estudo em questão.

4.1.2 DO SOLO DO PONTO 8 E DO SOLO CONTROLE

O ponto 8, selecionado para o estudo, com coordenadas W $46^{\circ}12'52.0''$, S $23^{\circ}31'26.5''$, além da deposição de metais pesados, apresenta uma alta concentração de lixo (proveniente de lixo domiciliar e da construção civil) e malha de carvão (Figuras 12A e 12B), incluindo uma cratera (Figura 12C) contendo muito material vitrocerâmico, talvez proveniente de autoforos.



Figura 12 - Ponto 8 localizado na área de estudo e selecionado para o estudo em questão. A e B – Malha de carvão, C – Cratera com material vitrocerâmico, D – Pneu queimado. Fotos da autora.

A caracterização físico-química do solo controle e do solo contaminado encontra-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Análises realizadas no solo controle e no solo contaminado de uma média de três repetições.

Solo	Acidez trocável	Acidez total	pH CaCl ₂	Estimativa DQO	Matéria orgânica	Matéria orgânica total	Umidade 60°C	Umidade 105°C
	----mmol.kg ⁻¹ ----			mgO ₂ .g ⁻¹	-----%-----			
Controle	0,67	22,25	6,04	64,87	0,43	6,09	5,98	7,37
Contaminado	1,74	5,8	7,26	83,80	0,90	7,86	7,65	9,93

Tabela 6 - Análises realizadas no solo controle e no solo contaminado de uma média de três repetições.

Solo	Carbono orgânico %	Fosfato Mehlich mgP.g ⁻¹	Nitrogênio Kjeldahl gN.kg ⁻¹	Nitrogênio amoniacal -----mgN.g ⁻¹ -----	Nitrato	Nitrito	Sulfato mgSO ₂ .g ⁻¹
Controle	0,24	0,1487	0,65	ND	3,31	ND	ND
Contaminado	0,50	0,3110	1,83	ND	8,28	ND	ND

ND – Não detectado.

Sabe-se que a acidez trocável é representada pelo conteúdo de íons de hidrogênio adsorvidos no complexo coloidal do solo, já a acidez ativa é aquela representada pela concentração de íons hidrogênio na solução do solo, cujo pH é indicado (COELHO; VERLENGIA, 1973). Lopes e Guilherme (1992) admitem que a acidez trocável pode ser considerada além dos íons de hidrogênio trocáveis adsorvidos ao complexo coloidal por forças eletrostáticas, também o alumínio. Então, o solo contaminado, comparado com o controle, apresenta maior acidez trocável (Tabela 5), portanto, tem mais íons hidrogênio adsorvidos ao complexo coloidal, além de mais alumínio trocável (Tabela 7). Os efeitos do excesso de alumínio são comumente observados no sistema radicular, sendo a produção de biomassa radicular mais sensível do que a parte aérea podendo ocorrer diminuições no alongamento radicular. Além disso, o excesso do metal pode afetar algumas funções celulares como alterações nas membranas das células radiculares, inibição da síntese de DNA e divisão celular, alterações no balanço nutricional e na absorção de nutrientes, entre outros (MACHADO, 1997). Entretanto, em pH superiores a 5,5, acredita-se que o alumínio não se apresenta em sua forma nociva (COELHO; VERLENGIA, 1973).

Tabela 7 – Análise de micronutrientes (mg.g^{-1}) realizada no solo controle e contaminado. Em vermelho, encontram-se os valores cujas concentrações de metais apresentam-se maiores no solo contaminado. Em azul, os valores cujos metais foram detectados apenas no solo contaminado. Valores obtidos de uma média de três repetições.

	Solo	
	Controle	Contaminado
Al ^t	I	I
Al ^{tr}	0,006	0,0156
B	0,00013	0,00009
Cd ^t	ND	0,0025
Cd ^b	ND	0,0004
Cu ^t	0,0049	0,0714
Cu ^b	0,0004	0,0028
Fe ^t	7,4900	59,340
Fe ^b	0,0384	0,0293
Mn ^t	0,0342	0,8706
Mn ^b	0,0024	0,0038
Ni ^t	0,0068	0,0511
Ni ^b	ND	0,0003
Zn ^t	0,0038	0,5220
Zn ^b	0,0018	0,0140

^t Total

^{tr} Trocável

^b Biodisponível

ND Não detectado

I Indeterminado

O solo contaminado mostrou teores de metais superiores ao solo controle (Tabela 7), dando ênfase ao ferro, cuja concentração no solo contaminado foi de $59,3400 \text{ mg.g}^{-1}$. No caso do níquel total, foi observado no solo contaminado uma concentração de $0,0511 \text{ mg.g}^{-1}$, neste caso é um valor relativamente alto quando comparado ao valor fitotóxico para milho e arroz, equivalente a taxas entre $0,014$ a $0,403 \text{ mg.g}^{-1}$ (LIU; WANG, 1993). Para manganês total, no solo contaminado foi detectado $0,8706 \text{ mg.g}^{-1}$, desta forma, como a Cetesb não disponibiliza valores orientadores para este metal, faremos uso de valores críticos de $0,020$ e $0,060 \text{ mg.g}^{-1}$, citados por Ducié e Polle (2005) para a Alemanha. Considerando esta faixa, o teor de Mn total detectado na área encontra-se elevado, acima de 81% do valor de referência. Porém, como já mencionado anteriormente, é necessário levar em consideração o pH, sendo que em pHs inferiores a 5,5 o manganês apresenta-se na sua forma tóxica de Mn^{2+} . Como o solo contaminado apresentou pH acima deste valor, o nutriente apresenta-se na forma de $\text{Mn}^{3,4-7+}$, que é a menos biodisponível para absorção pelas plantas. O cádmio foi detectado apenas no solo contaminado (Tabela 7). Ele é considerado tóxico em pequenas concentrações, podendo afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, além de alterar a disponibilidade de vários nutrientes no solo,

interferindo na absorção destes, como por exemplo, de nitrato (BENAVIDES et al. 2005), pela inibição da enzima nitrato redutase (HERNÁNDEZ et al. 1996).

Os teores totais dos metais encontrados no solo obtido do ponto 8 encontram-se acima dos valores de prevenção estipulados pela Cetesb (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação entre os valores orientadores para metais em solo estipulados pela Cetesb com os teores de metais totais obtidos no ponto 8 e no solo controle de uma média de três repetições.

	Referência de qualidade	Solo (mg.g ⁻¹ de peso seco)			
		Prevenção	Intervenção para área industrial	Ponto 8	Solo controle
Cádmio (Cd)	< 0,0005	0,0013	0,020	0,0025*	ND
Cobre (Cu)	0,035	0,060	0,600	0,0714*	0,0049
Níquel (Ni)	0,013	0,030	0,130	0,0511*	0,0068
Zinco (Zn)	0,060	0,300	2,000	0,5220*	0,0038

* Valores encontrados no ponto 8 maiores que os de prevenção estipulados pela Cetesb.

ND – Não detectado (Valor de concentração abaixo do limite de detecção pelo método).

Fonte: Modificado de Cetesb (2005).

É interessante notar que embora nenhum dos valores obtidos no ponto 8 atinjam os níveis de intervenção estipulados, eles ultrapassam os de prevenção; o que não é observado para os valores obtidos para o solo controle, onde estes encontram-se abaixo até mesmo da faixa de referência de qualidade.

O pH do solo apresenta grande influência na especiação e biodisponibilidade dos nutrientes. Desta forma, no solo controle, cujo pH de 6,04 (Tabela 5), considerado com uma acidez média (ALVARES et al., 1999), nutrientes como P, Ca e Mg apresentam-se menos disponíveis do que no solo contaminado e com pH de 7,26 (alcalino fraco). Sob esta ótica, o solo contaminado apresenta-se mais fértil. Entretanto Fe, Mn, B, Zn e Cu apresentam maior biodisponibilidade em solo neutro, ao passo que N, K e S, apresentam disponibilidade similar em ambos os solos (COELHO; VERLENGIA, 1973).

Além disso, solos com pH em torno de 7,0 indicam uma alta concentração de Ca e Mg, o que corrobora o fato de ter sido encontrado uma maior concentração destes nutrientes no solo contaminado (Tabela 9). Apesar do excesso, estes macronutrientes não são prejudiciais à planta, visto que são importantes em algumas funções celulares.

Tabela 9 - Análise de macronutrientes (mg.g^{-1}) realizada no solo controle e contaminado de uma média de três repetições.

Solo	Ca ^t	Ca ^b	K	Mg ^t	Mg ^b	Na
Controle	I	1,0174	0,1220	I	0,1024	0,0100
Contaminado	I	2,6968	0,1440	I	0,1677	0,0130

^t Total

^b Biodisponível

I Indeterminado

4.1.2.1. Caracterização da atividade biológica

Segundo Andrade e Silveira (2004), a determinação da atividade da enzima desidrogenase é um modo eficiente de medir a atividade microbiana, podendo indicar mudanças na microbiota do solo, sem, entretanto, relacioná-las a nenhum grupo específico de microrganismos. Em um estudo, Oliveira e Pampulha (2006) observaram que a contaminação por metais pesados reduziu significativamente a atividade dessa enzima, de modo que no solo contaminado houve uma redução superior a 80% em relação ao solo controle. Concluíram, desta forma, que é um tipo de ensaio sensível para determinação dos efeitos dos metais na biomassa microbiana ativa de solo. Já Silva et al. (2005) observaram que a aplicação dos fungicidas metalaxil e fenarimol afetou negativamente a atividade enzimática. Isso também foi confirmado por Moretini et al. (2004) que observaram uma redução na atividade da enzima no solo arenoso e no controle onde foi aplicado o metalaxil. Entretanto, no estudo em questão, a atividade da enzima desidrogenase obtida para o solo controle foi de 0,870 DO (densidade ótica) e para o solo contaminado foi de 0,577 DO, com diferença de 33,68%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois solos para o nível de significância 0,05. Isto pode ser devido ao fato do solo contaminado não apresentar um grau de contaminação capaz de reduzir significativamente a atividade enzimática, ou então devido à disponibilidade dos metais.

4.2 ENSAIO DA ESPÉCIE VEGETAL SELECIONADA

4.2.1 PLANTIO

Após 6 meses de plantio nas diferentes concentrações de contaminação (Figura 13B), foi observado que os níveis dos metais presentes no solo contaminado não afetaram significativamente o crescimento em altura de *Cedrela fissilis* (Figura 14), talvez devido ao fato de os metais como Cu, Zn, B, Mn e Fe não estarem biodisponíveis em pH alcalino, ou então devido ao fato dos microrganismos rizosféricos produzirem sideróforos capazes de complexar os metais, tornando-os indisponíveis à absorção pela planta. Sano et al. (2006) isolaram o gene responsável pela produção de uma proteína capaz de se ligar a cobre, sendo útil, por exemplo, no tratamento de água contaminada.

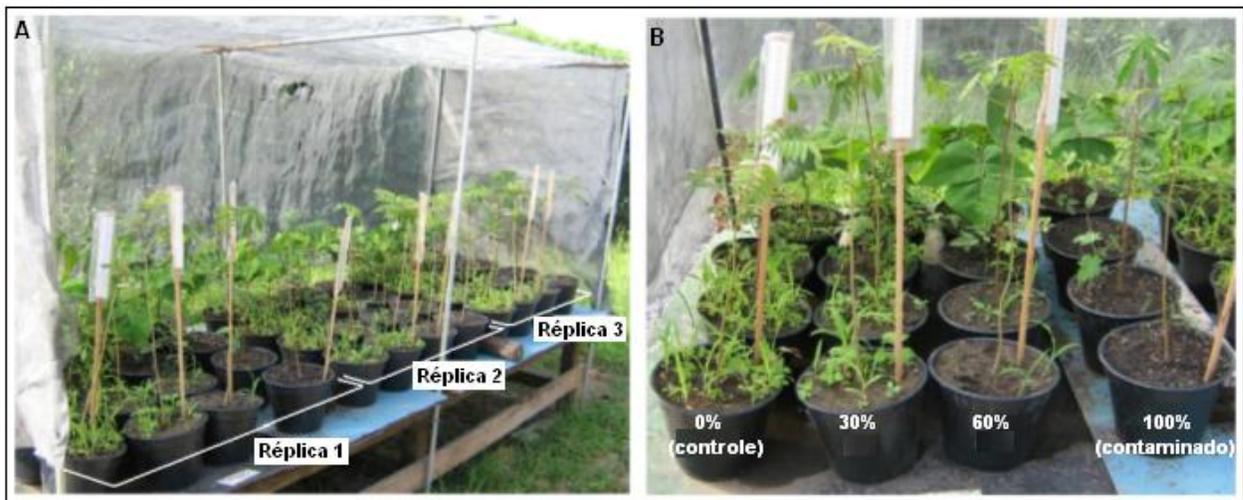


Figura 13 - Esquema do experimento realizado em uma casa de vegetação rústica montada no campus da UMC, mostrando as diferentes proporções de solo contaminado utilizadas (B) e o número realizado de repetições (A).

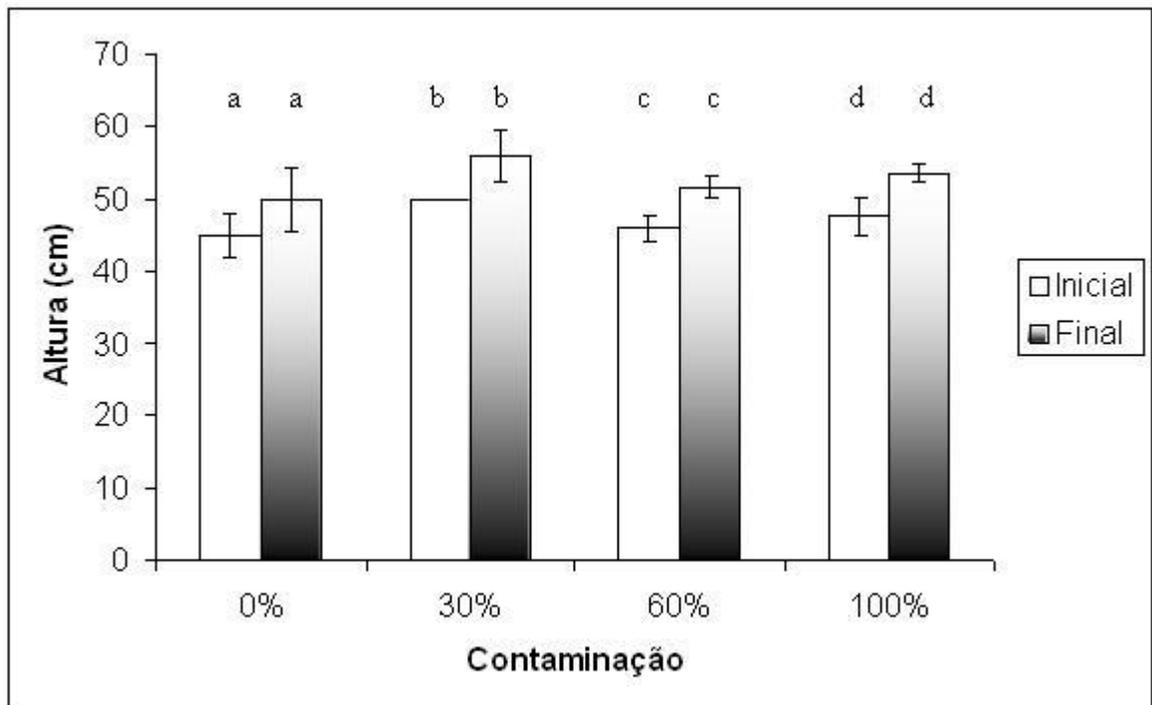


Figura 14 - Altura de *Cedrela fissilis* em centímetros, medida no tempo zero (inicial) e após três meses de plantio (final) em solo controle (0%), 30% contaminado, 60% contaminado e 100% contaminado, obtido de uma média de três plantas. As letras de tamanhos iguais no gráfico não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Apenas foi possível observar uma alteração na coloração das folhas, após três meses de crescimento (Figura 15), onde as folhas de *Cedrela fissilis* crescendo em solo contaminado (Figura 15B) apresentaram uma coloração verde mais intensa. Isso pode ser explicado pelo maior teor de alumínio neste solo, ou então, pode também ser devido ao fato de haver uma maior concentração de ferro no solo contaminado, visto que o ferro atua como catalisador na produção de clorofila (COELHO; VERLENGIA, 1978).



Figura 15 - A – Folhas de *Cedrela fissilis* crescendo em solo controle e B – Em solo contaminado. Observe que a coloração da planta crescendo em solo contaminado apresenta-se em um verde mais intenso.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ESTOMÁTICO DE *Cedrela fissilis*

Foi calculado o índice estomático de *Cedrela fissilis* para as plantas submetidas no solo controle e no solo contaminado, baseando-se na contagem dos estômatos e das células epidérmicas (Figura 16).

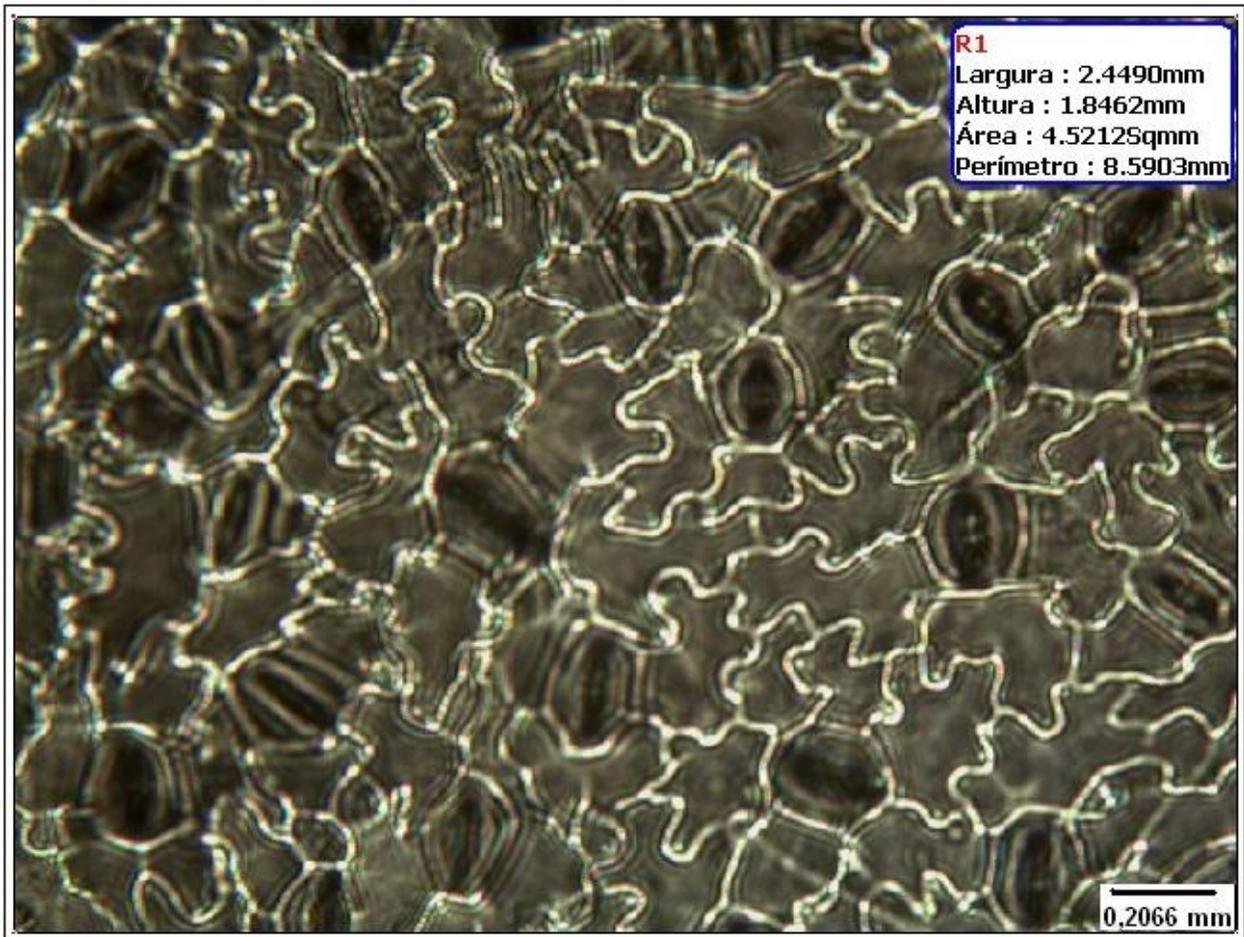


Figura 16 - Imagem obtida por meio do programa Motic Images Plus 2.0, representando a folha de *Cedrela fissilis*, mais especificamente, a superfície abaxial, para realização de contagem de estômatos e células epidérmicas em uma área de 4,52 mm² do campo de visualização.

No estudo em questão, não foi observada diferença entre o índice estomático da planta submetida ao solo controle e àquela submetida ao solo contaminado. O IE para o solo controle foi de 18,80% e para o contaminado foi de 19,77%. Os estômatos adaptam-se a mudanças locais e globais em várias escalas de tempo. Deste modo, sua morfologia, distribuição e comportamento respondem a um grande espectro de sinais ambientais (HETHERINGTON; WOODWARD, 2003). Sabe-se que a densidade estomática é variável de acordo com a idade da planta estudada, e é diretamente influenciada pelas condições ambientais (CAO, 2000). Isto pode ser corroborado pelo estudo realizado por Caiazza e Quinn (1980), que observaram que *Arenaria patula* (Cariophyllaceae) e *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae) expostas a altas concentrações de poluentes como SO₂, exibiram uma menor densidade estomática. Além disso, Salas et al. (2001)

estudaram plantas de tomate submetidas a alguns tratamentos salinos, observando que o índice estomático aumentou à medida que a concentração salina era aumentada. Kambhampati et al. (2005) estudaram os efeitos de chumbo e EDTA na densidade estomática de *Ipomoea lacunosa* (Convolvulaceae), observando que a interação entre os dois compostos teve efeitos significativos na densidade estomática e nas taxas de fotossíntese da planta em questão.

4.2.3 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM FOLHA, CAULE E RAIZ

Após os 6 meses de plantio, procedeu-se a retirada do cedro, seguida de lavagem do material para posterior secagem em estufa (Figura 17). Visualmente, não foi observada alteração quanto ao desenvolvimento da planta. Isto pode ser evidenciado pela produção de massa seca (em gramas) (Figura 18), de modo que a contaminação não afetou a produção de matéria seca de *Cedrela fissilis* quando comparado com a produção de matéria seca no controle, pois não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para um nível de significância de 0,05. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Marques et al. (2000). Também estão de acordo com o mesmo autor, resultados referentes a uma sutil produção de mais matéria seca das raízes em solo contaminado, podendo tratar-se de um mecanismo de tolerância da planta à contaminação (MARQUES et al. 2000).



Figura 17 - *Cedrela fissilis* coletada após 6 meses de plantio e após lavagem com água de torneira. Observe na figura B a ausência de folhas em ambos os tratamentos.

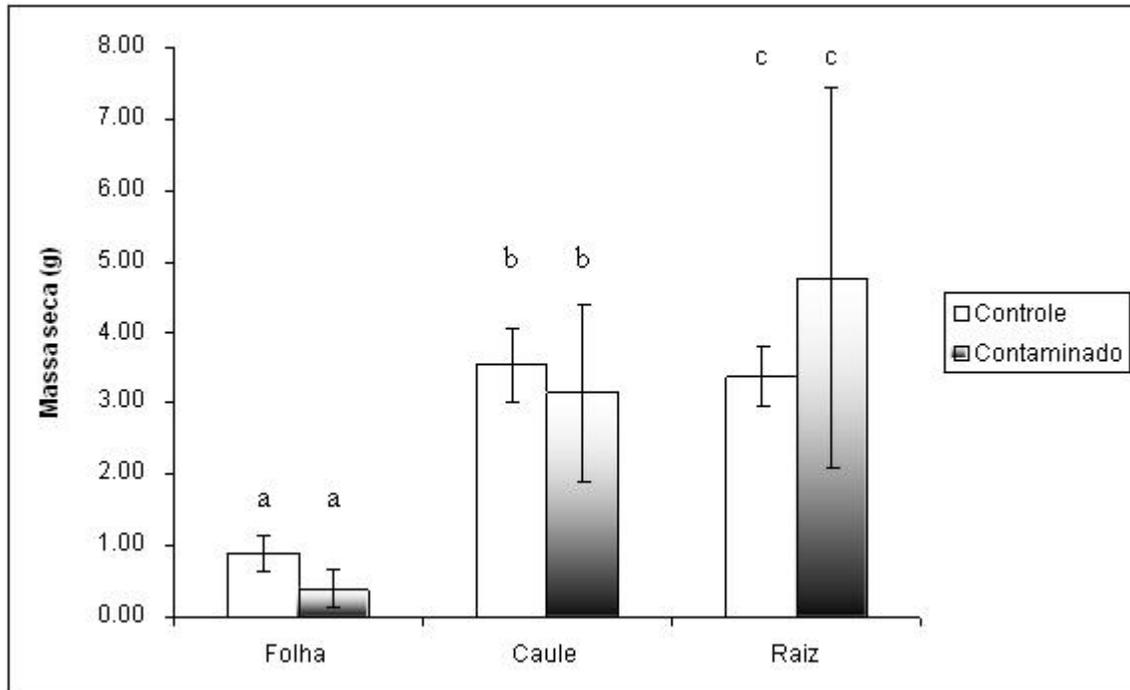


Figura 18 - Gráfico demonstrando a massa seca (g) de *Cedrela fissilis* submetida em solo controle e solo contaminado após 6 meses de plantio, obtida de folha, caule e raiz (de uma média de três plantas por tratamento) após a secagem a 105°C. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Os resultados referentes aos metais determinados para os três órgãos vegetais encontram-se no apêndice C. Com base nos valores obtidos, *Cedrela fissilis* não pode ser considerada uma espécie hiperacumuladora, pois em nenhum caso acumulou valores superiores a $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ de Cd, 1 mg.g^{-1} de Ni e Cu e 10 mg.g^{-1} de Zn (BROWN et al. 1995). Todos os nutrientes encontram-se em níveis normais (Tabela 10) nas folhas, no caule e nas raízes de *Cedrela fissilis* submetidas tanto no solo controle quanto no solo contaminado. Para Cd, valores considerados normais encontram-se na faixa de $0,1$ a $2,4 \text{ mg.g}^{-1}$ para a planta em questão, por exemplo, foram encontrados valores inferiores a $1 \times 10^{-3} \text{ mg.g}^{-1}$.

Tabela 10 - Níveis de metais em plantas (mg.g^{-1}), demonstrando os teores normais e as concentrações críticas.

Metais	Teor normal em plantas	Concentração crítica nas plantas	
		Teores acima dos quais ocorre toxidez	Teores capazes de diminuir em 10% o crescimento de plantas
----- mg.g^{-1} -----			
B	100-200	50-100	-----
Cd	0,1-2,4	5-30	4-200
Cu	5-20	20-100	5-64
Mn	20-300	300-500	-----
Ni	0,02-5	10-100	8-220
Pb	0,2-20	30-300	-----
Zn	1-400	100-400	100-900

Fonte: Modificado de Santos (2005).

As Figuras 19 a 28 representam graficamente os teores de metais obtidos para os órgãos analisados. Para todos os tratamentos com exceção dos teores de alumínio no caule (Figura 19), cádmio na folha, no caule e na raiz (Figura 20), cobre na folha e no caule (Figura 22), cromo, ferro, magnésio e zinco no caule e na raiz (Figuras 23, 24, 25 e 28, respectivamente), manganês na raiz (Figura 26) e níquel na folha e na raiz (Figura 27) houve diferenças estatisticamente significativas no solo controle e contaminado para um nível de significância de 0,05.

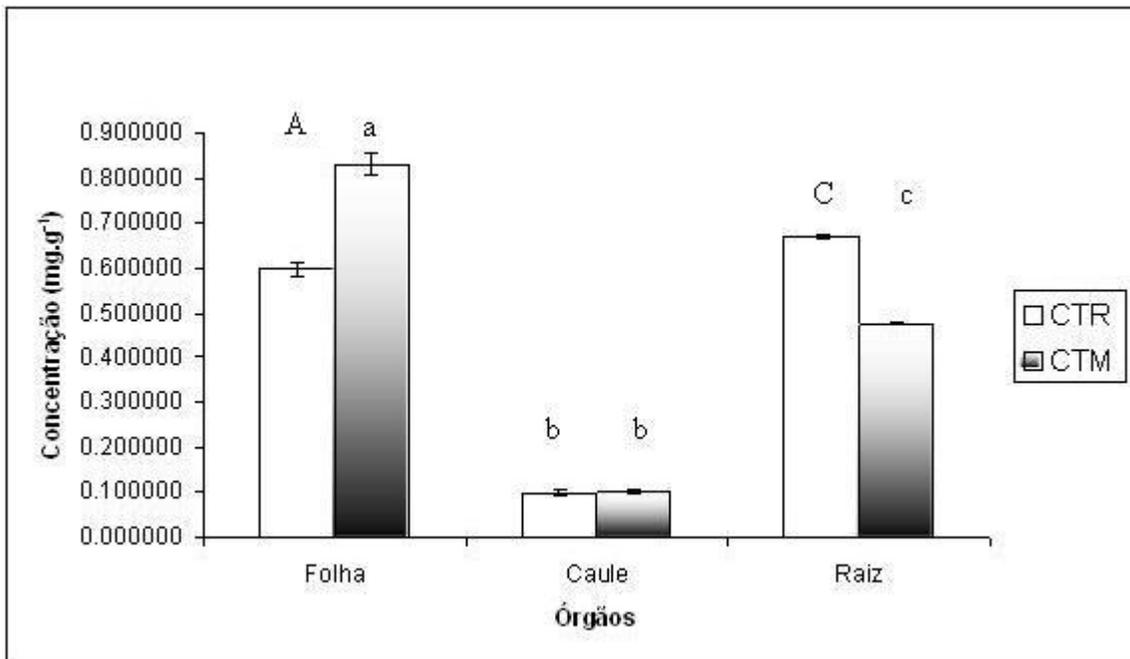


Figura 19 - Alumínio (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

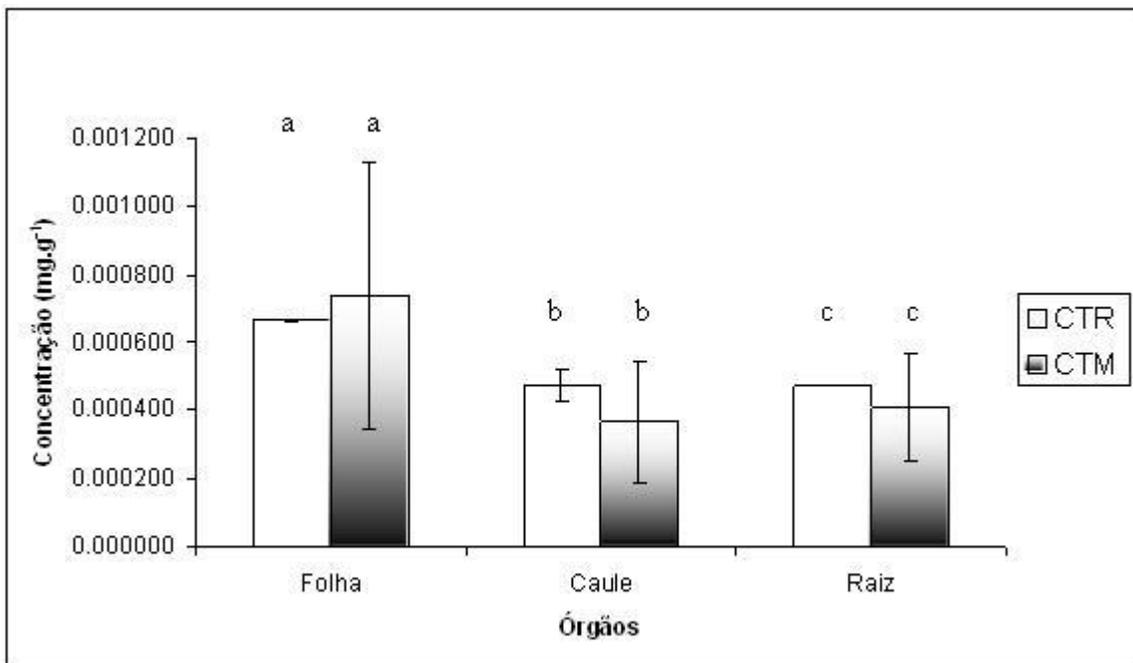


Figura 20 - Cádmiu (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

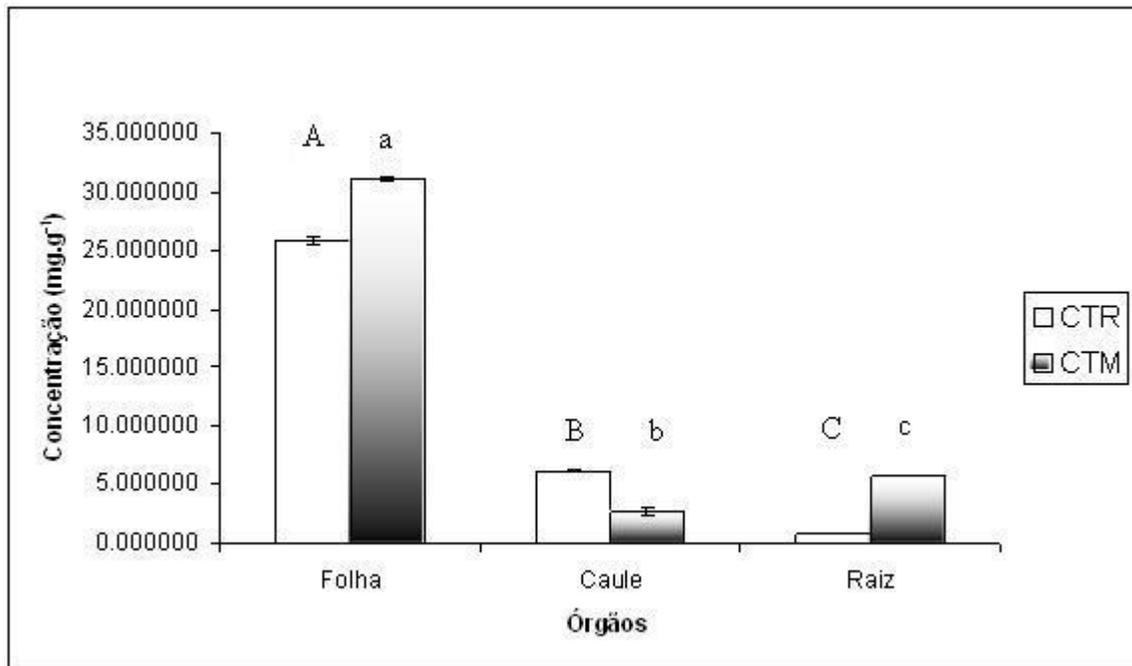


Figura 21 - Cálcio (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

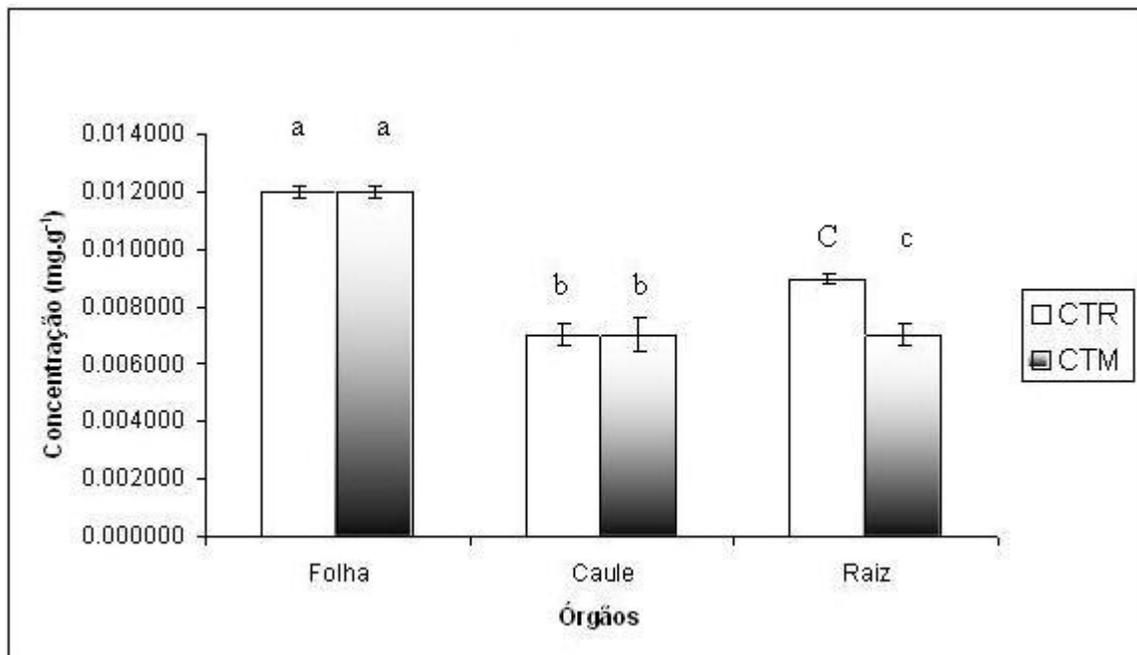


Figura 22 - Cobre (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

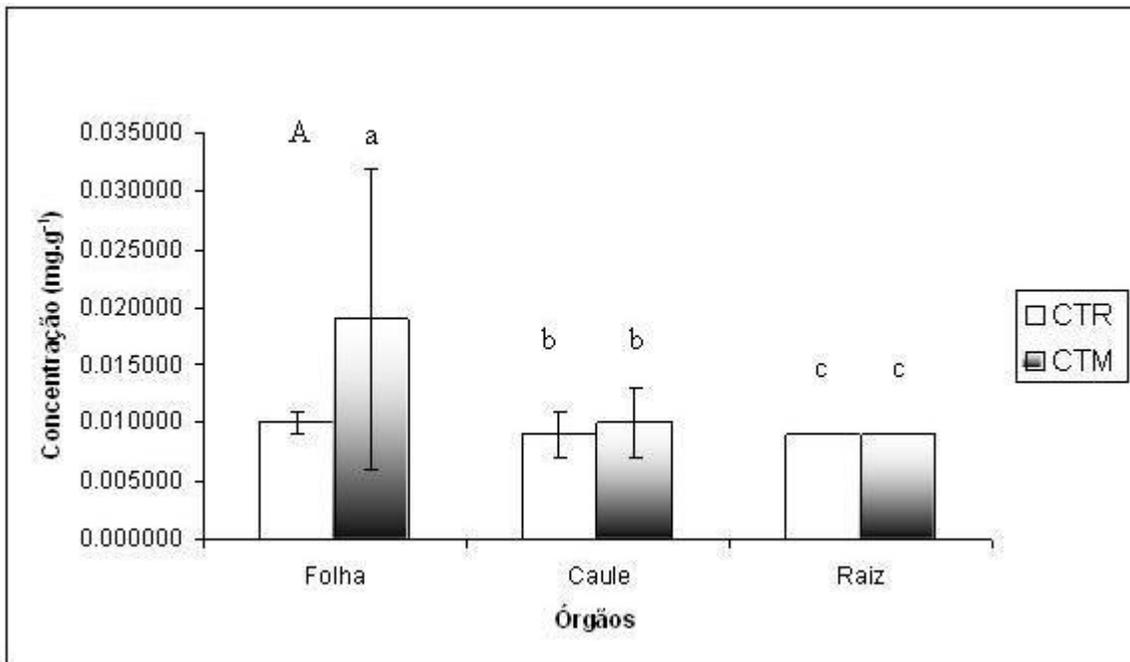


Figura 23 - Cromo (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

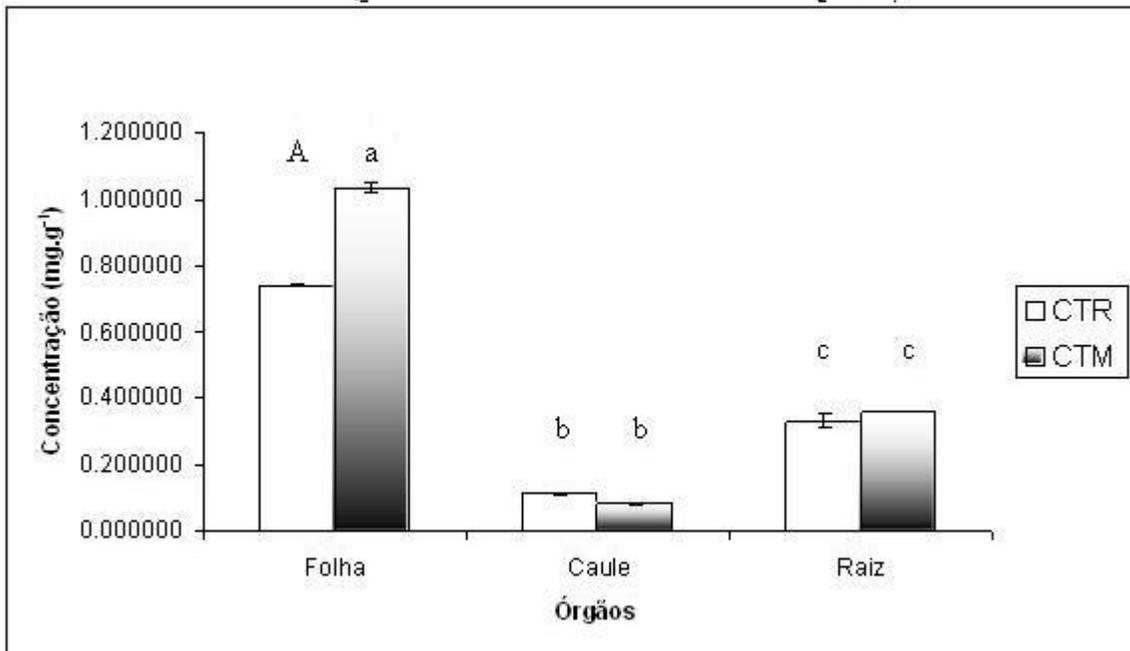


Figura 24 - Ferro (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

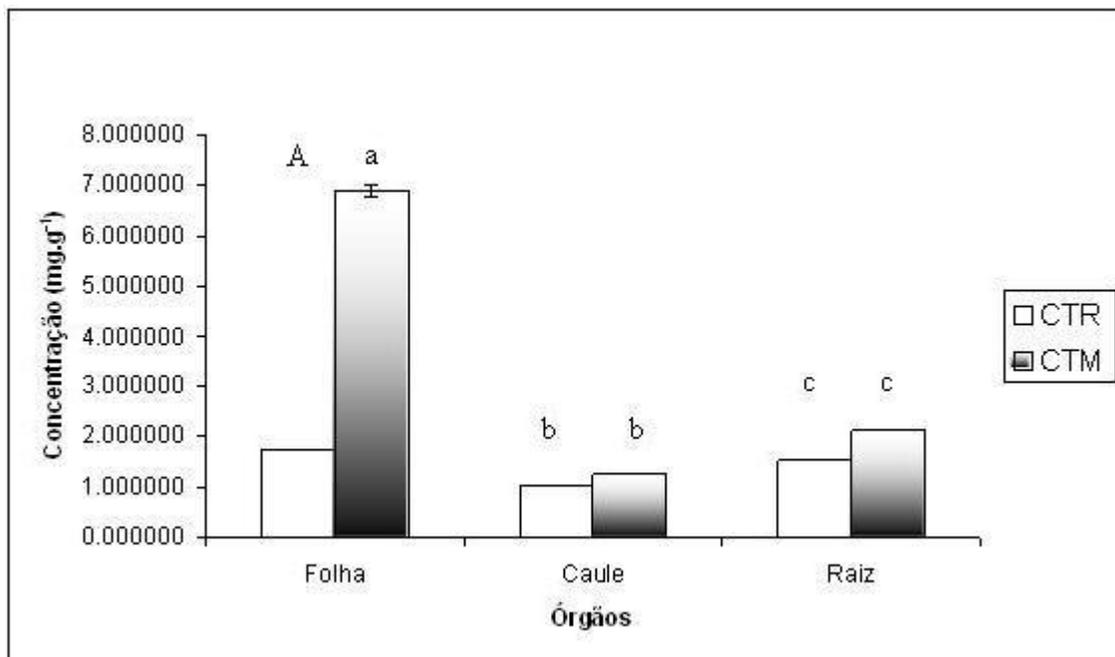


Figura 25 - Magnésio (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

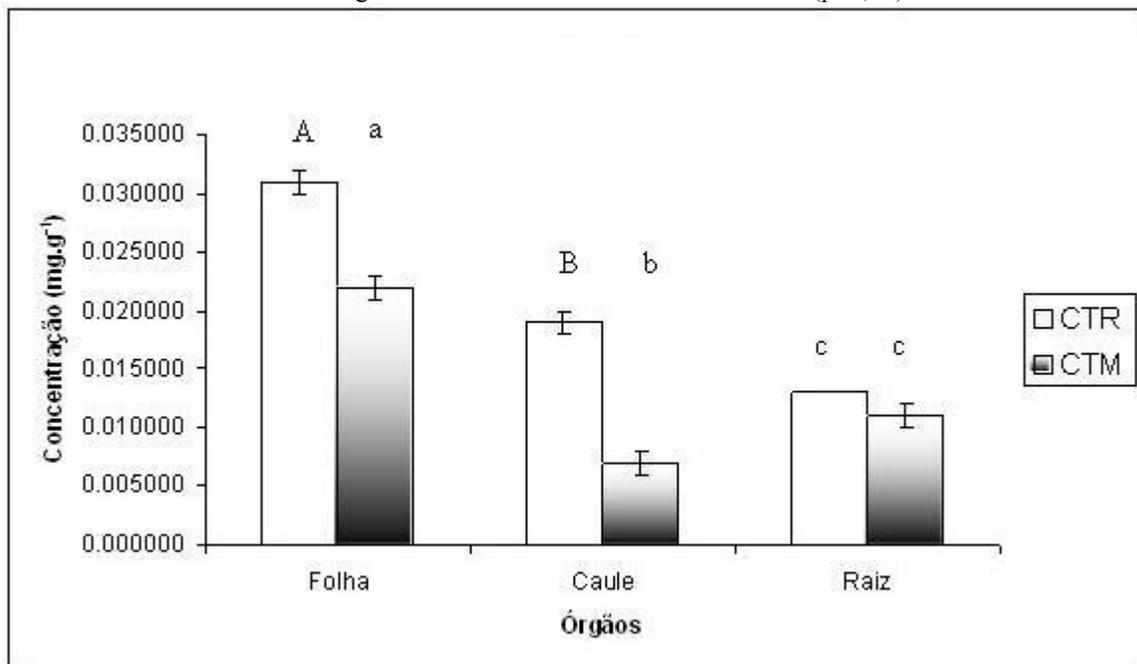


Figura 26 - Manganês (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

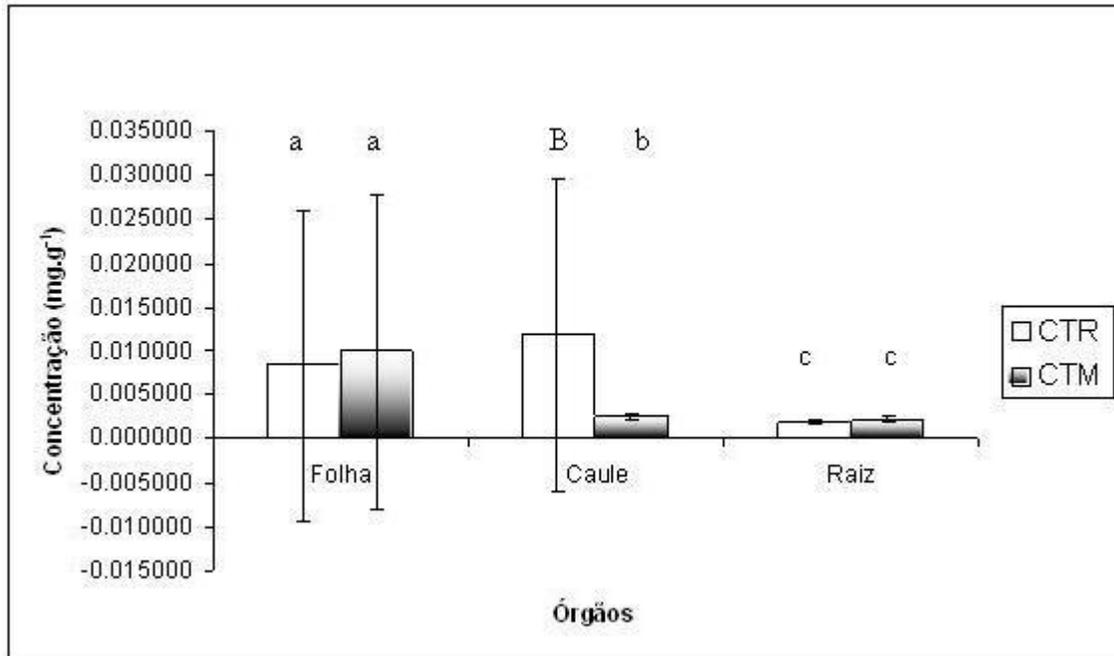


Figura 27 - Níquel (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

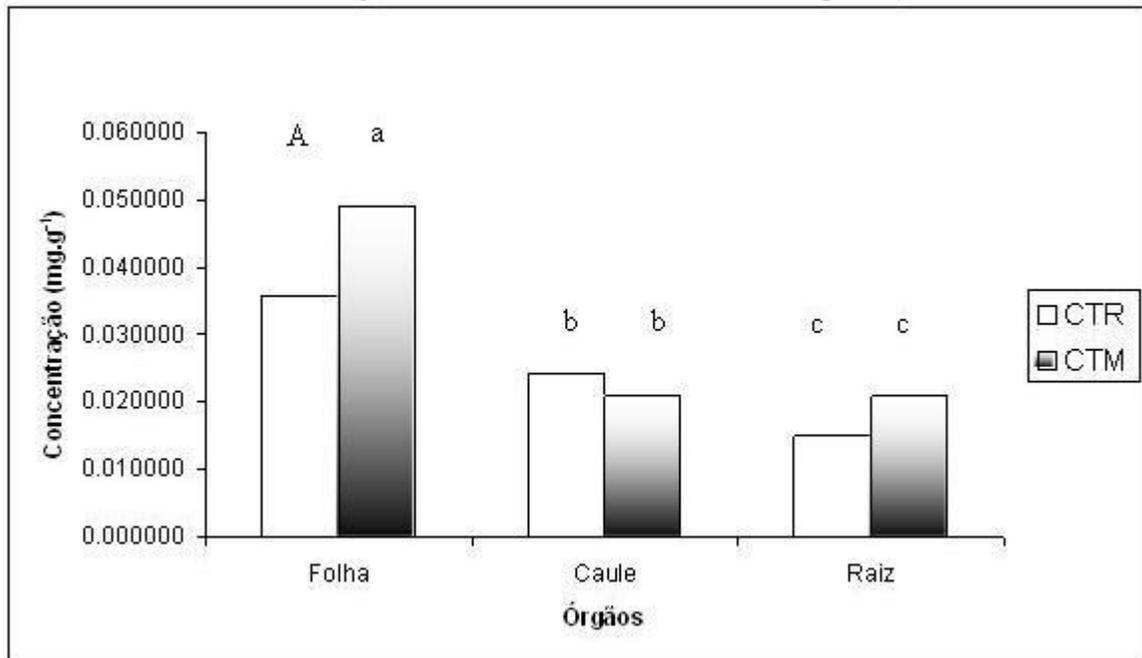


Figura 28 - Zinco (mg.g⁻¹) determinado em folha, caule e raiz de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio em solo controle (CTR) e solo contaminado (CTM), obtido de uma média de três plantas por tratamento. Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Foi calculado o CITR que, segundo Marques et al. (2000), indica quantas vezes a razão do teor Raiz (R)/Parte Aérea (PA) é superior na presença de contaminantes, onde CITR maior que 1,0, indica maior teor proporcional de metal na raiz no solo contaminado. Deste modo, no caso de Cr, cujo CITR é baixíssimo (0,07) (Tabela 11), houve menor retenção proporcional deste metal na raiz de cedro em solo contaminado, quando comparado ao controle. Para Cu, Mn, Ni e Zn, os valores de CITR ultrapassam a unidade, indicando maior retenção desses metais na raiz no solo contaminado. Para Ca, o CITR é altíssimo, 6,76, indicando uma maior retenção deste nutriente na raiz no solo contaminado do que no controle.

Tabela 11 - Coeficiente de impacto no teor proporcional (CITR) de metal entre a raiz (R) e a parte aérea (PA) de *Cedrela fissilis*.

	Al	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Zn
	-----CITR*-----									
<i>Cedrela fissilis</i>	0,53	6,76	0,89	0,07	1,16	0,83	0,47	1,46	1,88	1,20

* CITR = Razão do teor R/PA de cada elemento obtido do solo contaminado dividido pela razão do teor R/PA obtido do solo controle.

Também foi medido o IT de cada elemento para o tratamento no solo controle e no solo contaminado. O índice de translocação, segundo Abichequer e Bohnen (1998), indica o movimento ou a transferência de íons da raiz para a parte aérea da planta, sendo representado pela porcentagem da quantidade total absorvida que foi transferida para a parte aérea. Paiva et al. (2002) apontam a inexistência de estudos relacionando a influência da presença de metais pesados sobre os índices de translocação de nutrientes em arbóreas, afirmando que é importante saber sobre os efeitos da contaminação na translocação de nutrientes, uma vez que eles são essenciais para o desenvolvimento da planta.

A baixa translocação de determinado metal para a parte aérea da planta pode contribuir para a baixa sensibilidade da espécie à contaminação (SOARES et al. 2001). Entretanto, os índices observados são relativamente altos, todos superiores a 50% (Figura 29), tanto no tratamento com solo controle quanto no solo contaminado, demonstrando que *Cedrela fissilis* é uma espécie que acumula pouco os metais nas raízes. Esses resultados são diferentes daqueles demonstrados por Soares et al. (2001) que observaram valores de IT de Zn e Cd menores que 40% em *Cedrela fissilis* quando comparado a outras espécies vegetais e com os resultados

apresentados por Marques et al. (2000), onde *Cedrela fissilis* apresentou baixa translocação dos metais para a parte aérea da planta. Entretanto, para Melo et al. (2006), o sucesso de uma técnica de fitoextração depende da habilidade das plantas em acumular concentrações de metais pesados na parte aérea que sejam suficientemente elevadas para reduzir a concentração de metais no solo em níveis toleráveis. Romeiro (2005) também afirma que uma espécie vegetal ideal em programas de fitoextração de metais em solos além de ser tolerante aos metais, também deve acumular grandes quantidades do metal pesado na parte aérea. Desta forma, *Cedrela fissilis* pode ser uma boa candidata na descontaminação de solos contaminados por metais pesados, uma vez que translocou a maior parte dos metais da raiz para a parte aérea.

Quando em solo contaminado, o menor valor observado foi de 64,47% para o cobre. De maneira oposta, a planta translocou grande parte de cromo, ferro, níquel e zinco da raiz para a parte aérea, sendo o IT maior que 75% (Figura 29).

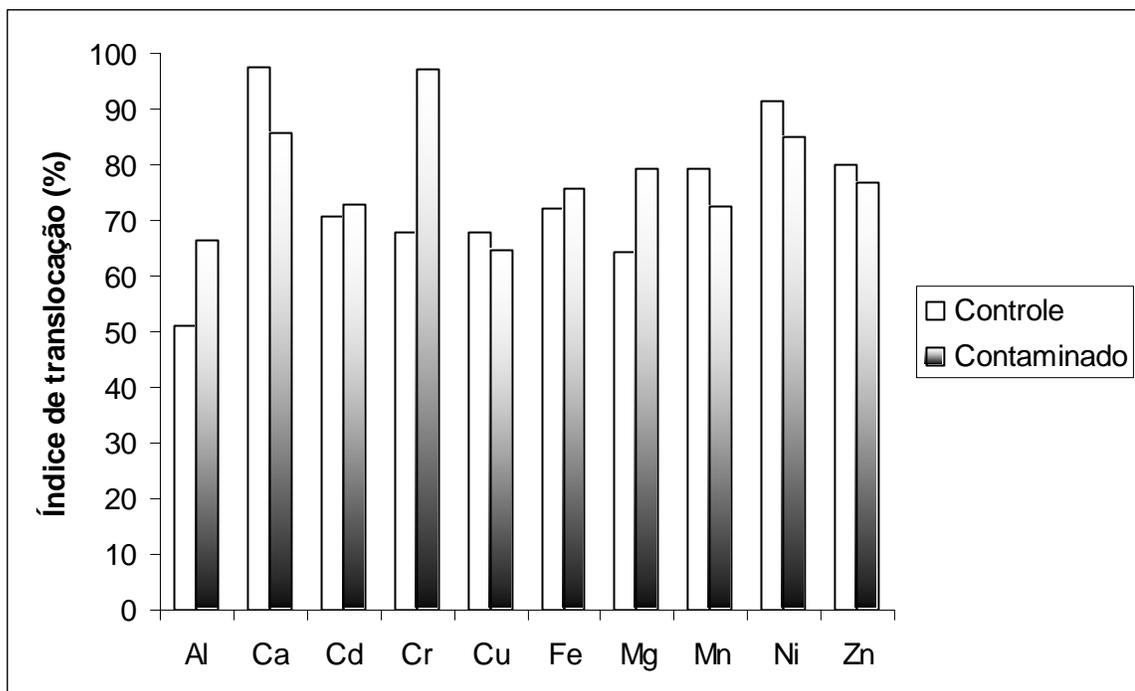


Figura 29 - Índice de translocação (%) de Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn em mudas de *Cedrela fissilis* crescidas em solo controle e solo contaminado.

É possível relacionar o CITR com o IT, sendo que o primeiro varia de modo direto com a capacidade da espécie vegetal em limitar a translocação dos elementos da raiz para a parte aérea da planta. Isso pode ser verificado mais uma vez no caso do Ca, onde o CITR é maior que 1,0, indicando maior retenção proporcional do nutriente na raiz em solo contaminado, do que no controle, ou seja, houve maior translocação de Ca da raiz para a parte aérea no solo controle.

No caso de Ca, Cu, Mn, Ni e Zn, o IT é maior no solo controle do que no solo contaminado. Isto pode ser devido ao fato da contaminação de alguma forma estar inibindo a translocação de determinados nutrientes da raiz para a parte aérea de *Cedrela fissilis*. Isso foi observado por Paiva et al. 2002, onde a presença de cádmio reduziu o IT de cobre em *Cedrela fissilis* até a dose de 57,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Cd.

Com relação ao índice de remoção (IR) (Tabela 12), *Cedrela fissilis* apresentou índices de remoção maiores do que aqueles obtidos por Santos (2005) para *Amaranthus crentus* (Amaranthaceae) e *Brassica juncea* (Brassicaceae) na remoção de zinco e *Hybiscus cannabinus* (Malvaceae) e *Raphanus sativus* (Cruciferaceae) na remoção de cobre. Segundo Lasat (2000) uma espécie vegetal pode ser considerada bem sucedida na descontaminação de metais em solos, quando extrai de 1 a 2% do metal em excesso no solo. Desta forma, todos os índices de remoção no caso de *Cedrela fissilis*, para todos os metais, com exceção de Cd, foram superiores a 1% (Tabela 12), sendo essa espécie uma candidata em potencial à extração de metais em solos.

Tabela 12 - Índice de remoção (%) de Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn em mudas de *Cedrela fissilis* crescidas em solo controle e solo contaminado.

	Índice de Remoção (IR) %								
	Al	Ca	Cd	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Zn
Controle	24,97	6,76	---	10,19	4,77	5,76	4,47	---	7,15
Contaminado	13,98	2,93	0,64	1,06	8,90	11,36	1,78	9,66	1,17

--- não calculado

4.3 CULTIVO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

Utilizando-se o método já descrito, após 24 horas de incubação do meio de cultura, as unidades formadoras de colônias foram contadas, sendo os resultados mostrados na Figura 30.

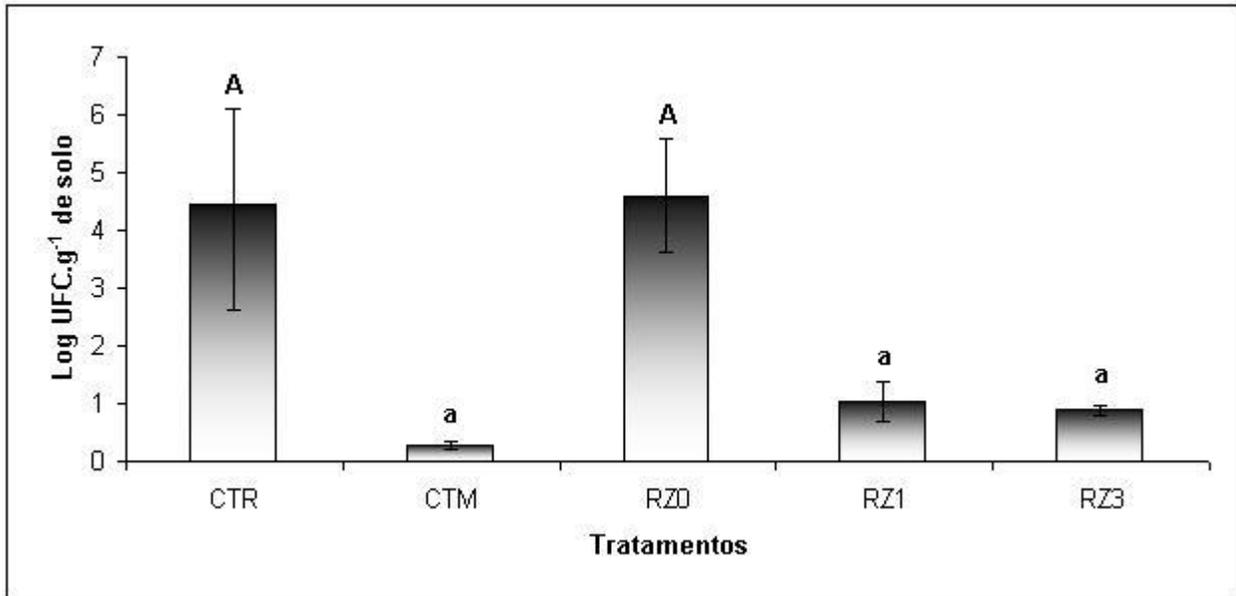


Figura 30 - Densidade bacteriana por tratamento, obtida a partir do isolamento em tampão PBS e após diluição e inoculação em meio de cultura. Solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3). Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). As médias referem-se à análise de três repetições constituídas de plantas distintas.

Observa-se um maior número de UFC obtidas no solo controle e na rizosfera antes do plantio, demonstrando a susceptibilidade microbiana em função dos contaminantes do solo. Sabe-se que a contaminação por metais pode alterar a comunidade microbiana, reduzindo sua biomassa (CHANDER et al., 2001). Sandaa et al. (1999) observaram uma redução na porcentagem de *Archaea* de 1,3% no solo não contaminado, para níveis não-detectáveis em solo contaminado por metais pesados.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

4.4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA

As características morfológicas dos microrganismos isolados do solo controle e do solo contaminado e também da rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero, após um mês e após três meses de plantio em solo 100% contaminado encontram-se no Apêndice A.

Em todos os tratamentos, foi observada uma maior frequência de bactérias na forma de bacilos Gram-positivos (Tabela 13), sendo predominantes os gêneros: *Arthrobacter* sp. e *Bacillus* sp. (resultados completos encontram-se no item 4.4.2). Estes resultados estão de acordo com Silva e Nahas (2002) que dos isolados de solo submetido a diferentes correções e fertilizações, por exemplo, 95% correspondiam a bactérias na forma de bacilos Gram-positivos. Além disso, o número de bacilos Gram-positivos esporulados foi superior nas parcelas fertilizadas com fosfato do que nas não adubadas. Nicholson et al. (2000) afirmaram que a concentração de alguns íons metálicos pode propiciar a esporulação de alguns microrganismos, então, as espécies de *Bacillus* identificadas tanto no solo quanto na rizosfera de *Cedrela fissilis* são conhecidas por possuírem endósporos o que representa uma estratégia para a resistência destas espécies em condições adversas no solo.

Tabela 13 - Frequência de bactérias (%) quanto à morfologia, coloração de Gram, existência da enzima catalase e potencial de fermentar a lactose de isolados de solo controle (CTR), solo contaminado (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3).

Tratamentos	Morfologia		Gram		Catalase	Fermentação da lactose
	Cocos	Bacilos	+	-		
	-----%					
CTR	37,50	61,54	80,00	20,00	84,62	7,69
CTM	38,46	62,50	60,00	40,00	87,50	25,00
RZ0	34,15	65,85	69,23	30,77	85,37	21,95
RZ1	43,24	56,76	78,95	21,05	83,78	13,51
RZ3	32,26	67,74	78,57	21,43	82,26	19,35

Entretanto, Abaye et al. (2005) realizaram a contagem de microrganismos presentes em solos contaminados por metais pesados, sendo que a contagem de Gram-negativos foi maior do que a contagem de microrganismos Gram-positivos. O mesmo foi observado por Piotrowska-Seget et al. (2005) que notaram uma predominância de bactérias Gram-negativas em solos contaminados por metais pesados. Garau et al. (2007) estudando a adição de bauxita e cal em

solos contaminados por Pb, Cd e Zn observaram uma alteração na população de bactérias cultiváveis, de Gram-positivas para Gram-negativas. Quanto à comunidade bacteriana da rizosfera, há um conflito quanto às diferenças na estrutura dessas comunidades, visto que a composição da comunidade é variável devido a inúmeros fatores. A composição dos exsudatos, por exemplo, varia de espécie para espécie, tipo de cultivo e estágio de desenvolvimento da planta. Assim sendo, as comunidades rizosféricas também irão diferir quanto à composição e densidade, além de variar de acordo com a espécie, tipo de raiz, idade da planta, zona radicular e tipo de solo, resultando no estabelecimento de uma microbiota específica a determinadas espécies de plantas e a certos estágios de desenvolvimento (ANDERSON et al., 1993; BATTISTA-LEBOEUF et al., 2003; MARSCHNER et al., 2001). Por exemplo, há evidências de que bactérias Gram-positivas estão em maior concentração na rizosfera de crisântemo, cevada e capim em condições normais, por exemplo, (SMALLA et al., 2001), entretanto, Atlas e Bartha (1992) apontam para uma maior predominância de microrganismos Gram-negativos assim como Benisse et al. (2004) que também observaram uma maior abundância de microrganismos Gram-negativos em solo rizosférico de plantas metalófitas.

Com relação à presença da enzima catalase que é capaz de converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, mais de 82% das bactérias de todos os tratamentos mostrou ser possuidora da enzima (Tabela 13). Já para a fermentação da lactose, a maior parte dos isolados não é fermentadora da lactose, representada por menos que 26% das bactérias (Tabela 13).

4.4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A PCR para amplificação do gene de interesse foi realizado com sucesso (Figura 31). Após análise da amplificação e clivagem do DNA com a enzima *HhaI* foi obtido um padrão das bandas (Figura 32) que possibilitou agrupar os microrganismos em ribotipos, sendo que cada ribotipo foi representado por um padrão de banda semelhante.

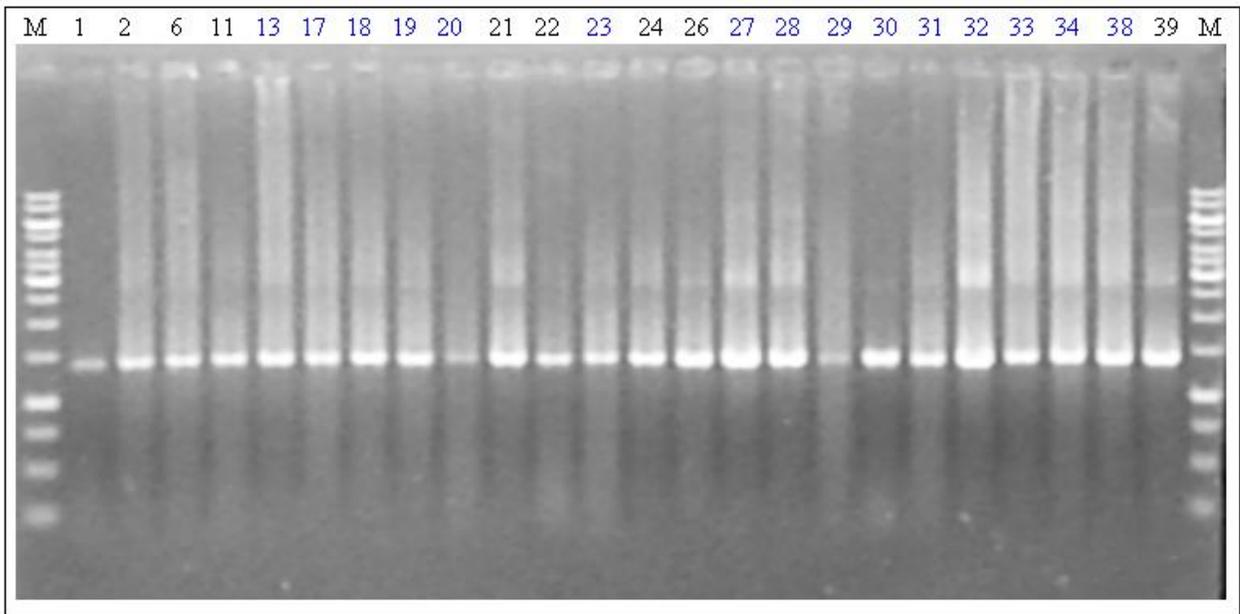


Figura 31 - Resultado do gel após amplificação do gene 16S DNAr. Observe a banda que representa o fragmento amplificado de aproximadamente 1340 pares de base (pb). Os isolados estão representados pelos números.

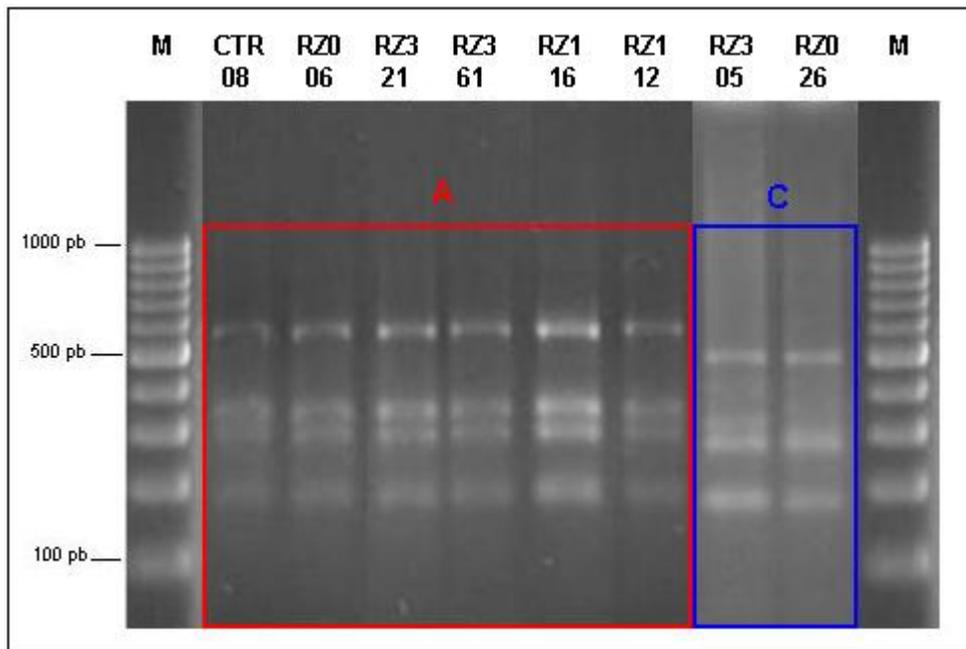


Figura 32 - Técnica de ARDRA, com marcador molecular de 100 pares de base representado pela letra M. Quadrados coloridos representam alguns ribotipos obtidos, sendo o quadrado vermelho ribotipo A e quadrado azul escuro ribotipo C. Os isolados estão indicados pelo código seguido de um número.

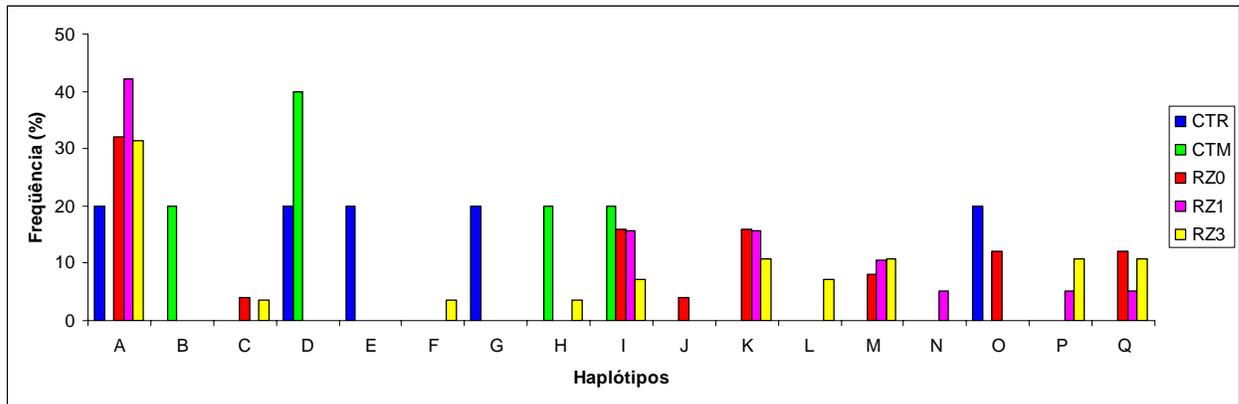


Figura 33 - Frequência dos ribotipos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3).

A análise dos diferentes padrões de bandas obtidos com a utilização da enzima *HhaI* permitiu agrupar os isolados do solo controle, solo contaminado, solo da rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero, após um mês de plantio em solo 100% contaminado e após três meses de plantio em solo 100% contaminado em 17 ribotipos diferentes.

Os ribotipos E e G (Figura 33), foram encontrados exclusivamente no solo controle e o ribotipo B no solo contaminado. O ribotipo J apresentou exclusividade para a rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero, o ribotipo N apenas apareceu na rizosfera de cedro após 1 mês de plantio, já os ribotipos F e L mostraram ser exclusivos da rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado.

O ribotipo A foi o mais freqüente na comunidade bacteriana presente em todos os tratamentos, com exceção do solo contaminado. O ribotipo I foi observado em todos os tratamentos com exceção do solo controle. O ribotipo D apresentou apenas amostras obtidas do solo, não havendo amostras rizosféricas. O ribotipo O apresentou apenas amostras obtidas do solo controle e da rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero. O ribotipo H apresentou amostras obtidas do solo contaminado e da rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminando. Os ribotipos K, M e Q mostraram-se exclusivos das amostras obtidas de *Cedrela fissilis* nos três períodos observados. Por fim, o ribotipo P mostrou-se exclusivo das amostras obtidas na rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês e três meses de plantio em solo 100% contaminado.

Desta forma, os ribotipos observados a partir dos isolados de solo controle, solo contaminado por metais pesados, rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero e após um e três meses de plantio em solo 100% contaminado por metais pesados apresentaram relação filogenética com os seguintes filos: Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria.

Com base no dendrograma obtido para o Filo Firmicutes (Figura 34), o clado em que consta a amostra obtida do solo contaminado por metais pesados (CTM 06) apresentou um suporte de 100%, afiliando-se a *Bacillus pumilus*. Para as amostras obtidas da rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0 26) e após três meses de plantio (RZ3 05) também foi obtido um suporte de 100%, afiliando-se ao gênero *Bacillus*. CTR 02, obtida do solo controle, obteve um suporte de 87% para o ramo, associando-se a *Bacillus sporothermodurans*. As amostras obtidas do solo contaminado (CTM 10, CTM 01) e solo controle (CTR 05) apresentaram um bom suporte para o ramo, afiliando-se a *Lysinibacillus sphaericus*. RZ3 43, obtida do solo rizosférico de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio, associou-se ao gênero *Bacillus*, pois o ramo encontra-se suportado por um índice de 99% para *B. acidicer* e *B. shandongensis*. Já RZ3 60 e RZ0 22 obtidas respectivamente de solo rizosférico de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio e solo rizosférico antes do plantio, afiliaram-se a *Bacillus sp.*

Para o Filo Proteobacteria (Figura 35), o ramo que suporta a amostra obtida de solo contaminado (CTM 09) possui um índice consistente de 99%, afiliando-se a *Serratia marcescens*. Do mesmo modo, CTR 07 obtida do solo controle afiliou-se a *Acinetobacter baumannii* e CTM 11, obtida do solo contaminado, a *Acinetobacter radioresistens*. As amostras obtidas do solo rizosférico de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio, RZ3 35 e RZ3 45, apresentaram um suporte de 91% para o clado, associando-se ao gênero *Pseudomonas*.

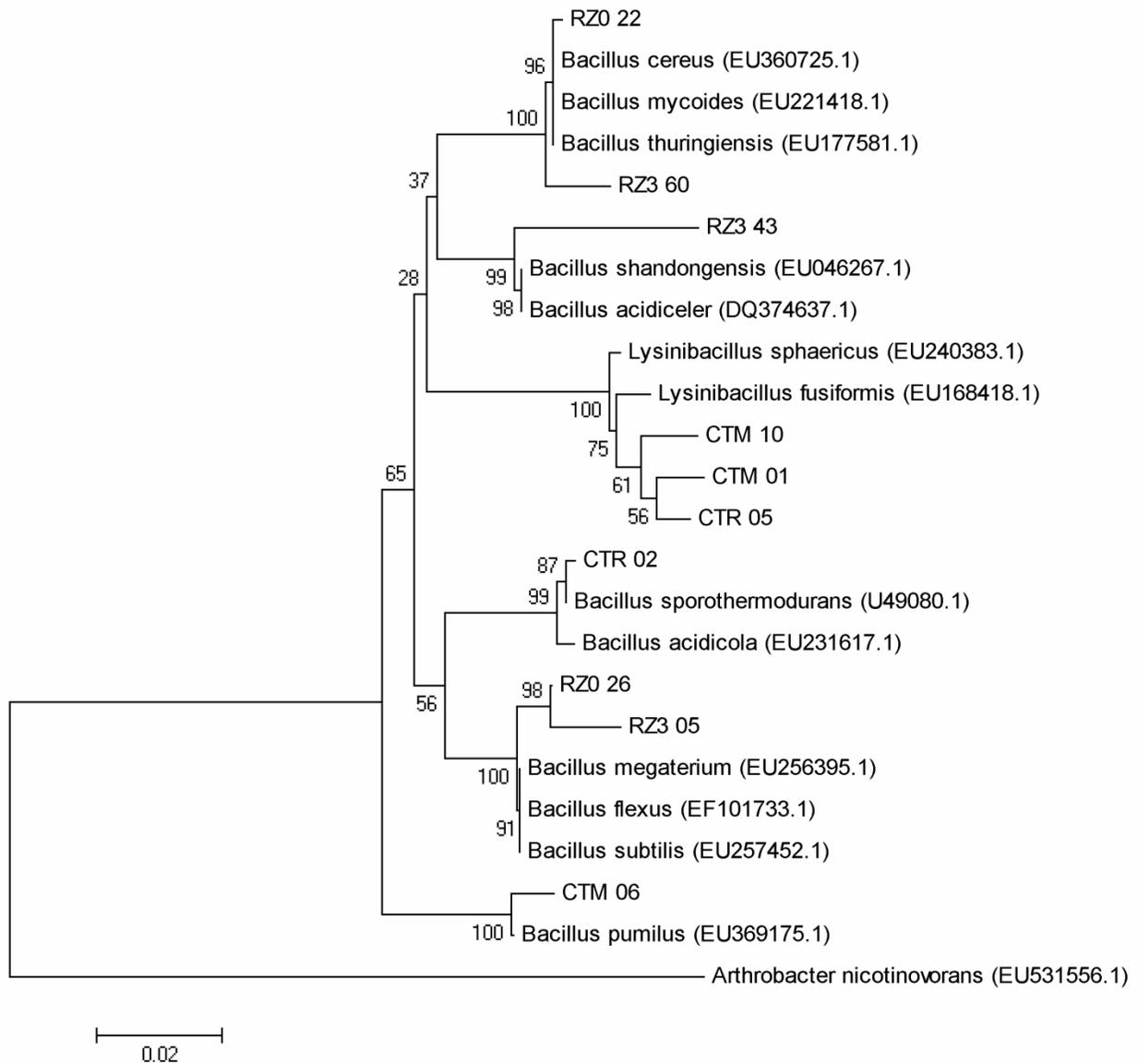


Figura 34 - Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Firmicutes, mostrando a relação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por *Arthrobacter nicotinovorans*. A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de *bootstrap* (n= 1000 réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.

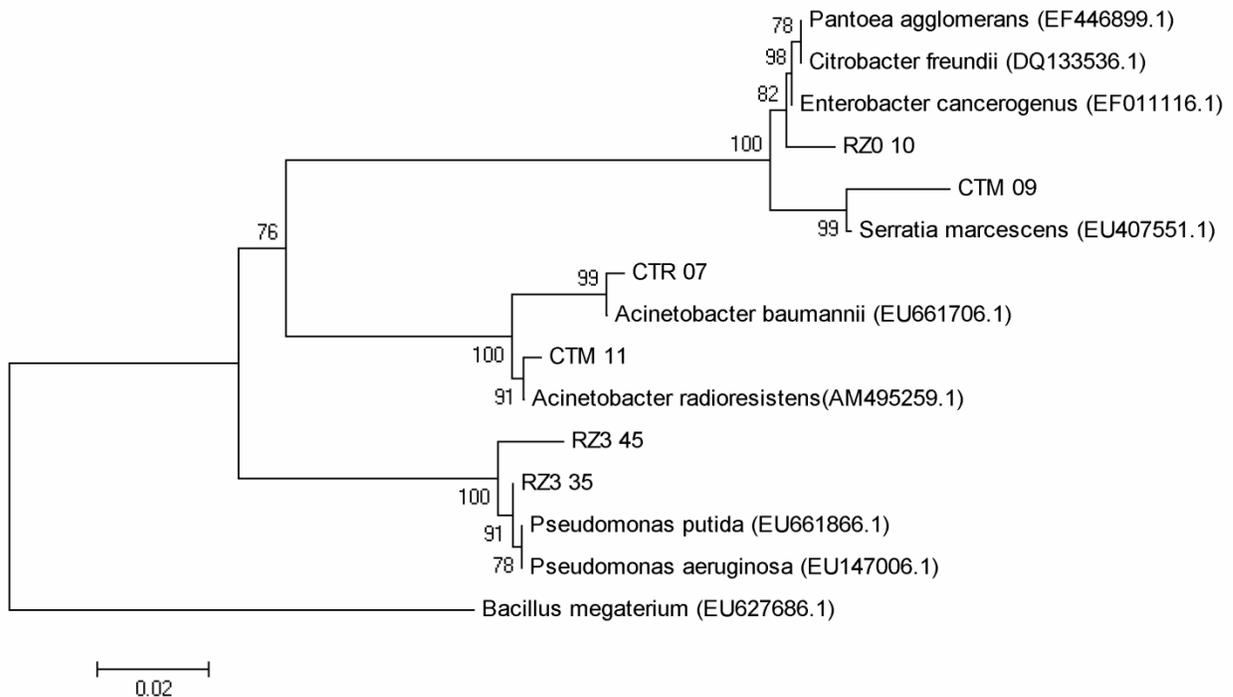


Figura 35 - Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Proteobacteria, mostrando a relação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por *Bacillus megaterium*. A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de *bootstrap* (n= 1000 réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.

A Figura 36 apresenta o dendrograma obtido para o Filo Actinobacteria. A amostra RZ0 03, obtida do solo rizosférico de *Cedrela fissilis* no tempo zero, apresentou um suporte de 100% para o ramo, afiliando-se a duas espécies do gênero *Rhodococcus*: *R. boritolerans* e *R. erythropolis*. As amostras obtidas da rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio (RZ3 19 e RZ3 26) apresentaram um índice de *bootstrap* de 99%, associando-se ao gênero *Microbacterium*. Já RZ1 33 (obtida da rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio) afiliou-se a *Leifsonia* sp., com um índice de 99%. RZ1 08 (obtida da rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio) apresentou um suporte do ramo de 99%, afiliando-se a *Arthrobacter ramosus* e *A. pascens*. A amostra obtida de solo controle (CTR 03) e solo rizosférico no tempo zero (RZ0 20 e RZ0 18), apresentaram um índice de 96%, associando-se a *Arthrobacter nicotinovorans* e *A. boritolerans*. As amostras obtidas respectivamente de solo rizosférico de *Cedrela fissilis* após um mês e após três meses de plantio, RZ1 19 e RZ3 52, são suportadas pelo

ramo com um índice de 99%, afiliando-se a *Arthrobacter* sp. e *Micrococcus* sp. Desta forma, a possível identificação dos ribotipos obtidos neste estudo encontra-se na Tabela 14.

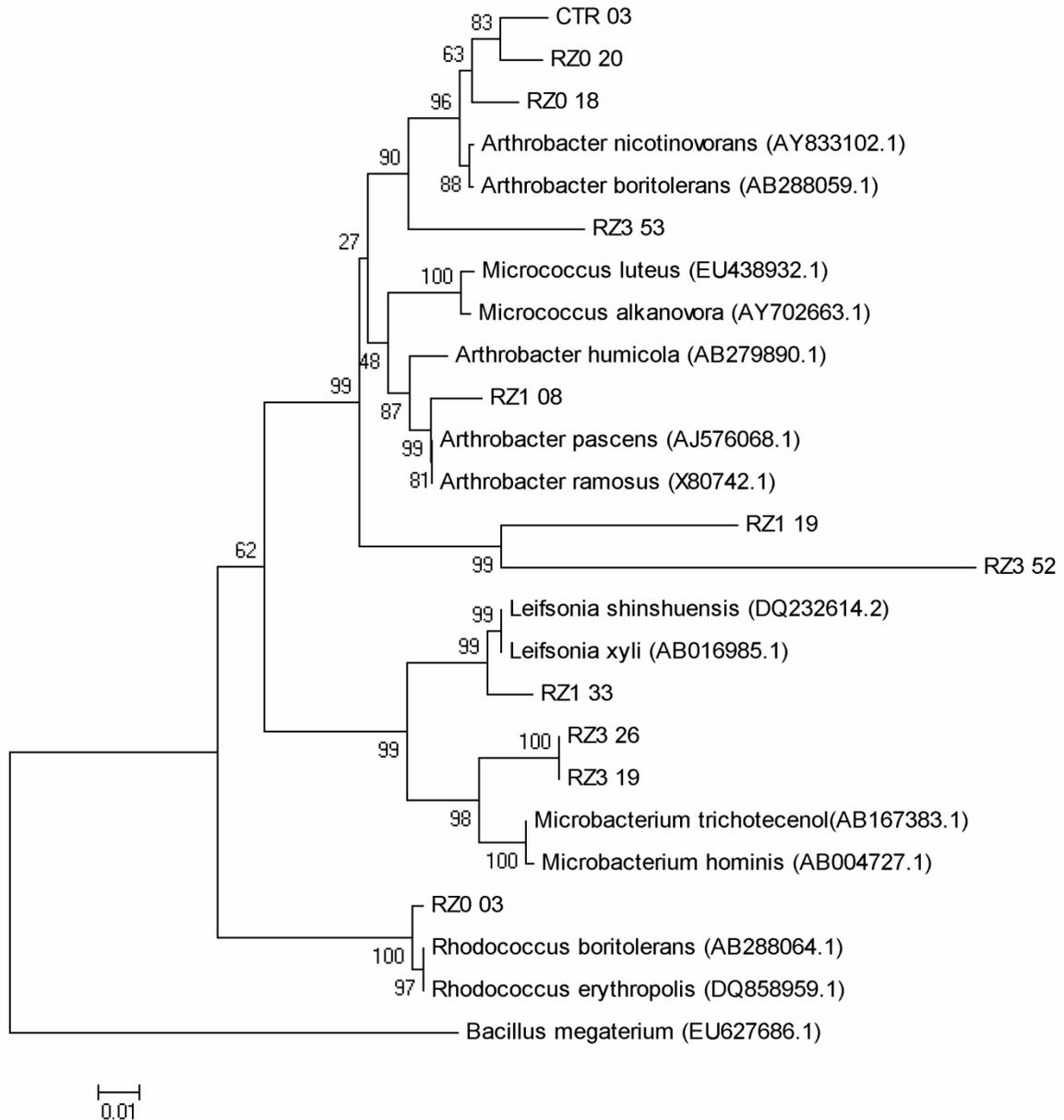


Figura 36 - Dendrograma baseado na região 16S DNAr do Filo Actinobacteria, mostrando a relação dos isolados obtidos na comunidade do solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) com demais seqüências do banco de dados. O grupo externo encontra-se representado por *Bacillus megaterium*. A barra indica a distância em nucleotídeos trocados. Valores de *bootstrap* (n= 1000 réplicas) estão representados por números em cada nó. Os números de acesso das seqüências obtidas no GenBank são fornecidos entre parênteses após cada espécie.

Tabela 14 - Número de isolados de espécies que apresentaram maior similaridade determinada pelo BLAST para seqüências de 16S DNAr após análise dos dendrogramas, obtido de solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3) e seus respectivos ribotipos.

Ribotipo	Organismo	CTR	CTM	RZ0	RZ1	RZ3
	<i>Bacillus cereus</i>					
A	<i>Bacillus mycoides</i>	1	-	8	8	11
	<i>Bacillus thuringiensis</i>					
B	<i>Bacillus pumilus</i>	-	1	-	-	-
	<i>Bacillus flexus</i>					
C	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	1	-	1
	<i>Bacillus subtilis</i>					
D	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	2	-	-	-
E	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	1	-	-	-	-
	<i>Bacillus acidiceler</i>					
F	<i>Bacillus shandongensis</i>	-	-	-	-	1
G	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	-	-	-	-
H	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	-	1	-	-	1
I	<i>Serratia marcescens</i>	1	1	3	3	2
	<i>Citrobacter freundii</i>					
J	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	-	1	-	-
	<i>Pantoea agglomerans</i>					
K	<i>Rhodococcus boritolerans</i>	-	1	4	3	3
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>					
L	<i>Microbacterium hominis</i>	-	-	-	-	2
	<i>Microbacterium tricholecanolyticum</i>					
M	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	-	-	2	2	3
	<i>Leifsonia xyli</i>					
N	<i>Arthrobacter pascens</i>	-	-	-	1	-
	<i>Arthrobacter ramosus</i>					
O	<i>Arthrobacter boritolerans</i>	1	-	3	-	1
	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>					
P	<i>Arthrobacter sp.</i>	-	-	-	1	1
	<i>Micrococcus sp.</i>					
Q	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	3	1	3
	<i>Pseudomonas putida</i>					

Os isolados obtidos neste estudo com maior frequência no solo, pertencem aos gêneros que são comumente observados em isolamentos de microrganismos de solos. Ellis et al. (2003), analisando a diversidade bacteriana em solos contaminados por metais pesados com a técnica de DGGE, foram observados os seguintes gêneros comuns ao estudo em questão: *Arthrobacter sp.* e *Bacillus sp.* (Tabela 15). Martinez et al. (2007) também observaram a presença de *Arthrobacter sp.* e *Bacillus sp.* em solos contaminados por urânio. Já em pesquisa realizada por Turpeinen et al. (2004) em solo contaminado por arsênico, cromo e cobre, também foram encontrados os gêneros *Acinetobacter sp.* e *Serratia sp.* comuns ao estudo. Chien et al. (2008) observaram em solo contaminado por Cd e Cr a presença de nove espécies de bactérias (Tabela 15), dentre elas

Acinetobacter sp. também encontrada no solo do presente trabalho, com capacidade de tolerar altas concentrações de cádmio ($>500 \mu\text{mol. L}^{-1}$). Ansari e Malik (2007) observaram em solo contaminado por Fe, Cr, Cu, Zn, Ni e Cd a presença de *Pseudomonas* sp. e espécies representantes da família Enterobacteriaceae, embora *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. não tenham sido identificadas no solo contaminado por metais pesados, apenas na rizosfera. O gênero *Lysinibacillus sphaericus* (ribotipo D) foi encontrado exclusivamente no solo não-rizosférico (Tabela 14). Wenderoth et al. (2001) observaram em solo contaminado com Cd, Cu, Ni e Zn a presença de 12 ribotipos (Tabela 15), entre eles, o ribotipo representado por *Arthrobacter nicotinovorans* isolada neste trabalho apenas no solo controle e na rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero e após três meses de plantio em solo 100% contaminado. Os resultados encontrados por Ellis et al. (2003) sugerem que a quantidade e a diversidade das bactérias cultiváveis podem ser usadas como indicadores efetivos da poluição do solo, refletindo as perturbações observadas em outros organismos da biota presente no solo.

Tabela 15 - Exemplos da ocorrência de microrganismos isolados em solos contaminados por diferentes metais pesados.

Origem	Espécies encontradas	Referências
Solo contaminado por diversos metais pesados	<i>Denitrobacter</i> sp., <i>Nitrospira</i> sp., <i>Comamonas</i> sp., <i>Streptomycooides</i> sp., <i>Thermobispora</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Rahnella</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Sporocytophaga</i> sp., <i>Stentrophomonas</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Magnetospirillum</i> sp. e <i>Propionibacterium</i> sp.	ELLIS et al. (2003)
Solo com arsênico, cromo e cobre	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Edwardsiella</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. e <i>Serratia</i> sp.	TURPEINEN et al. (2004)
Solo com urânio	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. E <i>Rahnella</i> sp.	MARTINEZ et al. (2007)
Solo contaminado por Fe, Cr, Cu, Zn, Ni e Cd	<i>Pseudomonas</i> sp. e espécies da família Enterobacteriaceae	ANSARI; MALIK (2007)
Solo contaminado por Cd e Cr	<i>Polyangium</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Variovorax</i> sp., <i>Hafina</i> sp., <i>Clostridia</i> sp., <i>Acidobacteria</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp.	CHIEN et al. (2008)
Solo contaminado por Fe	<i>Leifsonia xyli</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Burkholderia caribensis</i> e <i>Burkholderia ferrariae</i> .	DELVASTO et al. (2008)
Solo contaminado por Cd, Cu, Ni e Zn	<i>Bacillus macrocanus</i> , <i>Arthrobacter ramosus</i> , <i>Sphingobacterium heparium</i> , <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , <i>Flavobacterium johnsonii</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Arthrobacter globiformis</i>	WENDEROTH et al. (2001)

Com relação aos microrganismos isolados da rizosfera de *Cedrela fissilis*, na literatura não foram encontrados artigos relacionando estes com a planta em questão, sendo este presente trabalho uma contribuição para estudos futuros.

A planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* quando submetida ao plantio em solos com metais pesados apresentou uma dominância de microrganismos pertencentes ao filo Actinobacteria em sua rizosfera (GREMION et al., 2003) (Tabela 16). Foram isolados microrganismos rizosféricos de duas espécies vegetais da família Proteaceae (*Leucospermum xanthoconus* e *Leucadendron truncatulum*), observando-se que os gêneros *Chloroflexus* e *Azospirillum* mostraram-se restritos à espécie *L. xanthoconus*. Já o gênero *Frankia* foi restrito à espécie *L. truncatulum* (STAFFORD et al., 2005). Benisse et al. (2004) estudando a rizosfera de plantas metalófitas como *Rhus pentaphylla* (Anacardiaceae), *Mesembryanthemum nodiflorum* (Aizoaceae), *Salsola vermiculata* (Amaranthaceae) e *Peganum harmala* (Nitrariaceae), observaram a presença de microrganismos Gram-negativos como *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavobacterium* sp., *Xanthomonas* sp. e *Acinetobacter* sp. e microrganismos Gram-positivos representados principalmente por espécies do gênero *Bacillus*. Wang et al. (2008) estudando o efeito da adição de Cu na composição da comunidade microbiana da rizosfera de *Eslholtzia splendens*, descobriram diversas espécies (Tabela 16), sendo *Arthrobacter* sp. e *Bacillus* sp. comuns ao presente estudo. Nawani e Kapadnis (2001) na rizosfera de palmeira observaram a presença do gênero *Serratia marcescens*. Chatuverdi et al. (2006) estudando a rizosfera de *Phragmites australis* (Poaceae), observaram a presença de *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas migulae*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, sendo o gênero *Bacillus*, *Microbacterium* e *Pseudomonas* comuns aos gêneros encontrados na rizosfera de *Cedrela fissilis*.

Tabela 16 - Exemplos da ocorrência de microrganismos isolados da rizosfera de diferentes espécies vegetais.

Origem	Espécies	Referência
Rizosfera de palmeira	<i>Serratia marcescens</i>	NAWANI; KAPADNIS (2001)
Rizosfera de <i>Thlaspi caerulescens</i> (Brassicaceae) quando submetida em solos com metais pesados	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Agrobacterium sanguineum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Turicibacter sanguinis</i>	GREMION et al. (2003)
Rizosfera de plantas metalófitas como <i>Rhus pentaphylla</i> , <i>Mesembryanthemum nodiflorum</i> , <i>Salsola vermiculata</i> e <i>Peganum harmala</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp. e <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	BENISSE et al. (2004)
Rizosfera de <i>Phragmites australis</i> (Poaceae)	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas migulae</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	CHATUVERDI et al. (2006)
Rizosfera de espécies da família Graminaceae submetidas a um solo contaminado por Cd, Ni, Cu	<i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.	DELL'AMICO et al. (2008)
Rizosfera de <i>Leucospermum xanthoconus</i> e <i>Leucadendron truncatum</i> (Proteaceae)	<i>Chloroflexus</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Frankia</i> sp.	STAFFORD et al. (2005)
Rizosfera de <i>Elsholtzia splendens</i> (Lamiaceae) acumuladora de Cu	<i>Kitasatospora arboriphila</i> , <i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i> , <i>Ralstonia picketti</i> , <i>Brevundimonas</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Nesterenkonia halotolerans</i> , <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> , <i>Rhodanobacter spathiphylli</i> , <i>Sphingoterrabacterium koreensis</i>	WANG et al. (2008)

Variações sazonais também podem interferir na comunidade, sendo que ao longo de um ano, Smit et al. (2001) detectaram os gêneros *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium* em um solo de cultivo de trigo, sendo que em Julho a diversidade foi menor e o gênero *Bacillus* só foi encontrado nesta época do ano. Battista-Leboeuf et al. (2003) observaram na raiz de trigo uma diversidade bacteriana menor aos trinta dias de crescimento do que nos estágios iniciais, atribuindo esta diferença à natureza e quantidade dos exsudatos. Heuer et al. (2002) estudando a rizosfera de batatas transgênicas e convencionais por três anos consecutivos detectaram que as diferenças eram devido a fatores ambientais como estação do ano e local de coleta, não atribuindo essas diferenças à transgenia. Wieland et al. (2001) apontam para uma dificuldade em

avaliar se as variações nas comunidades são devidas ao tipo de solo, tipo de planta ou desenvolvimento da planta, pelo fato da escassez dos métodos convenientes de exploração. Já Brusetti et al. (2004) estudando a rizosfera de trigo conseguiram atribuir as diferenças na comunidade rizosférica às diferentes idades da planta. A contaminação por metais pesados, como já mencionado anteriormente, também afeta a estrutura da comunidade microbiana, por meio da redução de sua diversidade (KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2000; REBER, 1992). Portanto, neste presente trabalho, as diferenças observadas na estrutura da rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero e após um e três meses de plantio em solo 100% contaminado, podem ser atribuídas à contaminação. Entretanto, é importante também saber de que modo ocorre o estabelecimento e o equilíbrio da microbiota rizosférica, para também auxiliar no entendimento da dinâmica das comunidades. Ibekwe e Grieve (2004) observaram que no caso da alface, a comunidade bacteriana demorou de 7 a 12 dias para seu estabelecimento.

Algumas bactérias isoladas neste estudo, já são conhecidas na literatura devido a algum uso potencial na biorremediação de compostos exógenos. A bactéria encontrada neste estudo e que apresentou similaridade com *Acinetobacter radioresistens*, por exemplo, é conhecida por produzir um biosurfactante denominado de *Alasan* (NAVON-VENEZIA et al., 2002), além disso, é um microrganismo com capacidade de degradar fenol (BRIGANTI et al., 1997) e metil paration, um pesticida organofosforado (LIU et al., 2007). Já *Arthrobacter nicotinovorans* que apresentou similaridade com os isolados do solo controle e rizosfera de *Cedrela fissilis* antes do plantio e após três meses de plantio, é uma bactéria com potencial de degradar atrazina (AISLABIE et al., 2005), entretanto, não foi encontrada nenhuma função relacionada à oxidação de metais pesados. *Bacillus pumilus* detectado no solo contaminado, é conhecido por seu potencial de degradar naftaleno (CALVO et al., 2004). Bactérias do gênero *Rhodococcus* são capazes de acumular céσιο tanto por transporte ativo quanto por sorção inespecífica (IVSHINA et al., 2002) e a espécie *R. erythropolis* é capaz de degradar m-toluato (JUSSILA et al., 2006). Há um extenso relato da utilização de *Pseudomonas aeruginosa* (isolada da rizosfera de *Cedrela fissilis* em todos os tratamentos) quanto à resistência a um alto nível de Zn e Cd (HASSAN et al., 1999) e 1,5 mM de Cd (HASSEN et al., 1997).

O estudo dos microrganismos do solo e da rizosfera de diversas espécies vegetais é interessante, pois a partir dos dados obtidos é possível selecionar aqueles microrganismos que possuem capacidades metabólicas de oxidar alguns íons metálicos (no caso da contaminação por

metais pesados) e realizar testes com toxicidade destes perante alguns íons, testes de produção de sideróforos e surfactantes, testes de aplicação de consórcio e determinação da degradação de xenobióticos, testes de capacidade de indução de crescimento de plantas e absorção de metais, entre outros.

Quanto à capacidade de redução de alguns metais, foram testados *Bacillus cereus*, *B. fusiformis* e *B. sphaericus* isolados de uma área com cromo hexavalente, ocorrendo uma redução máxima de Cr(VI) *in vitro* por *B. cereus* e *B. fusiformis* a um pH 7,0 e *Bacillus sphaericus* exibiu a máxima redução a um pH de 6,0. Já *Bacillus fusiformis* foi o microrganismo que exibiu a taxa mais rápida de redução, com redução completa de 100 µM de Cr(VI) dentro de 100 minutos (DESAI et al., 2008). A redução de metais e sua detoxificação pode ser catalisada por enzimas solúveis na presença de oxigênio ou então por enzimas redutases associadas às membranas como no caso de *Pseudomonas putida* e *Escherichia coli* para redução de Cr (VI) a Cr(III) (CHEUNG; GU, 2007). Duponnois et al. (2006) isolaram *Pseudomonas monteillii* de um cupim (*Macrotermes subhyalinus*) e inocularam-na em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) (Poaceae) submetidas a um solo contendo CdCl₂, resultando num aumento significativo da absorção de Cd pela planta. Aboud-Shanab et al. (2006) testando alguns isolados obtidos da rizosfera de *Alyssum murale* (Brassicaceae) quanto ao seu potencial de solubilizar Ni, observaram que a espécie *Microbacterium oxydans*, por exemplo, aumentou significativamente a extração de Ni, podendo ser utilizada em inóculos com a finalidade de aumentar a extração deste íon durante os processos de fitorremediação. Wani et al. (2007) isolaram *Bradyrhizobium* sp. de nódulos de *Vigna* sp. (Fabaceae) crescida em solo com metais pesados. Em seguida, inocularam a espécie de rizóbio em vegetais, observando uma redução na absorção de Ni e Zn pelas plantas. Rajkumar e Freitas (2008) aplicaram *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas jessenii*, com capacidade de promover crescimento em plantas e resistentes a metais, em *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) para avaliar os efeitos na absorção de metais. Concluíram, deste modo, que *Pseudomonas* sp. foi mais eficiente na solubilização de zinco e *Pseudomonas jessenni* na solubilização de níquel e cobre. Para um programa de fitorremediação de ambientes contaminados por metais pesados obter êxito, o ideal seria a combinação de bactérias resistentes aos metais com capacidade de reduzir a absorção destes pelas plantas, além de capacidade de promover crescimento das espécies vegetais selecionadas (MADHAIYAN et al., 2007). Eles chegaram à essa conclusão observando que *Methylobacterium oryzae* e *Burkholderia* sp. além de reduzirem a toxicidade de Ni e Cd em

plantas de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) também promovem seu crescimento. Jiang et al. (2008) também isolaram *Burkholderia* sp. de solo com metais pesados e observaram a produção de AIA (ácido indol acético), sideróforos e capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e quando aplicadas em plantas de tomate e milho submetidas em solo com metais pesados, foram capazes de aumentar sua biomassa e a absorção de Pb e Cd. Em trabalho semelhante, Dell'Amico et al. (2008) (Tabela 16) identificaram as bactérias *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes* sp. e *Mycobacterium* sp. isoladas da rizosfera de gramináceas perenes submetidas a um solo contaminado por Cd, Cu e Ni e notaram que as linhagens estudadas quando inoculadas em *Brassica napus* (Brassicaceae) protegeram a planta contra os efeitos inibitórios de Cd, provavelmente devido à produção de AIA, sideróforos e atividade enzimática. Uma linhagem do gênero *Bacillus* isolada de um solo contaminado por metais pesados, foi capaz de produzir sideróforos, além de AIA e ainda mostrou-se resistente a Pb, Cd, Cu, Ni e Zn (SHENG et al., 2007). Quanto à promoção de crescimento vegetal, *Bacillus fusiformis* isolado da rizosfera de trigo, soja, alface, pimenta, milho, arroz e gergelim, apresentou uma grande capacidade de produção de AIA (PARK et al., 2005).

Com relação à degradação de xenobióticos, Jacques et al. (2008) utilizaram um consórcio de *Microbacterium* sp., *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Gordonia polyisoprenivorans*, uma bactéria da família Microbacteriaceae que usa naftaleno e um fungo *Fusarium oxysporum* obtidos de uma área contaminada por HPAs para degradar antraceno, fenantreno e pireno, de modo que foi observada uma degradação superior a 96% dos compostos após 70 dias de incubação pelo consórcio de microrganismos. Quando aplicados separadamente, foi observada uma mineralização menos efetiva do antraceno. Kumar et al. (2007) testaram um consórcio composto de *Alcaligenes faecalis*, *Shingomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Enterobacter cancerogenus* para detoxificação de um corante têxtil que foi mineralizado a dois outros compostos de reduzida citotoxicidade aos leucócitos testados. Chatuverdi et al. (2006), na rizosfera de *Phragmites australis* (Poaceae), isolaram 15 espécies de bactérias cultiváveis e testaram-nas quanto a capacidade de descoloração de efluentes de destilaria. Algumas espécies de *Bacillus* e *Serratia marcescens* foram aplicadas em consórcio, demonstrando bom potencial em degradar pentaclorofenol e possibilidade de uso em descoloração de efluentes de indústria papelreira (SINGH et al., 2007). O uso de surfactantes podem ser uma alternativa para a descontaminação de solos com metais pesados. Juwarkar et al. (2007) testaram um surfactante

produzido por *Pseudomonas aeruginosa* na remoção de Cd e Pb de um solo artificialmente contaminado, sendo que o surfactante não somente removeu a fração lixiável, ou seja, os metais disponíveis, mas também aqueles metais ligados às partículas de solo. Foram encontrados, tanto no solo quanto na rizosfera de *Cedrela fissilis*, vários representantes do gênero *Bacillus*, podendo ser candidatos potenciais ao uso nas técnicas de rizorremediação, uma vez que após três semanas Jézéquel et al. (2005) observaram uma redução do Cd fitodisponível ao aplicar-se *Bacillus* sp. livres ou imobilizados em solo contaminado por Cd. *Rhodococcus erythropolis* foi utilizado em uma membrana semipermeável para recuperação de Cs de água (TOMIOKA et al. 1998). Já Tuzen et al. (2008) imobilizaram *Pseudomonas aeruginosa* em um nanotubo de carbono para testar a sorção de íons metálicos, mostrando ser uma tecnologia simples, rápida e econômica. Outro exemplo de utilização de microrganismos inclui a aplicação de *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter*, *nicotianae*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* para acumulação de tório a partir de uma solução de urânio e tório (TSURUTA, 2006).

Sabe-se que tanto o solo quanto a rizosfera são locais adequados para o estabelecimento de vários microrganismos patogênicos (BERG et al., 2005). Vários microrganismos isolados tanto no solo quanto na rizosfera de *Cedrela fissilis* podem apresentar a capacidade de patogenicidade para os seres humanos. Dentre eles podemos citar, por exemplo: *Acinetobacter baumannii* e *Serratia marcescens*, sendo relacionados a diversas infecções humanas, *Bacillus cereus* associado a vômito e diarreia, *Enterobacter cancerogenus* relacionada a infecções urinárias e respiratórias. Como na área de estudo foi observado um grande acúmulo de lixo domiciliar e proveniente da construção civil (Figura 37), esses microrganismos podem ter origem de práticas inadequadas de manejo deste lixo, podendo levar a uma proliferação de vetores de doenças que direta ou indiretamente afetam a saúde da população (PINNOCK, 1998).



Figura 37 - Lixo encontrado na área de estudo proveniente tanto da construção civil quanto de lixo domiciliar. Fotos da autora.

A Tabela 17 apresenta o índice de diversidade de Shannon-Wiener obtido para os tratamentos.

Tabela 17 - Índice de Shannon obtido para análise da comunidade microbiana obtida de solo controle (CTR), solo contaminado por metais pesados (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio em solo 100% contaminado (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio em solo 100% contaminado (RZ3). Letras de tamanhos iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Tratamentos	Índice de Shannon (H')
CTM	1,33 A
CTR	1,61 A
RZ0	1,91 a
RZ1	1,35 A
RZ3	1,74 a

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparando-se o índice de diversidade do solo controle com o do solo contaminado (CTR x CTM); assim como CTR x RZ0; CTR x RZ1; CTR x RZ3; CTM x RZ1 e RZ0 x RZ3. As diferenças são apenas observadas para CTM x RZ0; CTM x RZ3; RZ0 X RZ1 e RZ1 x RZ3, onde o índice de

diversidade encontrado foi maior na rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero e após três meses de plantio em solo 100% contaminado, sendo menor no solo e na rizosfera de *Cedrela fissilis* após um mês de plantio.

4.5 ENSAIO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A Cd^{2+}

Olson e Thornton (1982) propuseram que a tolerância bacteriana a metais pode ser usada para determinar a sua biodisponibilidade e o potencial tóxico a outras formas de vida. Desta forma, os isolados bacterianos foram testados frente a cádmio, um metal tóxico de relevância ambiental, para verificar a resistência de cada isolado (Figura 38). As respostas dos isolados à Cd^{2+} encontram-se mais detalhadas no Apêndice B.

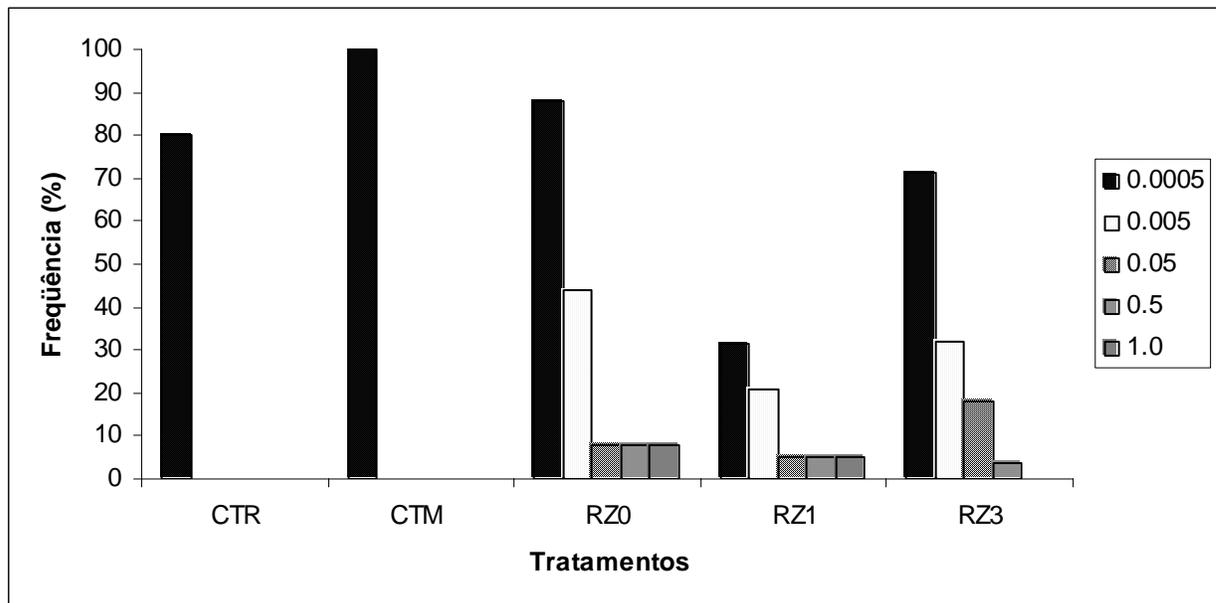


Figura 38 - Frequência de bactérias (%) isoladas de solo controle (CTR), solo contaminado (CTM), rizosfera de *Cedrela fissilis* no tempo zero (RZ0), rizosfera de *Cedrela fissilis* após 1 mês de plantio (RZ1) e rizosfera de *Cedrela fissilis* após três meses de plantio (RZ3) com habilidade para crescer em diferentes concentrações de CdCl_2 (mM).

Observa-se uma maior frequência de isolados rizosféricos antes do plantio com capacidade de crescer em altas concentrações de cádmio, sendo menos inibidos do que os isolados obtidos após 1 mês de plantio. Além disso, os isolados bacterianos do solo controle parecem ser mais sensíveis à contaminação, pelo fato de não ter sido observado nenhum isolado capaz de crescer nas concentrações de 1,0 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM.

Nenhum isolado apresentou crescimento excelente acima de 0,005 mM, com exceção de RZ3 24 identificado como *Serratia marcescens* quando submetido a 0,005 mM de Cd^{2+} . RZ0 20, RZ0 26 e RZ1 23, identificados como *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Rhodococcus* sp., respectivamente, apresentaram crescimento limitado nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1,0 mM. A tolerância a cádmio, por exemplo, pode ser explicada por um mecanismo de transporte ativo do metal para fora da célula para que a homeostase seja mantida, como o observado para *Azorhizobium caulinodans* (ZHENGWEI et al., 2005) ou então por mecanismos de sequestro do metal (ROSEN, 1996). No caso de *Alcaligenes eutrophus*, a resistência a mercúrio é conferida por meio de transposons e a resistência a cádmio, zinco, cobalto e níquel é explicada pela presença de plasmídeos (NIES; SILVER, 1989).

A resistência a determinados metais pode ser conferida por meio de genes de resistência. Abou-Shanab et al. (2007) estudando a tolerância de *Arthrobacter rhombi*, *Clavibacter xyli*, *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, *Rhizobium mongolense* e *Variovorax paradoxus* mediante a presença de As, Cd, Cr, Zn, Hg, Pb, Co, Cu, e Ni, descobriram o gene *czc* que oferece resistência a Zn, *chr* para Cr, *ncc* para Ni e *mer* para Hg. Para *Pseudomonas fluorescens* algumas proteínas parecem estar envolvidas em sua sobrevivência na presença de metais (SHARMA et al., 2006).

As bactérias Gram-positivas diferem das Gram-negativas quanto à habilidade em tolerar íons metálicos. Por exemplo, *Escherichia coli* e espécies de *Pseudomonas* são melhores que as bactérias Gram-positivas para continuar a síntese de proteínas na presença de Cd^{2+} (MOROZZI et al., 1986). E a espécie *Bacillus subtilis* é conhecida por sua resistência a esse íon metálico (COHEN et al., 1991).

Chen et al. (2006) testaram a toxicidade de Co(II), Mn(II), Cd(II) e Zn(II) frente a *Pseudomonas aeruginosa* observando que a toxicidade apresentou-se na ordem: $\text{Co} > \text{Mn} = \text{Zn} > \text{Cd}$, sendo o cobalto divalente o mais tóxico. Hassen et al. 1997 também testaram a concentração inibitória mínima para alguns isolados bacterianos obtidos de diversas fontes (Tabela 18), sendo

que *Bacillus thuringiensis* e *Proteus mirabilis* toleraram até 1,2 mM de Cd e *Pseudomonas aeruginosa* e *P. paucimobilis* até 1,5 mM. Já *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp. toleraram no mínimo 500 µmol/L de Cd (CHIEN et al., 2008). A espécie *Bacillus thuringiensis* tem a capacidade de imobilizar cádmio (EL-HELOW et al., 2000).

Tabela 18 - Exemplos de espécies de microrganismos capazes de tolerar altas concentrações de cádmio.

Espécie	Concentração de Cd	Referência
<i>Ancylobacter aquaticus</i> , <i>Arthrobacter keyseri</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i> , <i>Methylobacterium fujisawaense</i> , <i>Methylophilus methylotrophus</i> , <i>Pandoraea apista</i> , <i>Rhodococcus opacus</i>	≥ 50 ppm	MARCO et al. (2004)
<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	> 1,2 mM	HASSEN et al. (1997)
<i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.	> 500µmol/L	CHIEN et al. (2008)

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- Os níveis dos metais presentes no solo contaminado não afetaram o crescimento de cedro, talvez devido ao fato de: os metais como Cu, Zn, B, Mn e Fe não estarem biodisponíveis em pH alcalino ou então de os microrganismos rizosféricos estarem produzindo quelantes capazes de complexar os metais, tornando-os indisponíveis à absorção pela planta;
- *Cedrela fissilis* pode ser adequada para programas de fitorremediação, devido aos elevados índices de translocação, tolerância aos metais em seus tecidos e índices de remoção superiores a 1% para Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn;
- O índice estomático de *Cedrela fissilis* não foi afetado pela contaminação;
- As amostras obtidas do solo controle e do solo contaminado por metais pesados afiliaram-se a representantes dos gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Rhodococcus* e *Serratia*;
- As amostras obtidas de solo rizosférico de *Cedrela fissilis* coletada no tempo zero, após um mês de plantio em solo 100% contaminado e após três meses em solo 100% contaminado, afiliaram-se a representantes dos gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Serratia*. A maior frequência de um grupo morfológico em detrimento de outro, pode estar relacionada à presença de contaminantes, visto que a frequência dos microrganismos foi afetada pela contaminação por metais pesados;
- Com relação à resistência a Cd^{2+} , alguns isolados mostraram-se ser mais resistentes que outros, como podendo ser utilizados em consórcio para um processo de rizorremediação.

Há vários fatores abióticos e bióticos que devem ser considerados na escolha do melhor método de remediação de solos contaminados por metais pesados. A fitorremediação é uma alternativa bastante viável quando aplicada em conjunto com os microrganismos rizosféricos de plantas metalófitas. Isto é possível, pois deste sinergismo, as plantas fornecem nutrientes aos

microrganismos que tendo condições propícias ao desenvolvimento, aumentam em quantidade, incrementando a biodisponibilidade dos metais para que estes possam ser mais facilmente removidos pelas plantas.

A chave para o sucesso no método de fitorremediação está ainda na definição da espécie, sendo imprescindível um estudo prévio de bioacumulação de metais, além da verificação da tolerância da espécie aos diferentes metais biodisponíveis no solo. Tendo em mente as espécies candidatas aos programas de remediação, sugere-se a aplicação concomitantemente de plantas com diferentes metabolismos, pois uma espécie pode ser capaz de extrair determinado tipo de metal enquanto outra, não. Além disso, também é interessante realizar o plantio observando-se uma sucessão, primeiramente, a utilização de plantas de rápido crescimento e capazes de extrair os metais do solo, para posterior plantio de espécies arbóreas com potencial de fitoestabilizar esses metais. Entretanto, para se evitar a contaminação ao longo da cadeia alimentar, logo quando for observada uma extração significativa dos metais pela planta, esta deverá ser retirada do local, seguido de reciclagem e recuperação destes metais. É importante ressaltar também que torna-se imprescindível que todo o processo seja monitorado regularmente, até que concentrações aceitáveis dos metais no solo sejam atingidas.

Por fim, após um estudo mais aprofundado sobre a capacidade dos microrganismos isolados com relação à produção de sideróforos, AIA, capacidade de reduzir metais, resistência a metais, entre outros, seria interessante selecionar os microrganismos com maior versatilidade metabólica para que pudessem ser aplicados em consórcio para auxiliar nos processos de fitorremediação. Desta forma, torna-se necessário um melhor entendimento da relação planta *versus* microrganismos rizosféricos, para que todos os fatores relevantes possam ser considerados, de modo a se obter um processo de descontaminação mais eficiente.

REFERÊNCIAS

ABAYE, D.A.; LAWLOR, K.; HIRSCH, P.R.; BROOKES, P.C. Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. **European Journal of Soil Science**, v. 56, p. 93-102, fev. 2005.

ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 21-26, 1998.

ABOU-SHANAB, R.A.I.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2882-2889, 2006.

ABOU-SHANAB, R.A.I.; VAN BERKUM, P.; ANGLE, J.S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere**, v. 68, p. 360-367, 2007.

ADRIANO, D.C. **Trace Elements in the Terrestrial Environment**. New York: Springer-Verlag Inc, 1986.

AHTIAINEN, J.; VALO, R.; JÄRVINEN, M.; JOUTTI, A. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 2, p. 323-329, out. 2002.

AISLABIE, J.; BEJ, A.K.; RYBURN, J.; LLOYD, N.; WILKINS, A. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans*, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 2, p. 279-286, abr. 2005.

AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R.; ELNAWAWY, A.; BALBA, M.T. Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait. I. Landfarming to remediate oil-contaminated soil. **Journal of Soil Contamination**, v. 5, n. 3, p. 243-260, 1996.

ALCÁNTARA, J.M.; VERA, N.; SZCZIPANSKI, L.; EIBL, B.; RIOS, R. Análise de la dispersión de semillas de *Cedrela fissilis* em el bosque nativo de Misiones. **Yvyrareta**, n. 8, p. 16-21, 1997.

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; MANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995, p. 228-231.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons, 1977.

ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils. 2nd edition. United Kingdom: Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, 1995.

ALVARES, V.V.H.; NOVAES, R.F.; BARROS, N.F.; CANTARUTTI, R.B.; LOPES, A.S. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARAES, P.T.G.; ALVARES, V.V.H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHEIDLER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDERSON, R.T.; VRIONIS, H.A.; ORTIZ-BERNAD, I.; RESCH, C.T.; LONG, P.E.; DAYVAULT, R.; KARP, K.; MARUTZKY, S.; METZLER, D.R.; PEACOCK, A.; WHITE, D.C.; LOWE, M.; LOVLEY, D.R. Stimulating the *in situ* activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5884-5891, out. 2003.

ANDERSON, T.A.; GUTHRIE, E.A.; WALTON, B.T. Bioremediation. **Environmental Science & Technology**, v. 27, n. 13, p. 2630-2636, 1993.

ANDRADE, S.A.; SILVEIRA, A.P.D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1191-1198, dez. 2004.

ANSARI, M.I.; MALIK, A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. **Bioresource Technology**, V. 98, P. 3149-3153, 2007.

APG II. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LAKAVA, P.L. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba ESALQ – USP. 2002.

ASSUNÇÃO, A.G.L.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 159, p. 351, ago. 2003.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. California: Benjamin/Cummings, 1992.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas**. Versão 4.0, 2005.

AZADPOUR, A.; MATTHEWS, J.E. Remediation of metal-contaminated sites using plants. **Remediation**, v. 6, n. 3, p. 1-18, 1996.

BÅÅTH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 47, n. 3-4, p. 335-379, out. 1989.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1059-1066, maio 1977.

BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 1-4, 1981.

BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **New Phytologist**, v. 106, p. 93-111, 1987.

BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v. 1, p. 81-126, 1989.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 343-351, mar. 2002.

BATTISTA-LEBOEUF, C.; BENIZRI, E.; ORBEL, G.; PIUTTI, S.; GUCKERT, A. Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage. **Agronomie**, v. 23, p. 441-446, 2003.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

BENISSE, R.; LABAT, M.; ELASLI, A.; BRHADA, F.; CHANDAD, F.; LIEGBOTT, P.P.; HIBTI, M.; QATIBI, A.I. Rhizosphere bacterial populations of metallophyte plants in heavy metal-contaminated soils from mining areas in semiarid climate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 759-766, out. 2004.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673-1685, 2005.

BIRCH, L.; BACHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 46, n. 8, p. 827-834, ago. 1990.

BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, v. 134, n. 2, 189-207, jul. 1991.

BRASIL. Lei nº 6938, de 31 de agosto de 1981. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/l6938.htm>>. Acesso em 10 jan. 2008.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm>. Acesso em: 10 jan. 2008.

BRIGANTI, F.; PESSIONE, E.; GIUNTA, C.; SCOZZAFAVA, A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. **FEBS Letters**, v. 416, p. 61-64, 1997.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7th edition. New Jersey: Prentice-Hall International, Inc., 1994.

BROWN, S.L.; CHANEY, R.L.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, n. 1, p. 125-133, 1995.

BRUNS-NAGEL, D.; DRZYZGA, O.; STEINBACH, K.; SCHMIDT, T.C.; LÖW, E.; GORONTZY, T.; BLOTEVOGEL, K.-H.; GEMSA, D. Anaerobic / aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 11, p. 1676-1679, 1998.

BRUSETTI, L.; FRANZIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; GIUNTINI, E.; BAZZICALUPO, M.; DAFFONCHIO, D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. **Plant and Soil**, v. 266, p. 11-21, 2004.

BURKEN, J.G.; SCHNOOR, J.L. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. **Journal of Environmental Engineering**, v. 122, n. 11, p. 958-963, nov. 1996.

CAIAZZA, N.A.; QUINN, J.A. Leaf morphology in *Arenaria patula* and *Lonicera japonica* along a pollution gradient. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 107, n. 1, p. 9-18, 1980.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 255-262, 2004.

CAMPOS, J.; MARTÍNEZ-PACHECO, M.; CERVANTES, C. Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 203-208, 1995.

CAO, K.F. Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean health forest. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, n. 10, p. 1245-1253, 2000.

CARDOSO, L.M.N.; CHASIN, A.A.M. **Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos**. Série Cadernos de Referência Ambiental. Volume 6. Salvador: CRA, 2001.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1443-1452, dez. 2001.

CETESB. Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/realatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2008.

CETESB. Relação de áreas contaminadas – novembro de 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areascontaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2008.

CHANDER, K.; DYCKMANS, J.; JOERGENSEN, R.; MEYER, B.; RAUBUCH, M. Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 4, p. 241-247, 2001.

CHANEY, R.L.; MALIK, M.; LI, Y.M.; BROWN, S.L.; BREWER, E.P.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Phytoremediation of soil metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 279-284, 1997.

CHATUVERDI, S.; CHANDRA, R.; RAI, V. Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site for bioremediation of colored distillery effluent. **Ecological Engineering**, v. 27, p. 202-207, 2006.

CHAUDHRY, Q.; BLOM-ZANDSTRA, M.; GUPTA, S.K.; JONER, E. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 12, n. 1, p. 34-48, jan. 2005.

CHEN, B.-Y.; WU, C.-H.; CHANG, J.-S. An assessment of the toxicity of metals to *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1880-1886, 2006.

CHEUNG, K.H.; GU, J.-D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 8-15, 2007.

CHIEN, C.; KUO, Y.; CHEN, C.; HUNG, C.; YEH, C.; YEH, W. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 359-363, 2008.

COBBETT, C.S. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, v. 123, p. 825-832, jul. 2000.

COELHO, F.S.; VERLENGIA, F. **Fertilidade do solo**. 2ª edição. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.

COHEN, I.; BITON, R.; YESHAGAHU, N. The effect of zinc and cadmium ions on *Escherchia coli*. **Microbios**, v. 68, p. 157-168, 1991.

CONTE, P.; AGRETTO, A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 135, n. 3, p. 515-522, jun. 2005.

CROWLEY, D.E.; WANG, Y.C.; REID, C.P.P.; SZANISZLO, P.J. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. **Plant and Soil**, v. 130, n. 1-2, p. 179-198, jan. 1991.

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

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

DELL'AMICO, E.; CAVALCA, L.; ANDREONI, V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 74-84, 2008.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILLAR, C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, 718-723, fev.1999.

DELVASTO, P.; VALVERDE, A.; BALLESTER, A.; MUÑOZ, J.A.; GONZÁLEZ, F.; BLÁZQUEZ, M.L.; IGUAL, J.M.; GARCÍA-BALBOA, C. Diversity and activity of

phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. **Hydrometallurgy**, article in press, 2008.

DESAI, C.; JAIN, K.; MADAMWAR, D. Evaluation of In vitro Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill. **Chemosphere**, article in press, 2008.

DIETZ, A.C.; SCHONNOR, J.L. Advances in phytoremediation. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, suppl. 1, mar. 2001.

DUCIÉ, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 103-112, 2005.

DUFFUS, J.H. "Heavy metals"- a meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

DUPONNOIS, R.; KISA, M.; ASSIGBETSE, K.; PRIN, Y.; THIOULOUSE, J.; ISSARTEL, M.; MOULIN, P.; LEPAGE, M. Fluorescent pseudomonads occurring in *Macrotermes subhyalinus* mound structures decrease Cd toxicity and improve its accumulation in sorghum plants. **Science of the Total Environment**, v. 370, p.391-400, 2006.

DUZ, S.R.; SIMINSKI, A.; SANTOS, M.; PAULILO, M.T.S. Crescimento inicial de 3 espécies arbóreas da Floresta Atlântica em resposta à variação na quantidade de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 587-596, jul.-set. 2004.

EL-HELOW, E.R.; SABRY, S.A.; AMER, R.M. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. **Biometals**, v.13, p. 273-280, 2000.

ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3223-3230, jun. 2003.

ESPÉCIES FLORESTAIS BRASILEIRAS: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm>. Acesso em: 10 jun. 2008.

FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 982-988, mar. 1999.

FERRAZ, D.K.; ARTES, R.; MANTOVANI, W.; MAGALHÃES, L.M. Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 2, p. 305-317, jun. 1999.

FOSTER, R.C. Microenvironments of soil microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 3, p. 189-203, maio 1988.

FRANKENBERGER, W.T. JR.; ARSHAD, M. Bioremediation of selenium-contaminated sediments and water. **BioFactors**, v. 14, n. 1-4, p. 241-254, 2001.

FREDERICKSON, J.K.; KOSTANDARITHES, H.M.; LI, S.W.; PLYMALE, A.E.; DALY, M.J. Reduction of Fe(III), Cr(IV), U(VI), and Te(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2006-2011, 2000.

GADD, G.M.; GRIFFITHS, A.J. Microorganisms and heavy metal toxicity. **Microbial Ecology**, v. 4, n. 4, p. 303-317, dez. 1977.

GADD, G.M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271-279, jun. 2000.

GARAU, G.; CASTALDI, P.; SANTONA, L.; DEIANA, P.; MELIS, P. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. **Geoderma**, v. 142, p. 47-57, 2007.

GARBISU, C.; HERNANDEZ-ALLICA, J.; BARRUTIA, O.; ALKORTA, I.; BECERRIL, J.M. Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. **Reviews on Environmental Health**, v. 17, n. 3, p. 173-188, jul.-set. 2002.

GARCIA JR., O. Microorganismos e metais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1997. 440 páginas.

GEWIN, V. Discovery in the dirt. **Nature**, v. 439, p. 384-386, jan. 2006.

GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 3-16, 1997.

GLICK, B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 383-393, 2003.

GOOGLE EARTH. **Vista aérea da área de estudo**. 1 mapa, color. Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 17 dez. 2007.

GREMION, F.; CHATZINOTAS, A.; HARMS, H. Comparative 16S DNAr and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 896-907, 2003.

GRMAN, H.; VELIKONJA-BOLTA, S.; VODNIK, D.; KOS, B.; LETAN, D. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. **Plant and Soil**, v. 235, n. 1, p. 105-114, ago. 2001.

GRUIZ, K.; KRISTON, E. *In situ* bioremediation of hydrocarbons in soil. **Journal of Soil Contamination**, v. 4, n. 2, p. 163-174, 1995.

GUENTHER, W. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. **BioMetals**, v. 20, n. 3-4, p. 379-392, 2007.

HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, jan. 2002.

HASSAN, M.-T.; LELIE, D.; SPRINGAEL, D.; RÖMLING, U.; AHMED, N.; MERGEAY, M. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene**, v. 238, p. 417-425, 1999.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 7-15, 1997.

HAYES, R.B. The carcinogenicity of metals in humans. **Cancer Causes and Control**, v. 8, n. 3, p. 371-385, maio 1997.

HENGSTLER, J.G.; BOLM-AUDORFF, U.; FALDUM, A.; JANSSEN, K.; REIFENRATH, M.; GÖTTE, W.; JUNG, D.; MAYER-POPKEN, O.; FUCHS, J.; GEBHARD, S.; BIENFAIT, H.G.; SCHLINK, K.; DIETRICH, C.; FAUST, D.; EPE, B.; OESCH, F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 1, p. 63-73, 2003.

HERNÁNDEZ, L.E.; CÁRPENA-RUIZ, R.; GARATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, p. 1581-1598, 1996.

HETHERINGTON, A.M.; WOODWARD, F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, p. 901-908, ago. 2003.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, mar. 2002.

HIGGINS, I.J.; BURNS, R.G. **The Chemistry and Microbiology of Pollution**. London: Academic Press, 1975.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**, v. 98, p. 59-78, 1904.

HU, X.; BOYER, G.L. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4044-4048, nov. 1996.

IBEKWE, A.M.; GRIEVE, C.M. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 2, p. 239-248, 2004.

INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO. **Mapa das Regiões de Governo do Estado de São Paulo**. 1 mapa, color. Disponível em: <http://www.igc.sp.gov.br/copm_reggov.htm>. Acesso em: 17 dez. 2007.

IVSHINA, I.B.; PESHKUR, T.A.; KOROB, V.P. Efficient uptake of cesium ions by *Rhodococcus* cells. **Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 357-361, 2002.

JACQUES, R.J.S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2007.

JACQUES, R.J.S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; TEIXEIRA, A.S.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.P. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2637-2643, 2008.

JAFFRÉ, T.; BROOKS, R.R.; LEE, J.; REEVES, R.D. *Sebertia acuminata*, a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. **Science**, v. 193, p. 579-580, 1976.

JANSSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2391-2396, maio 2002.

JÉZÉQUEL, K.; PERRIN, J.; LEBEAU, T. Bioaugmentation with a *Bacillus* sp. to reduce the phytoavailable Cd of an agricultural soil: comparison of free and immobilized microbial inocula. **Chemosphere**, v. 59, p. 1323-1331, 2005.

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

JOSEPH, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7210-7215, dez. 2003.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N., ed. **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969.

JUSSILA, M.M.; JURGENS, G.; LINDSTRÖM, K.; SUOMINEN, L. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. **Environmental Pollution**, v. 139, p. 244-257, 2006.

JUWARKAR, A.A.; NAIR, A.; DUBEY, K.V.; SINGH, S.K.; DEVOTTA, S. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. **Chemosphere**, v. 68, p. 1996-2002, 2007.

KAMBHAMPATI, M.S.; BEGONIA, G.B.; BEGONIA, M.F.T.; BUFFORD, Y. Morphological and physiological responses of morning glory (*Ipomoea lacunosa* L.) grown in a lead-and chelate-amended soil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 2, p. 299-303, 2005.

KANDELER, F.; KAMPICHLER, C.; HORAK, O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 299-306, out. 1996.

KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; BRUCE, K.D.; STEMMER, M.; HOBBS, P.J.; BARDGETT, R.D.; AMELUNG, W. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 5, p. 390-400, dez. 2000.

KASHEFI, K.; LOVLEY, D.R. Reduction of Fe (III), Mn (IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1050-1056, 2000.

KHAN, A.G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal Trace Elements Medical Biology**, v. 18, n. 4, p. 355-64, 2005.

KIM, S.K.; PARK, C.B.; KOO, Y.-M.; YUN, H.S. Biosorption of cadmium and copper ions by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 403-406, 2003.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KITTS, C.L.; CUNNINGHAM, D.P.; UNKEFER, P.J. isolation of three hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteriaceae from nitramine explosive-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4608-4711, dez. 1994.

KNAEBEL, D.B.; FEDERLE, T.W.; McAVOY, D.C.; VESTAL, J.R. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4500-4508, dez. 1994.

KOLLER, C.; PATRICK, J.; ROSE, R.; OFFLER, C.; MACFARLANE, G. Arsenic and Heavy Metal Accumulation by *Pteris vittata* L. and *P. umbrosa* R. Br. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 128-133, fev. 2008.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 10, p. 1405-1417, 2000.

KUMAR, K.; DEVI, S.S.; KRISHNAMURTHI, K.; DUTTA, D.; CHAKRABARTI, T. Decolorisation and detoxification of Direct Blue-15 by a bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3168-3171, 2007.

KÜPPER, H.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, v. 119, p. 305-311, jan. 1999.

KUSKE, C.R.; TICKNOR, L.O.; MILLER, M.E.; DUNBAR, J.M.; DAVIS, J.A.; BARNS, S.M.; BELNAP, J. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and in the interspaces in an arid grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1854-1863, abr. 2002.

LASAT, M.M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant /soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, v. 2, p. 5-25, 2000.

_____. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 109-120, 2002.

LEE, I.-S.; KIM, O.K.; CHANG, Y.-Y.; BAE, B.; KIM, H.H.; BAEK, K.H. Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 406-411, 2002.

LEE, J.; BAE, H.; JEONG, J.; LE, J.-Y.; YANG, Y.-Y.; HWANG, I.; MARTINOIA, E.; LEE, Y. Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances

resistance to and decreases uptake of heavy metals. **Plant Physiology**, v. 133, p. 589-596, out. 2003.

LEE, M.D.; SWINDOLL, C.M. Bioventing for *in situ* remediation. **Hydrological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 273-282, ago. 1993.

LEFCORT, H.; MEGUIRE, R.A.; WILSON, L.H.; ETTINGER, W.F. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 447-456, out. 1998.

LEI, J.; SANSREGRET, J.L.; CYR, B. Biopiles and biofilters combined for soil cleanup. **Pollution Engineering**, v. 26, n. 6, p. 56-58, jun. 1994.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, v. 7, n. 3, p. 139-153, set. 1997.

LIU, C.L.; WANG, Y.P. Effect of nickel contamination in different soils on the growth of crops. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, v. 31, p. 172-182, 1993.

LIU, F.-Y.; HONG, M.-Z.; LIU, D.-M.; LI, Y.-W.; SHOUP, P.-S.; YAN, H.; SHI, G.-Q. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1257-1260, 2007.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. **Interpretação de Análise do Solo – Conceitos e Aplicações**. Boletim Técnico n. 2. 3ª edição. São Paulo: ANDA, 1992.

LOREAU, M. Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: a theoretical model. **Proceedings of the Royal Society Series B - Biological Sciences**, v. 268, p. 303-309, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª edição. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.

LOVLEY, D.R.; COATES, J.D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 285-289, jun. 1997.

LYNCH, J.M. **The Rhizosphere**. New York: John Wiley and Sons, 1990.

MACHADO, P.L.O.A. **Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, v. 69, p. 220-228, 2007.

MANCINI, O.; CUCCU, W.; MOLINARI, M. Landfarming and phytoremediation in an urban area: a case study. **In situ and on-site bioremediation, Proceedings of the International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, 8th**, Baltimore, MD, United States, June 6-9, 2005.

MARCO, P.; PACHECO, C.C.; FIGUEIREDO, A.R.; MORADAS-FERREIRA, P. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, p. 75-80, 2004.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 482-486, abr. 1998.

_____. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127-3133, jul. 2001.

MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 121-132, jan. 2000.

MARSCHNER, P.; YANG, C.-H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 1437-1445, 2001.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 19-208, abr. 2004.

MARTINEZ, R.J.; BEAZLEY, M.J.; TAILLEFERT, M.; ARAKAKI, A.K.; SKOLNICK, J.; SOBECKYL, P.A. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 3122-3133, 2007

MARTINS, I.; LIMA, I.V. **Ecotoxicologia do manganês e seus compostos**. Série Cadernos de Referência Ambiental. Volume 7. Salvador: CRA, 2001.

McGRATH, S.P.; ZHAO, F.J.; LOMBI, E. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. **Plant and Soil**, v. 232, n. 1-2, p. 207-214, maio 2001.

MEARGEAY, M.; NIES, D.H.; SCHLEGEL, H. D.; GERITS, J.; CHARLES, P.; VAN GIJSEGEM, F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-borne resistance to heavy metals. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 328-334, 1985.

MELO, E.E.C.; NASCIMENTO, C.W.A.; SANTOS, A.C.Q. Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 1051-1060, 2006.

MENDONÇA, C.G. (2000). **Algumas características da superfície foliar de diversas plantas daninhas monocotiledôneas**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”: Botucatu.

MENDOZA-COZATL, D.G.; BUTKO, E.; SPRINGER, F.; TORPEY, J.W.; KOMIVES, E.A.; KEHR, J.; SCHROEDER, J.I. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. **Plant Journal**, v. 54, n. 2, p. 249-259, 2008.

MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MIRLEAU, P.; PHILIPPOT, L.; CORBERAND, T.; LEMANCEAU, P. Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2627-2635, jun. 2001.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1675-1681, abr. 2001.

MOHN, W.; RADZIMINSKI, C.; FORTIN, M.-C.; REIMER, K. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 242-247, out. 2001.

MOLOBELA, I.P. (2005). **Development of rhizoremediation as a treatment technology in the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the environment.** Dissertação de Mestrado, University of Pretoria: South Africa.

MORETINI, A.; SPESSOTO, A.M.; MELO, I.S. Fungicida metalaxil na microbiota e na atividade enzimática do solo. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 73-84, jan./dez. 2004.

MOROZZI, G.; CENI, G.; SCARDAZZA, F.; PIZURRA, M. Cadmium uptake by growing of gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbios**, v. 48, 27-35, 1986.

NAVON-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R., CARMELI, S., RON, E.Z. and ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3240–3244, 1995.

NAWANI, N.N.; KAPADNIS, B.P. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 803-808, 2001.

NESTER, E.W.; ROBERTS, C.E.; NESTER, M.T. **Microbiology - a human perspective.** Iowa: Wm. C. Brown Publishers, 1995.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P.; Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548–572, set. 2000.

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

NIES, D.H.; SILVER, S. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance

to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 896-900, fev. 1989.

NORDGREN, A.; BÅÅTH, E.; SÖDESTRÖM, B. Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1829-1837, jun. 1983.

NOZAWA-INOUE, M.; SCOW, K.M.; ROLSTON, D.E. Reduction of perchlorate and nitrate by microbial communities in vadose soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3928-3934, jul. 2005.

OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 157-161, 2006.

OLIVEIRA, J.B. de; JACOMINE, P.K.T.; CAMARGO, M.N. **Classes Gerais de Solos do Brasil: guia auxiliar para seu reconhecimento**. 2^a edição. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 201.

OLSON, B.H.; THORNTON, I. The resistance patterns to metals of bacterial populations in contaminated land. **European Journal of Soil Science**, v. 33, n. 2, p. 271-277, 1982.

ØVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, v. 36, n. 3, p. 303-315, nov. 1998.

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; SIQUEIRA, J.O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrella fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) (Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 467-473, 2002.

PAQUIN, D.G.; CAMPBELL, S.; LI, Q.X. Phytoremediation in subtropical Hawaii – a review of over 100 plant species. **Remediation Journal**, v. 14, issue 2, p. 127-139, mar. 2004.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v. 160, p. 127-133, 2005.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 2nd edition. San Diego: Academic Press, 1996.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos**. Série Cadernos de Referência Ambiental. Volume 2. Salvador: CRA, 2001.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. Volume 2. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.

PINHEIRO, A.L.; MARAGON, L.C.; PAIVA, G.L.R.M. Características fenológicas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) em Viçosa, Minas Gerais. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 21, p. 21-26, 1990.

PINNOCK, M. Solid Waste: Its Implications for Health. In: THOMAS, E.M. **Solid Waste Management – Critical Issues for Developing Countries**. Jamaica: University of the West Indies Press, 1998.

PIOTROWSKA-SEGET, CYCON, M.; KOZDRÓJ, J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 237-246, 2005.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; PROCÓPIO, S.O.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 335-341, 2003.

PLETSCH, M.; BARROS, A.C.A.; DE ARAÚJO, B. S. Fitorremediação de Metais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2008. 647 páginas.

POLLARD, A.J.; POWELL, K.D.; HARPER, F.A.; SMITH, J.A.C. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 539-566, nov.-dez. 2002.

PRAHBU, V.; BIOLCHINI, P.F.; BOYER, G.L. Detection and identification of ferricrocin produced by ectendomycorrhizal fungi in the genus *Wilcoxina*. **BioMetals**, v. 9, n. 3, p. 229-234, jul. 1996.

PREMUZIC, E.T.; FRANCIS, A.J.; LIN, M.; SCHUBERT, J. Induced formation of chelating agents by *Pseudomonas aeruginosa* grown in presence of thorium and uranium. **Archiver of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 759-768, nov. 1985.

PULFORD, I; RIDDELL-BLACK, D.; STEWART, C. Heavy metal uptake by willow clones form sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. **International Journal of Phytoremediation**, v. 4, n. 1, p. 59-72, jan-mar. 2002.

RAJAPAKSHA, R.M.C.P.; TOBOR-KAPLON, M.A.; BÅÅTH, E. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2966-2973, maio 2004.

RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. **Chemosphere**, v. 71, p. 834-842, 2008.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 167-177, 2000.

REBER, H.H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils**, v. 13, n. 3, p. 181-186, 1992.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de Microbiologia**. Volume 2. São Paulo: Editora Manole, 1991.

ROMEIRO, S. (2005). **Potencial fitoextrator de *Ricinus communis* L., *Helianthus annuus* L. e *Canavalia ensiformes* L. para o chumbo, em solução nutritiva**. Dissertação de Mestrado – Instituto Agronômico: Campinas.

ROSEN, B.P. Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 273-277, ago. 1996.

ROONEY-VARGA, J.N.; ANDERSON, R.T.; FRAGA, J.L.; RINGELBERG, D.; LOVLEY, D.R. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3056-3063, jul. 1999.

RULKENS, W.H.; GROTENHUIS, J.T.C.; TICHÝ, R. Methods for Cleaning Contaminated Soils and Sediments. In: SALOMONS, W.; FÖRSTNER, U.; MADER, P. **Heavy Metals – Problems and Solutions**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995.

SAADOUN, I.M.K.; AL-GHZAWI, Z.D. Bioremediation of petroleum contamination. **Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems**, p. 173-212, 2005.

SABREEN, S.; SUGIYAMA, S. Cadmium phytoextraction capacity in eight C₃ herbage grass species. **Grassland Science**, v. 54, n. 1, p. 27-32, mar. 2008.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 654-666, nov. 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALAS, J.A.; SANABRIA, M.E.; PIRE, R. Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. **Bioagro**, v. 13, n. 3, p. 99-104, 2001.

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

SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, I.; RASKIN, I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, v. 13, p. 468-474, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDAA, R.-A.; ENGER, O.; TORSVIK, V. Abundance and diversity of *Archaea* in heavy-metal-contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3293-3297, ago. 1999.

SANO, D.; MYOJO, K.; OMURA, T. Cloning of a heavy-metal-binding protein derived from activated-sludge microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6377-6380, set. 2006.

SANTOS, G.C.G. (2005). **Comportamento de B, Zn, Cu, Mn e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico**. Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo: Piracicaba.

SASIKUMAR, C.S.; PAPINAZATH, T. Environmental management: - Bioremediation of polluted environment. In: BUNCH, M.J.; SURESH, V.M.; KUMARAN, T.V. **Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health**, Chennai, India, 15-17 December, 2003.

SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS MICRORGANISMOS. In: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABECK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4215-4224, 2001.

SHARMA, S.; SUNDARAM, C.S.; LUTHRA, P.M.; SINGH, Y.; SIRDESHMUKH, R.; GADE, W.N. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 374-382, 2006.

SHENG, X.; HE, L.; WANG, Q.; YE, H.; JIANG, C. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. **Journal of Hazardous Materials**, article in press, 2007.

SHENKER, M.; FAN, T.W.-M.; CROWLEY, D.E. Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 2091-2098, nov.-dez. 2001.

SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. **Environmental Reviews**, v. 6, n. 1, p. 65-79, 1998.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; VIEIRA, R.F. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista Ecotoxicología e Meio Ambiente**, v. 15, p. 93-104, jan./dez. 2005.

SILVA, C.S.; PEDROZO, M.F.M. **Ecotoxicologia do cromo e seus compostos**. Série Cadernos de Referência Ambiental. Volume 5. Salvador: CRA, 2001.

SILVA, P.; NAHAS, E. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 304-310, 2002.

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

SINGH, O.V.; LABANA, S.; PANDEY, G.; BUDHIRAJA, R.; JAIN, R.K. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5-6, 405-412, jun. 2003.

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D.K.; REDDY, M.M.K.; RAI, V. Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture. **Bioresource Technology**, article in press, 2007.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, out. 2001.

SMILES, D.E. Aspects of the physical environment of soil organisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 3, p. 204-215, maio 1988.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 249-261, 1997.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; BROEK, J.; MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2284-2291, maio 2001.

SOARES, C.R.F.S.; ACCIOLY, A.M.A.; MARQUES, T.C.L.L.S.M.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G. de; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, mar. / abr. 2005.

STAFFORD, W.H.L.; BAKER, G.C.; BROWN, S.A.; BURTON, S.G.; COWAN, D.A. Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1755-1768, 2005.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.-H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 31, n.2, p. 183-191, 1998.

STOLP, H. **Microbial Ecology: Organisms, Habitats, Activities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

STORMO, K. E.; CRAWFORD, R.L. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 727-730, 1992.

SUI, H.; LI, X.; JIANG, B.; HUANG, G. Simulation of remediation of multiple organic contaminantssystem by bioventing. **Huagong Xuebao (Chinese Edition)**, v. 58, n. 4, p. 1025-1031, 2007.

SUKO, T.; FUJIKAWA, T.; MIYAZAKI, T. Transport phenomena of volatile solute in soil during bioventing technology. **Journal of ASTM International**, v. 3, n. 7, 2006.

TAM, L.; DERRY, A.M.; KEVAN, P.G.; TREVORS, J.T. Functional diversity and community structure of microorganisms in rhizosphere and non-rhizosphere Canadian arctic soils. **Biodiversity and Conservation**, v. 10, n. 11, p. 1933-1947, nov. 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, R.T.; DUBA, A.G.; DURHAM, W.B.; HANNA, M.L.; JACKSON, K.J.; JOVANOVIĆ, M.C.; KNAPP, R.B.; KNEZOVICH, J.P.; SHAH, N.N.; SHONNARD, D.R.; WIJESINGHE, A.M. In situ bioremediation of trichloroethylene-contaminated water by a resting-cell methanotrophic microbial filter. **Conference of the International in situ bioremediation**, Ontario (Canada), p. 20-24, set. 1992.

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M.C.M.de; FAIRCHILD, T.M.; TAIOLI, F. **Decifrando a Terra**. São Paulo: Oficina de Textos, 2001.

THE VITAL EARTH NEWS. The rhizosphere. Disponível em: <<http://www.vitalearth.com/news/lesson002.htm>>. Acesso em: 17 dez. 2007.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 1994.

TINKER, P.B. The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. **Plant and Soil**, v. 76, n. 1-3, p. 77-91, fev. 1984.

TOMIOKA, N.; TANAKA, K.; UCHIYAMA, H.; YAGI, O.; KOKUFUTA, E. Recovery of ¹³⁷Cs by a bioaccumulation system using *Rhodococcus erythropolis* CS98. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 6, p. 604-608, 1998.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, mar. 1990.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6^a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003.

TSURUTA, T. Bioaccumulation of uranium and thorium from the solution containing both elements using various microorganisms. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 408, p. 1312-1315, 2006.

TURPEINEN, R.; KAIREVALO, T.; HÄGGBLÖM, M.M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 39-50, 2004.

TUZEN, M.; SAYGI, K.O.; USTA, C.; SOYLAK, M. *Pseudomonas aeruginosa* immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1563-1570, 2008.

VALSECCHI, G.; GIGLIOTTI, C.; FARINI, A. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v. 20, n. 4, p. 253-259, set. 1995.

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

VARGAS, J.P.; ESQUIVEL, G.G.; GARCÍA, F.E. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. **Avance y Perspectiva**, v. 21, p. 297-300, set.-out. 2002.

VASSILEV, A.; SCHWITZGUEBEL, J.-P.; THEWYS, T.; VAN DER LELIE, D.; VANGRONSVELD, J. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. **The Scientific World Journal**, v. 4, p. 9-34, 2004.

VECCHIO, A.; FINOLI, C.; DI SIMINE, D.; ANDREONI, V. Heavy metal biosorption by bacterial cells. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 361, n. 4, p. 338-342, jun. 1998.

VIDALI, M. Bioremediation. An Overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VILLACIEROS, M.; WHELAN, C.; MACKOVA, M.; MOLGAARD, J.; SÁNCHEZ-CONTRERAS, M.; LLORET, J.; CÁRCER, D.A.; ORUEZÁBAL, R.I.; BOLAÑOS, L.; MACEK, T.; KARLSON, U.; DOWLING, D.N.; MARTÍN, M.; RIVILLA, R. Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives,

using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2687-2694, maio 2005.

VISOOTTIVISETH, P.; FRANCESCONI, K.; SRIDOKCHAN, W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. **Environmental Pollution**, v. 118, n., 3, p. 453-461, 2002.

WANG, P.; MORI, T.; KOMORI, K.; SASATSU, K.; TODA, K.; OHTAKE, H. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1665-1669, 1989.

WANG, X.; XLAOBING, Y.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. **Environmental Science & Technology**, v. 24, p. 1086-1089, 1990.

WANG, Y.; LI, Q.; SHI, J.; A, LIN, Q.; CHEN, X.; WU, W.; CHEN, Y. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1167-1177, 2008.

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

WENDEROTH, D.F.; STACKEBRANDT, E.; REBER, H.H. Metal stress selects for bacterial ARDRA-types with a reduced catabolic versatility. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 667-670, 2001.

WHITE, C.; SHAMAN, A.K.; GADD, G.M. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 572-575, 1998.

WHITING, S.N.; REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M. Conserving biodiversity: mining metallophytes and land reclamation. **Mining Environmental Management**, v. 10, p. 11-16, mar. 2002

WHITING, S.N.; REEVES, R.D.; RICHARDS, D.; JOHNSON, M.S.; COOKE, J.A.; MALAISSE, F.; PATON, A.; SMITH, J.A.C.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L.; GINOCCHIO, R.; JAFFRÉ, T.; JOHNS, R.; McINTYRE, T.; PURVIS, O.W.; SALT, D.E.; SCHAT, H.; ZHAO, F.J.; BAKER, A.J.M. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. **Restoration Ecology**, v. 12, n. 1, p. 106-116, mar. 2004.

WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 5849-5854, dez. 2001.

WILKINSON, H. The plant superface (mainly leaf). In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**. London: Clarendon Press, 1979.

WU, C.H.; WOOD, T.K.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1129-1134, fev. 2006.

YANG, C.-H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 345-351, jan. 2000.

YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD, T.K. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 112-118, jan. 1998.

ZENK, M.H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. **Gene**, v. 179, p. 21-30, 1996.

ZENKER, M.J.; BRUBAKER, G.R.; SHAW, D.J.; KNIGHT, S.R. Passive bioventing pilot study at a former petroleum refinery. In Situ and On-Site Bioremediation, **Proceedings of the International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium**, 8th, Baltimore, MD, United States, June 6-9, 2005.

ZHENGWEI, Z.; FANG, W.; LEE, H.Y.; YANG, Z. Responses of *Azorhizobium caulinodans* to cadmium stress. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 455-461, 2005.

ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D.S.; WU, L.Y.; MARSH, T.L.; O'NEILL, R.V.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 326-334, jan. 2002.

ZILLI, J.É.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, set. / dez. 2003.

ANEXO A

Solução utilizada no preparo de suspensão microbiana

➤ **SOLUÇÃO UTILIZADA NO PREPARO DE SUSPENSÃO MICROBIANA (ARAÚJO et al., 2002)**

- Solução Tampão PBS

- 8,0 g de NaCl

- 0,2 g de KCl

- 1,44 g de Na₂HPO₄

- 0,24 g de KH₂PO₄

- H₂O destilada suficiente para 1000 mL

Obs.: Acertar o pH para 7,4.

ANEXO B

Meio de cultura M9-Tris Agar

➤ **MEIO DE CULTURA M9-TRIS AGAR (SAMBROOK; RUSSEL, 2001 MODIFICADO)**

- Meio mínimo M9-Tris Agar

- 15 g de Bacto Agar
- 780 mL de H₂O destilada

Obs.: Esterilizar em autoclave a 120°C, durante 20 minutos, 1 atm. Após esta etapa, adicionar 20 mL de glicose 20% estéril e 200 mL de solução de sais (5X) para M9-Tris Agar.

- Solução de sais (5X) para M9-Tris Agar

- 27,8 g de Tris
- 7,45 g de KCl
- 2,5 g de NaCl
- 5 g de NH₄Cl
- 0,23 g de Na₂HPO₄.12H₂O
- H₂O destilada suficiente para 1000 mL

Obs.: Esterilizar em autoclave a 120°C, durante 20 minutos, 1 atm.

APÊNDICE A

Tabela de microrganismos isolados e sua caracterização morfológica

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
CTM 1	D	punctiforme	ondulada	lisa	translúcido	bege	+	+	+	bacilos	-	
CTM 6	B	punctiforme	ondulada	lisa	opaco	bege	+	+	+	bacilos	-	
CTM 9	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	cocos	+	-
CTM 10	D	circular	inteira	rugosa	opaco	creme	+	+	+	bacilos	-	
CTM 11	H	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	+
CTR 2	E	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
CTR 3	O	punctiforme	ondulada	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	+
CTR 5	D	circular	inteira	rugosa	opaco	creme	+	+	+	bacilos	-	
CTR 7	G	punctiforme	ondulada	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
CTR 8	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ0 3	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ0 5	O	punctiforme	ondulada	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	+
RZ0 6	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ0 7	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ0 8	M	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	amarelo	+	+	-	cocos	+	+
RZ0 9	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ0 10	J	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 11	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 12	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ0 13	Q	circular	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ0 14	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ0 16	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 18	O	punctiforme	inteira	lisa	opaco	amarelo creme	+	+	-	bacilos	+	+
RZ0 20	O	punctiforme	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	+
RZ0 22	A	circular	/	rugosa	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ0 23	Q	punctiforme	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 26	C	circular	inteira	rugosa	opaco	creme	+	+	+	bacilos	-	
RZ0 28	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ0 29	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 32	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ0 36	Q	circular	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 37	I	circular	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ0 38	M	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	amarelo claro	+	+	-	cocos	+	+
RZ0 39	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 1	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 3	M	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	amarelo	+	+	-	cocos	+	+
RZ1 5	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 6	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 8	N	punctiforme	ondulada	rugosa	opaco	bege	+	+	-	bacilos		
RZ1 11	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ1 13	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 16	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 17	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ1 19	P	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	laranja	+	+	+	cocos	-	
RZ1 22	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ1 23	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ1 24	I	circular	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ1 26	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ1 29	Q	circular	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ1 33	M	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	amarelo claro	+	+	-	cocos	+	+

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ1 37	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ3 4	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 5	C	circular	ondulada	lisa	opaco	creme	+	+	+	bacilos	-	
RZ3 8	M	circular	inteira	lisa	translúcido	creme	+	+	-	cocos	+	+
RZ3 9	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 13	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-
RZ3 15	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 19	L	circular	inteira	lisa	opaco	laranja	+	+	+	bacilos	-	
RZ3 21	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 24	I	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	-

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ3 31	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	+	+	+	bacilos	-	
RZ3 34	K	circular	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	+	cocos	-	
RZ3 35	Q	punctiforme	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ3 36	A	circular	franjada	rugosa	opaco	creme	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 38	A	filamentosa	/	/	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 39	Q	circular	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ3 42	A	circular	franjada	rugosa	opaco	creme	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 43	F	punctiforme	ondulada	lisa	translúcido	creme	+	+	+	bacilos	-	
RZ3 45	Q	circular	inteira	lisa	opaco	amarelo	+	+	-	bacilos	+	-
RZ3 49	H	punctiforme	inteira	lisa	opaco	creme	+	+	-	bacilos	+	+

(continuação)

Amostra	Ribotipo	Forma	Borda	Superfície	Características ópticas	Pigmentação	Viscosidade	Catalase	Coloração de Gram		MacConkey	
									Gram	Morfologia	Crescimento	Fermentação lactose
RZ3 53	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ3 56	K	punctiforme	inteira	lisa	opaco	branco	+	+	+	cocos	-	
RZ3 58	M	punctiforme	inteira	lisa	translúcido	creme	+	+	-	cocos	+	+
RZ3 59	M	circular	inteira	lisa	translúcido	creme	+	+	-	cocos	+	+
RZ3 60	A	filamentosa	franjada	rugosa	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 61	A	filamentosa	franjada	rugosa	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	
RZ3 62	A	circular	franjada	rugosa	opaco	branco	-	+	+	bacilos	-	

APÊNDICE B

Tabela de microrganismos isolados e a resistência frente a Cd²⁺

Amostra	1,0 mM	0,5 mM	0,05 mM	0,005 mM	0,0005 mM
CTM 1	-	-	-	-	+
CTM 9	-	-	-	-	++
CTM 10	-	-	-	-	+
CTM 11	-	-	-	-	++
CTR 2	-	-	-	-	-
CTR 3	-	-	-	-	++
CTR 5	-	-	-	-	+
CTR 7	-	-	-	-	++
CTR 8	-	-	-	-	+
RZ0 2	-	-	-	-	-
RZ0 3	-	-	-	+	++
RZ0 5	-	-	-	-	++
RZ0 6	-	-	-	+	+
RZ0 7	-	-	-	-	+
RZ0 8	-	-	-	+	++
RZ0 9	-	-	-	+	+
RZ0 10	-	-	-	+	++
RZ0 11	-	-	-	-	-
RZ0 12	-	-	-	-	-
RZ0 13	-	-	-	-	++
RZ0 14	-	-	-	-	+
RZ0 16	-	-	-	-	-
RZ0 18	-	-	-	-	+
RZ0 20	+	+	+	+	+
RZ0 22	-	-	-	-	+
RZ0 23	-	-	-	+	+
RZ0 26	+	+	+	+	+
RZ0 29	-	-	-	-	++

(continuação)

Amostra	1,0 mM	0,5 mM	0,05 mM	0,005 mM	0,0005 mM
RZ0 32	-	-	-	-	+
RZ0 34	-	-	-	-	+
RZ0 36	-	-	-	+	++
RZ0 37	-	-	-	+	++
RZ0 38	-	-	-	-	++
RZ0 39	-	-	-	-	++
RZ1 1	-	-	-	-	-
RZ1 3	-	-	-	-	-
RZ1 5	-	-	-	-	-
RZ1 6	-	-	-	-	-
RZ1 8	-	-	-	-	+
RZ1 11	-	-	-	-	-
RZ1 12	-	-	-	-	-
RZ1 13	-	-	-	-	-
RZ1 16	-	-	-	-	-
RZ1 17	-	-	-	-	++
RZ1 19	-	-	-	-	-
RZ1 22	-	-	-	-	-
RZ1 23	+	+	+	+	+
RZ1 24	-	-	-	+	+
RZ1 26	-	-	-	-	-
RZ1 29	-	-	-	-	-
RZ1 33	-	-	-	-	-
RZ1 34	-	-	-	+	++
RZ1 37	-	-	-	+	++
RZ3 4	-	-	-	+	+
RZ3 5	-	-	-	-	-

(continuação)

Amostra	1,0 mM	0,5 mM	0,05 mM	0,005 mM	0,0005 mM
RZ3 8	-	-	-	-	+
RZ3 9	-	-	+	+	+
RZ3 13	-	-	-	-	+
RZ3 15	-	-	+	+	-
RZ3 19	-	-	-	-	-
RZ3 21	-	-	-	-	-
RZ3 24	-	+	+	++	++
RZ3 26	-	-	-	-	+
RZ3 31	-	-	-	+	++
RZ3 34	-	-	-	-	+
RZ3 35	-	-	-	-	++
RZ3 36	-	-	-	+	+
RZ3 38	-	-	-	-	-
RZ3 39	-	-	-	-	++
RZ3 42	-	-	-	+	+
RZ3 43	-	-	-	-	-
RZ3 45	-	-	-	-	++
RZ3 49	-	-	-	-	-
RZ3 52	-	-	-	-	+
RZ3 53	-	-	-	+	-
RZ3 56	-	-	-	-	+
RZ3 58	-	-	-	-	++
RZ3 59	-	-	+	+	++
RZ3 60	-	-	-	-	+
RZ3 61	-	-	-	-	+
RZ3 62	-	-	+	+	+

- ausência de crescimento

+crescimento limitado

++crescimento excelente

APÊNDICE C

Tabela de metais nos órgãos de *Cedrela fissilis* após 6 meses de plantio

Metais (mg.g ⁻¹)	Contaminação	Órgãos		
		Folha (μ±DP)	Caule (μ±DP)	Raiz (μ±DP)
Al	-	0,599±0,015	0,099±0,006	0,670±0,005
	+	0,831±0,024	0,102±0,003	0,474±0,004
Ca	-	25,880±0,285	6,171±0,033	0,799±0,018
	+	31,127±0,116	2,705±0,332	5,702±0,024
Cd	-	0,000662±0,000002	0,000473±0,000046	0,000474±0
	+	0,000738±0,000393	0,000365±0,000176	0,000408±0,000156
Cr	-	0,010±0,001	0,009±0,002	0,009±0
	+	0,019±0,013	0,010±0,003	0,009±0
Cu	-	0,012±0,0002	0,007±0,0004	0,009±0,0002
	+	0,012±0,0002	0,0007±0,0006	0,007±0,0004
Fe	-	0,742±0,002	0,111±0,002	0,331±0,021
	+	1,035±0,013	0,081±0,004	0,359±0,001
Mg	-	1,721±0,001	1,029±0,004	1,533±0,004
	+	6,903±0,108	1,248±0,005	2,130±0,017
Mn	-	0,031±0,001	0,019±0,001	0,013±0
	+	0,022±0,001	0,007±0,001	0,011±0,001
Ni	-	0,0084±0,017672	0,0117±0,017790	0,0019±0,000276
	+	0,0099±0,017929	0,0025±0,000373	0,0022±0,000401
Zn	-	0,036±0	0,024±0	0,015±0
	+	0,049±0	0,021±0	0,021±0

(-)- solo controle

(+)- solo contaminado

μ - média de três plantas por tratamento

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)