

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**JESSYCA ADRIANA GOMES FLORÊNCIO DA SILVA**

**LEGUMINOSAS INOCULADAS COM RIZOBIOS PARA  
REMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM CÁDMIO, CHUMBO  
E ZINCO POR DEPOSIÇÃO DE ESCÓRIAS**

**RECIFE  
2019**



Jessyca Adriana Gomes Florêncio da Silva  
Engenheira Agrônoma

**Leguminosas inoculadas com rizóbios para remediação de solo contaminado com metais pesados por deposição de escórias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora  
Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientador  
Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento

Recife  
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586L Silva, Jessyca Adriana Gomes Florêncio da  
Leguminosas inoculadas com rizóbios para remediação de solo  
contaminado com cádmio, chumbo e zinco por deposição de  
escórias / Jessyca Adriana Gomes Florêncio da Silva. –  
2019.  
66 f.: il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.  
Coorientador: Clístenes Williams Araújo do Nascimento.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,  
Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Microorganismos do solo 2. Leguminosa 3. Solo – Teor de  
metais pesados 4. Nitrogênio - Fixação 5. Rizóbio 6. Fitorremediação  
I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orient. II. Nascimento,  
Clístenes Williams Araújo do, coorient. III. Título

CDD 631.4

JESSYCA ADRIANA GOMES FLORENCIO DA SILVA

**Leguminosas inoculadas com rizobios para remediação de solo contaminado com cádmio,  
chumbo e zinco por deposição de escórias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2019

---

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Caroline Miranda Biondi  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

---

Prof. Dr. Vinícius Santos Gomes da Silva  
Instituto Federal de Pernambuco – (IFPE)



Ao meu pai Alexandre que se despediu da vida antes que eu  
pudesse concretizar meus sonhos pessoais,  
mas que sempre me ensinou  
a persistir e acreditar.  
Com imenso amor,  
**Ofereço.**

A minha mãe Shirley e minhas irmãs Sheysiane e Lyziane,  
que são o meu ponto de equilíbrio, minha base, por tudo que enfrentamos juntas.  
Por serem exemplo e orgulho para mim.  
Com todo meu amor e gratidão  
**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade amiga, por me ampararem nos momentos difíceis e me mostraram caminhos de luz nos dias escuros.

À minha mãe e amiga Shirley, pelo seu amor e dedicação. Por me ajudar, apoiar e entender. Por me aceitar, mesmo com todos os meus defeitos. Por permanecer ao meu lado nos momentos que tudo parecia desabar.

À minha irmã e amiga Sheysiane, por buscar me compreender e por continuar me amando mesmo com todas as minhas falhas. Por corrigir meus textos, por ser um exemplo de responsabilidade e dedicação em tudo que faz.

À minha irmã e amiga Lyziane, por torcer e vibrar pelas minhas conquistas. Pela sua sensibilidade de perceber problemas e tornar as coisas mais leves. Por nunca desistir e continuar lutando.

à minha prima e irmã Grazielle, por estar presente em todos os momentos.

Às minhas avós Ana e Lúcia, que são exemplos de mulheres e motivo de inspiração. Que cuidam mesmo precisando ser cuidadas, que dão amor mesmo nos momentos de dor.

A todos os membros da minha família materna e paterna, que me apoiam e torcem por mim, por serem exemplo de união e por se fazerem presentes.

À minha tia, coorientadora e anjo da guarda Carolina Etienne. Por todo suporte, carinho e conselhos. Por me fazer escolher o curso de agronomia e me dar meios para conseguir realizar meus sonhos profissionais. Por ser exemplo de competência e determinação.

À minha orientadora, Dra. Ana Dolores, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo e pela amizade.

Aos amigos de orientação Leandro Reis, Jéssica Oliveira, Edilândia Dantas, Juscélia Ferreira, Andressa Oliveira, Pablo Acácio, Aline Fernandes, Augusto Cesar e demais membros do grupo de pesquisa de Microbiologia do Solo, do qual eu fiz parte, pela amizade, pelos momentos de distração e por toda ajuda durante a pós-graduação.

Ao amigo Vinícius Gomes, pela ajuda e todos os ensinamentos.

Aos meus amigos Everton Rodrigues, Aline Souza e Gessika Araújo, pelas palavras de apoio, por todo companheirismo, amizade e por tornarem meus dias mais leves.

Às minhas amigas e companheiras de graduação Carla Mota, Flavia Medeiros e Ellyenai Simoni, pelas trocas de conhecimento, pelos sorrisos compartilhados e pelo incentivo e apoio mesmo a quilômetros de distância.

Ao professor Clístenes do Nascimento, pela coorientação e importante contribuição com o trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo, bem como do Laboratório de Química Ambiental, pelo suporte na realização das análises.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo suporte para realização desse trabalho e pela oportunidade durante a graduação e a pós-graduação em Ciência do Solo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

**Muito obrigada!**

## **Leguminosas inoculadas com rizóbios para remediação de solo contaminado com cádmio, chumbo e zinco por deposição de escórias**

### **RESUMO**

No Brasil um importante caso de contaminação ambiental envolvendo metais pesados ocorreu em Santo Amaro, Bahia. Uma empresa de fundição deixou um passivo ambiental de aproximadamente 500.000 toneladas de metais contendo, principalmente, cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Os solos próximos às escórias contêm metais pesados em concentrações acima dos limites permissíveis, mesmo após anos de interrupção da atividade metalúrgica. Nesse sentido, técnicas de remediações são necessárias para minimizar os efeitos dos metais nos solos contaminados e recuperar a funcionalidade dos ecossistemas no entorno da fábrica. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de duas espécies de leguminosas (mucuna e feijão-de-porco), inoculadas com rizóbios, para utilização na fitorremediação de solos contaminados. Além disso, foram avaliadas a ocorrência e as características morfológicas das populações de rizóbios naturalmente estabelecidas nos solos contaminados, utilizando as duas espécies de leguminosas cultivadas sem inoculação como plantas iscas. As leguminosas foram cultivadas em vasos contendo amostras de solo coletadas em pontos com distâncias crescentes da fonte de contaminação, para representar o efeito de diferentes concentrações dos metais no solo, e inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Os solos apresentaram valores de Pb e Cd acima do valor de investigação, sinalizando a necessidade de remediação. As plantas utilizadas apresentaram sintomas de toxicidade induzida pelo excesso de metais pesados, no entanto mostrando-se tolerante, avaliadas em função da produção de biomassa. As populações de rizóbios nativos dos solos contaminados são tolerantes e apresentam resistência a elevados teores de metais, como: Cd, Pb e Zn. No entanto os altos teores de metais pesados afetaram a nodulação e conseqüentemente os teores de nitrogênio nas plantas. As características fenotípicas destes isolados mostraram uma diversidade muito elevada. Estudos subsequentes mais aprofundados com ferramentas moleculares poderão determinar quais espécies são capazes de nodular em ambiente tão inóspito como solos contaminados de metais pesados.

**Palavras chave:** *Canavalia ensiformis* (L.). Fitotoxidez. Fixação biológica de nitrogênio. Nodulação natural. *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy.



## Use of inoculated legumes for remediation of soil contaminated with heavy metals by deposition of slag

### ABSTRACT

Heavy metals are elements that are potentially toxic to natural ecosystems and to human health, and may originate from natural or anthropogenic sources. In Brazil an important case of environmental contamination involving heavy metals occurred in Santo Amaro, Bahia. One foundry company left an environmental liability of approximately 500,000 tonnes of metals containing mainly cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn). Soils near the slag contain heavy metals in concentrations above permissible limits, even after years of interruption of metallurgical activity. In this sense, remediation techniques are needed to minimize the effects of metals on contaminated soils and restore ecosystem functionality around the factory. The present work has the objective of evaluating the potential of two legume species (mucuna and bean), inoculated with rhizobia, for use in phytoremediation of contaminated soils. In addition, the occurrence and morphological characteristics of the naturally established rhizobia populations in contaminated soils were evaluated using the two legume species cultivated without inoculation as bait plants. The legumes were cultivated in pots containing soil samples collected at points with increasing distances from the source of contamination, to represent the effect of different concentrations of the metals in the soil, and inoculated with nitrogen - fixing bacteria. Soils presented values of Pb and Cd above the value of investigation, signaling the need for remediation. The plants used presented symptoms of toxicity induced by the excess of heavy metals, however being tolerant, evaluated as a function of biomass production. The populations of native rhizobia of contaminated soils are tolerant and resistant to high concentrations of metals, such as: Cd, Pb and Zn. However, the high concentrations of heavy metals affected the nodulation and consequently the amount of N fixed. The phenotypic characteristics of these isolates showed a very high diversity, unusual, given the amount of isolates. Therefore, further studies with molecular tools to determine which species are able to nodulate in an environment as inhospitable as soils contaminated with heavy metals.

**Keywords:** *Canavalia ensiformis* (L.). Phytotoxicity. Biological nitrogen fixation. Natural nodulation. *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Área da antiga Cobrac .....	30
<b>Figura 2:</b> Mapa da localização de Santo Amaro, Bahia .....	30
<b>Figura 3:</b> Semente de feijão de porco (A) e mucuna preta (B) germinando.....	33
<b>Figura 4:</b> Presença de pragas nas plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn.....	38
<b>Figura 5:</b> Sintomas característicos de fitotoxidez nas plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn.....	38
<b>Figura 6:</b> Número de nódulos em plantas de feijão de porco e mucuna preta, cultivadas em vasos contendo solos contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC (Santo Amaro - BA). Barras acompanhadas pelas mesmas letras, maiúsculas para o feijão-de-porco e minúsculas para mucuna preta .....	40
<b>Figura 7:</b> Indivíduos de feijão de porco e mucuna preta 65 DAP. Produção de biomassa em solos com diferentes concentrações de Cd, Pb e Zn .....	42
<b>Figura 8:</b> Comparação do conteúdo de N nas plantas de feijão de porco inoculadas e a planta não inoculada com rizóbios .....	44
<b>Figura 9:</b> Conteúdo de N em plantas de mucuna preta nos diferentes níveis de contaminação.....	44
<b>Figura 10:</b> Acúmulo de Cd, Pb e Zn na parte aérea das plantas de mucuna preta e feijão de porco, em $\text{g kg}^{-1}$ , cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação .....	49
<b>Figura 11:</b> Cor das colônias bacterianas em meio YMA isoladas de feijão de porco e mucuna cultivadas em solos sob diferentes níveis de contaminação .....	50
<b>Figura 12:</b> Modificação do pH do meio YMA das bactérias isoladas de nódulos de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos sob diferentes níveis de contaminação.....	51
<b>Figura 14:</b> Dendograma de similaridade baseado em características culturais entre 37 isolados de rizóbios, obtidos de nódulos de plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos da contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC .....	55



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atributos químicos e granulométricos dos solos coletados em áreas a distâncias decrescentes do ponto destinado ao descarte de resíduos da antiga COBRAC (Santo Amaro - BA).....	31
<b>Tabela 2:</b> Características utilizadas na avaliação fenotípica dos isolados .....	35
<b>Tabela 3:</b> Biomassa seca da parte aérea, em gramas (g), de plantas cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação. Abreviaturas: N1- Solo Santo Amaro - baixa contaminação; N2 Solo Santo Amaro - média contaminação; N3 - Solo Santo Amaro - alta contaminação...41	41
<b>Tabela 4:</b> Biomassa seca das raízes, em g, de plantas cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação. Abreviaturas: N1- Solo Santo Amaro - baixa contaminação; N2 Solo Santo Amaro - média contaminação; N3 - Solo Santo Amaro - alta contaminação .....	43
<b>Tabela 5:</b> Teor de N em plantas de feijão de porco e mucuna preta, em g kg <sup>-1</sup> , cultivadas em vasos contendo solos contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC (Santo Amaro - BA) .....	45



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Hipóteses .....	21
1.2 Objetivo Geral: .....	21
1.3 Objetivos Específicos: .....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2.1 Metais pesados e contaminação ambiental .....	22
2.2 Danos biológicos causados por metais pesados .....	23
2.3 Casos de contaminação no Brasil .....	24
2.4 O caso de Santo Amaro .....	25
2.5 Remediação de áreas contaminadas .....	27
2.6 Associação de rizóbios e leguminosas na fitorremediação .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1 Amostragem e caracterização do solo .....	30
3.2 Execução do experimento.....	32
3.4 Determinações químicas nas plantas .....	33
3.5 Eficiência da fitoextração .....	34
3.6 Isolamento e caracterização de bactérias de nódulos .....	34
3.7 Análise dos dados .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 Níveis de contaminação do solo e sintomas apresentados pelas plantas .....	37
4.2 Concentração e acúmulo de Nitrogênio nas leguminosas .....	43
4.3 Eficiência da fitoextração .....	45
4.4 Caracterização morfofisiológica de rizóbios nativos de solos contaminados .....	49
5. CONCLUSÕES .....	57
6. BIBLIOGRAFIA .....	58



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo é crescente a problemática de casos de contaminação ambiental envolvendo metais pesados. Esses são definidos como elementos potencialmente tóxicos para os ecossistemas naturais e para a saúde humana. Esses elementos persistem por muito tempo no meio ambiente natural, devido a sua baixa ou nenhuma degradabilidade e acumulam-se ao longo da cadeia alimentar (KIM et al., 2015).

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos, no entanto as atividades antropogênicas contribuem na adição de metais pesados no meio ambiente natural (LI et al., 2014). De forma geral, as atividades industriais, incluindo mineração e fundição, podem ser consideradas como fontes significativas de contaminação por metais pesados (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

No Brasil, o caso mais grave de contaminação ambiental com metais pesados, sobretudo chumbo (Pb), ocorreu em Santo Amaro, Bahia. A cidade foi alvo da contaminação provocada pela Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac), indústria da fundição instalada na cidade com o objetivo de beneficiar o Pb para a produção de lingotes. Cobrac pertencia ao grupo multinacional Peñarroya Oxide S.A. e foi instalada em Santo Amaro em meados de 1960, sendo vendida em 1989 para empresa Plumbum Mineração e Metalurgia Ltda. Pertencente ao grupo brasileiro Trevo, que deu continuidade ao processo de produção das ligas de chumbo, a Plumbum funcionou até 1993. O passivo ambiental deixado por essas empresas é estimado em cerca de 500 Mg de escória contaminada, principalmente com cádmio (Cd), Pb e zinco (Zn) (SOUZA; LIMA, 2012).

Toda a escória gerada durante o processo produtivo praticado em Santo Amaro era disposta no meio ambiente natural sem a mínima gestão dos riscos. Havia, ainda, o material particulado que era expelido das chaminés e as águas residuais que eram descartadas sem cuidados prévios em direção ao curso do rio Subaé. Após encerrar as atividades, parte da escória contaminada foi doada para o calçamento da cidade e utilizada por moradores nos quintais de casas e pátios escolares. Em consequência, a cidade e grandes extensões das áreas em seu entorno foram contaminadas, apresentando diferentes níveis de contaminação metais de acordo com a distância que se encontram das fontes primárias de poluição.

Diante desse cenário, faz-se necessário minimizar os efeitos dos metais nos solos contaminados e recuperar a funcionalidade dos ecossistemas no entorno da fábrica, evitando uma expansão ainda maior da contaminação. A descontaminação do solo pode ser realizada no

local de origem da contaminação (*in situ*) ou com a retirada e transporte do solo para sua descontaminação (*ex situ*) através de processos biológicos, físicos e/ou químicos. Estas técnicas são frequentemente usadas em combinação umas com as outras para garantir uma remediação mais eficiente e econômica (KHALID et al., 2017).

A fitorremediação é uma tecnologia de remedição emergente. Ela utiliza a capacidade das plantas para concentrar contaminantes do solo na parte aérea (fitoextração); reduzir a mobilidade de metais pesados, reduzindo a biodisponibilidade destes (fitoestabilização); e / ou absorver e volatilizar compostos formados (fitovolatilização). Essa técnica ganha destaque em relação às outras (ALKORTA et al., 2004), por apresentar um ótimo custo-benefício, ser esteticamente agradável, ser uma tecnologia verde e não invasiva.

Para melhorar o potencial das plantas em remover os metais do solo, utilizam-se micro-organismos em associação com plantas fitorremediadoras. Essa associação tornar-se interessante uma vez que micro-organismos tolerantes a metais pesados podem alterar a biodisponibilidade de metais no solo, além de promover o crescimento das plantas, através de mecanismos diretos e indiretos, e aumentar a resistência das plantas ao estresse causado pelos metais metal (ETESAMI, 2018).

As plantas da família *Fabaceae* (leguminosas) são conhecidas por estabelecer simbiose com bactérias diazotróficas, vulgarmente chamadas rizóbios. Essas bactérias, além de fornecerem nitrogênio (N) para o sistema solo-planta, são rizobactérias promotoras de crescimento. As leguminosas são plantas pioneiras na colonização e restauração da qualidade e saúde de solos degradados e N-limitados, característica comum dos solos contaminados com metais, essa particularidade das leguminosas, adicionada à alta capacidade de produção de biomassa e sistema radicular profundo, são ideais para utilização na fitorremediação (GÓMEZ-SAGASTI; MARINO, 2015).

Diante do exposto, pode-se afirmar que plantas leguminosas inoculadas com rizóbios são candidatas promissoras para revegetação e fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados.

## 1.1 Hipóteses

- A capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com rizóbios eficientes confere vantagem ecológica às leguminosas para crescerem nos solos de Santo Amaro contaminados por Cd, Pb e Zn, favorecendo o uso dessas espécies em programas de fitorremediação.
- A inoculação com estirpes rizobianas incrementa a produção de biomassa de leguminosas em solos contaminados, assim como abrigam populações naturalmente estabelecidas de bactérias tolerantes e capazes de formar simbiose com diferentes espécies de leguminosas.

## 1.2 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial de leguminosas inoculadas com rizóbios para utilização na fitorremediação de solos contaminados por cádmio, chumbo e zinco.

## 1.3 Objetivos Específicos:

- Avaliar a tolerância e a capacidade de fitoextração do feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L.), e da mucuna preta, *Stizolobium aterrimum* (Piper & Tracy), à contaminação do solo por diferentes concentrações dos metais Cd, Pb e Zn;
- Determinar se a inoculação do feijão-de-porco e da mucuna preta com rizóbios recomendados confere maior tolerância à contaminação por Cd, Pb e Zn;
- Obter uma coleção de rizóbios tolerantes a altos teores de Cd, Pb e Zn utilizando feijão-de-porco e mucuna preta como plantas isca.
- Determinar as características fenotípicas de populações de rizóbios, naturalmente estabelecidas em solo contaminado por Cd, Pb e Zn capazes de nodular feijão-de-porco e mucuna preta.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metais pesados e contaminação ambiental

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos, sendo assim, todos os solos contêm metais pesados, em teores que variam de 0,0001 a 10% dependendo do íon e da sua presença no material de origem e dos processos pedogenéticos que formaram o solo ou de atividades humanas (BOTHE; SŁOMKA, 2017). Alguns metais pesados desempenham funções vitais no metabolismo vegetal e animal, sendo reconhecidos como essenciais às plantas e aos animais, como zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe). Outros, entretanto, como Pb, Cd, As e mercúrio (Hg), não possuem essencialidade reconhecida (BABULA et al., 2008). Com exceção do Fe, todos os metais pesados a uma concentração acima de 0,1% tornam-se tóxicos para as plantas. No entanto, os efeitos da toxicidade dos metais podem variar em cada espécie de planta, assim como em cada indivíduo (BOTHE; SŁOMKA, 2017)

Por serem persistentes no meio ambiente, os metais pesados estão mais sujeitos a serem acumulados no solo, sistemas aquáticos e sedimentos, causando efeitos deletérios no ecossistema (AL-SALEH; ABDULJABBAR, 2017; SENEVIRATNE et al., 2017), podendo permanecer no solo anos após a remoção de fontes pontuais e serem transferidos no sistema terrestre em diferentes níveis da cadeia alimentar (GALL; BOYD; RAJAKARUNA, 2015). Além disso, metais pesados são muito reativos e tóxicos, mesmo a baixas concentrações, e apresentam propriedades como bioacumulação, capacidade de uma substância se acumular nos tecidos ou órgãos dos organismos, e biomagnificação na cadeia trófica, ou seja, tendência de aumentar sua concentração nos organismos que ocupam, nos níveis trófico mais elevados. (MANN; VIJVER; PEIJNENBURG, 2011).

Teores elevados de metais no solo reduz atividades enzimáticas, biomassa microbiana e conseqüentemente a respiração do solo. (GILLER, WITTER; MCGRATH, 2009). Além disso, uma vez nos solos, os metais pesados podem ser adsorvidos pelas partículas coloidais ou disponibilizados na solução do solo, podendo, então, ser arrastados para outras áreas, por infiltração e/ou escoamento para águas subterrâneas e superficiais, respectivamente, ou ser absorvido pelas plantas, com potencial de acumulação, tanto nos vegetais, quanto em outros organismos vivos (MOTUZOVA et al., 2014, GALL; BOYD; RAJAKARUNA, 2015).

As atividades antropogênicas podem ser fontes de contaminação de metais no solo, (WUANA; OKIEIMEN, 2011), sendo a mineração e a metalurgia as atividades com maior

potencial poluidor (YANG; SHAO; JU, 2014; SILVA, 2015). Em geral, nos países em desenvolvimento, essas atividades são uma grande preocupação ambiental, devido aos danos causados à saúde dos habitantes locais através da contaminação de águas e alimentos, em função dos metais acumulados (LIU et al., 2015). Portanto, a poluição por metais pesados já se tornou um dos mais sérios problemas ambientais.

## **2.2 Danos biológicos causados por metais pesados**

Quando presentes em excesso nos organismos vivos, alguns metais pesados, sobretudo os não essenciais, podem afetar organelas celulares e induzir ao estresse oxidativo.

O Cd é um elemento muito móvel no solo, biologicamente não essencial e altamente tóxico para animais, micro-organismos e plantas. Devido a sua alta mobilidade, pode entrar facilmente na cadeia alimentar mediante absorção pelas plantas. Em altas concentrações, o Cd inibe o crescimento, desenvolvimento e a produtividade dos vegetais. No entanto, toxicidade desse elemento afeta, principalmente, os humanos, atingindo diversos sistemas do corpo humano. Apresenta efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (BENAVIDES; GALLEGU; TOMARO, 2005; GÓMEZ-SAGASTI; MARINO, 2015).

O Pb é um metal de grade uso industrial. Assim como os metais já mencionados, também causa sérios danos às plantas, ao meio ambiente e animais, incluindo o homem (LIMA et al., 2009). É classificado como o segundo metal mais tóxico na lista de substâncias perigosas, de acordo com a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2017). Pode levar à inibição de crescimento e das atividades enzimáticas, perturbação na absorção de nutrientes e induzir o estresse oxidativo nos vegetais. (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). A exposição ao Pb, mesmo em concentrações consideradas baixas, causa danos à saúde humana, podendo afetar o sistema nervoso em desenvolvimento, o sistema hematológico e o cardiovascular e afetar os rins, quando a exposição é excessiva e prolongada. As crianças são mais vulneráveis aos efeitos desse metal (MAGNA et al., 2014).

O Zn é um micronutriente vegetal, no entanto, quando em altas concentrações, seus efeitos podem ser deletérios, retardando o crescimento e podendo levar à morte das plantas. Em humanos, a exposição ao zinco pode causar irritações de pele e, quando ingerido em quantidades superiores ao recomendado (entre 8 e 11 mg/dia), pode trazer prejuízos à saúde, como por exemplo, causar enjoos, náuseas e, a longo prazo, anemia, danos ao pâncreas e diminuição dos níveis de colesterol HDL (ATSDR, 2005).

### 2.3 Casos de contaminação no Brasil

No Brasil, ocorreram casos de impactos sociais, econômicos e ambientais oriundos das atividades da mineração e fundição durante os processos de ocupação dos territórios (SOBRAL et al., 2012). Mais recentemente, os rompimentos das barragens de Mariana e Brumadinho, em Minas Gerais pertencentes a Companhia Vale do Rio Doce, nos quais grandes quantidades de lama contendo metais pesados de tipo e teores ainda não determinados, invadiram grandes áreas em seus entornos, contaminando solos, animais, pessoas e cursos de água. Outros casos de contaminação, dessa vez causado pela destinação inadequada de resíduos tóxicos ocorreram em: São Paulo no Vale do Ribeira, em Boquira e Santo Amaro, ambos localizados na Bahia.

O Vale do Ribeira, localizado entre os estados do Paraná e São Paulo, durante muitos anos ficou conhecido nacionalmente como a maior região produtora de Pb do Brasil. Esta área comportou várias minas de Pb, Zn e prata (Ag). No ano de 1945, em Adrianópolis – PR, a empresa Plumbum Mineração e Metalurgia Ltda., financiada pelo grupo Trevo, instalou uma usina de refino de minérios produzidos nas minas de Panelas, Canoas e Barrinha. A exploração dessas minas durou cerca de 50 anos. A Plumbum encerrou suas atividades em 1996, em consequência da exaustão do solo e esgotamento das jazidas, deixando aproximadamente 177.000 Mg de escória a céu aberto, sem nenhum cuidado prévio. Parte desses rejeitos foi utilizada pelos moradores no calçamento das ruas em áreas operárias vizinhas à antiga refinaria, em Adrianópolis. Durante o funcionamento da empresa foram lançados na atmosfera grande quantidade de material particulado rico em Pb. Além disso, resíduos e efluentes advindos das atividades da refinaria foram despejados diretamente no leito do rio Ribeira do Iguape, causando a contaminação do rio, dos solos adjacentes e da população local. Foi observada, ainda, a contaminação por As, através da arsenopirita, que ocorre geologicamente no minério de chumbo (CUNHA, 2003; KUMMER et al., 2011).

Em Boquira, Bahia, as atividades de exploração do minério de Pb e Zn se iniciaram em meados de 1950. Na época, Boquira era a principal mina em atividade no país, tanto pelas reservas, quanto pelo teor do minério extraído. A Peñarroya S.A era a empresa responsável pela exploração dos minérios extraídos em Boquira. Os minérios continham cerca de 9% de chumbo e 3 % de zinco. Estes eram transportados para Santo Amaro, localizada a 500 quilômetros de Boquira, onde eram beneficiados. A área foi explorada até 1992, quando encerrou suas atividades em decorrência da exaustão da mina e do alto custo de extração nas galerias abertas no subsolo (FERRAN, 2007; SOUZA; LIMA, 2012; ANDRADE et al., 2017).

Até recentemente, foi considerado que a maior contaminação por metais pesados que ocorreu no Brasil foi em Santo Amaro, Bahia. A cidade de Santo Amaro, apresenta um dos mais sérios problemas de contaminação humana por metais pesados do mundo, especialmente por Pb, ocasionado pela disposição final inadequada de escória metalúrgica contaminada, principalmente, por Cd, Pb e Zn (MACHADO et al., 2004; SILVA et al., 2017a).

## 2.4 O caso de Santo Amaro

Santo Amaro está localizada na região da Baía de Todos os Santos, às margens do Rio Subaé, e é um exemplo do alto potencial poluidor da indústria de fundição de metais. A cidade foi sede da Companhia Brasileira de Chumbo (COBRAC) de 1960 a 1993, fundada com capital francês e nacional e financiada pelo grupo Peñarroya, que tinha como objetivo o beneficiamento da galena (PbS - sulfeto de chumbo), para produção de lingotes de chumbo. Nessa época, foram produzidas cerca de 500.000 Mg de metais (ANDRADE; MORAES, 2013).

A produção de lingotes de chumbo era realizada pelos processos de sinterização e redução do sinter. O beneficiamento do chumbo baseava-se na obtenção de óxido de chumbo (PbO) por meio de ustulação oxidante da galena (PbS), seguida das operações de sinterização e redução do óxido de chumbo a Pb metálico, em forno de cuba. As principais emissões de poluentes metálicos e geração de resíduos ocorreram durante as etapas do processo metalúrgico, como também na etapa de transporte e estocagem (SOBRAL et al., 2012).

Todo o processo de refino do Pb gera grandes quantidades de resíduos que devem ser tratados seguindo rigorosas medidas de controle. No entanto, em Santo Amaro, essas medidas de controle eram negligenciadas. Havia pouco controle do manejo dos danos aos ecossistemas, bem como de medidas de proteção e segurança destinada aos funcionários e moradores locais (SILVA et al., 2003). Os dejetos provenientes do processo de refino continham Pb, Cu, As, Ag, antimônio (Sb) e bismuto (Bi). Já a escória formada durante a operação do alto forno continha minerais e muitas impurezas metálicas, incluindo Pb. Toda essa escória que deveria ser reciclada, volatilizada ou mesmo disposta no local onde foram produzidas (ou em outro local), de forma segura, era amontoada no meio ambiente natural, sujeita a intempéries, sem cuidados prévios. Durante os processos de sinterização, fusão e refino e durante as operações de carga e descarga do forno eram emitidas, pelas chaminés, grandes quantidades de fumaças e poeiras contendo metais e metaloides, além de gases como dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e óxido sulfúrico (SO<sub>3</sub>) (sinterização), que eram lançados continuamente na atmosfera (SOBRAL et al., 2012).

Foi produzido um total de poeira estimado em 104-152 kg por Mg de galena concentrada, com uma composição média de 60% de Pb, 10% de Zn, 6% de Cd e quantidades significativas de As. Além disso, as águas residuais geradas durante todo o processo pirometalúrgico foram lançadas diretamente no Rio Subaé. Acredita-se que todo esse material emitido tenha contribuído de forma significativa para o processo de contaminação ambiental principalmente no entorno da fábrica, visto que a indústria praticamente não dispunha de sistema de redução de gases e partículas nas suas chaminés (ANDRADE LIMA; BERNARDEZ 2011).

Ao longo de 33 anos de atividades, a COBRAC gerou um passivo ambiental de milhões de toneladas de rejeito contendo, principalmente, óxido de chumbo (PbO) e óxido de zinco (ZnO), oferecendo risco de intoxicação a população local, desde o período de funcionamento até os dias de hoje (SILVA et al., 2017b). A escória produzida durante esse período foi estimada em um volume de 180.000 m<sup>3</sup>. Parte da escória produzida foi doada, aproximadamente 55.000 m<sup>3</sup>, sendo parte destinada à pavimentação das ruas do centro, pela prefeitura, e outra parte foi utilizada pela população nos quintais das residências e pátios escolares (MACHADO et al., 2004; MAGNA, 2011).

Santo Amaro apresenta elevado índice pluviométrico, cerca de 1400 mm ano<sup>-1</sup>, o que pode ser responsável pelo arraste do solo contaminado a longas distâncias, através da erosão hídrica. As chuvas são mais concentradas em quatro meses do ano e na região há ocorrência de fortes ventos, potencializando os processos de erosão do solo, por erosão eólica, e subsequente dispersão dos contaminantes (PEIXOTO, 2013). Os solos da região apresentam teores de argila relativamente altos, o que aumenta a capacidade de adsorção dos metais pelos colóides (NIEMEYER et al., 2015). Os contaminantes que foram descartados de forma irregular no Rio Subaé, ou que receberam os dejetos advindos da lixiviação do solo contaminado, provavelmente foram dispersos ao longo da bacia hidrográfica (ANJOS, 2003; BOMFIM et al., 2015; BRAGA; LOPES, 2015) ou foram levados pela ação do vento a grandes distâncias da fonte de contaminação.

Valores de referência do Pb baseados nas concentrações naturais de metais pesados para a região da Baía de Todos os Santos, evitando-se a coleta de solos em áreas supostamente contaminadas, foram superiores às de outros solos do Brasil (SANTOS; NASCIMENTO; ACCIOLY, 2017). Por outro lado, foi observado no mesmo trabalho que as concentrações naturais médias de As, Cd e Zn, por exemplo, foram inferiores às encontradas na literatura nacional e internacional. No entanto, em trabalho posterior utilizando solos contaminados do município de Santo Amaro (SILVA et al., 2017b), teores elevados de As, Cd e Zn, além do Pb,

são uma preocupação em solos de Santo Amaro, razão pela qual merecem estudos mais aprofundados sobre a possibilidade de remediação desses elementos.

## **2.5 Remediação de áreas contaminadas**

Algumas técnicas de remediação de solos podem ser aplicadas no local da contaminação (*in situ*) ou com a retirada e transporte do solo para sua descontaminação em outro local (*ex situ*) (SONG et al., 2017). A escolha do método de descontaminação do solo é baseada na natureza do metal, nas concentrações deste no solo, em seu risco potencial, no tempo para remediação, nas características do solo e, sobretudo, em fatores econômicos. Khalid et al. (2017) compararam métodos físicos, químicos e biológicos de remediação de solos contaminados com metais pesados, concluindo que o uso de plantas associadas a microorganismos, embora demande um maior tempo de descontaminação do solo, é econômico e ambientalmente atrativo, em relação aos métodos físicos e químicos de descontaminação.

A fitorremediação, que consiste no uso de plantas para remediação de solos contaminados, vem sendo amplamente estudada devido às vantagens que apresenta em relação a outras técnicas (ARUNAKUMARA et al., 2014; FREITAS; NASCIMENTO; SILVA, 2014; FERNÁNDEZ et al., 2017; SARWAR et al., 2017). Consiste, basicamente, na fitoextração, fitoimobilização ou fitovolatilização do metal presente nos solos. A fitoextração refere-se a processos em que as plantas são usadas para transferir metais do solo para parte aérea das plantas; a fitoestabilização é o uso de plantas para reduzir a mobilidade de metais pesados mediante sua absorção e precipitação, reduzindo assim a biodisponibilidade destes; e, por fim, a fitovolatilização consiste na absorção e volatilização para a atmosfera dos compostos formados (ALI et al., 2013;).

É possível que plantas que cresçam naturalmente em áreas contaminadas apresentem vantagem competitiva em relação a outras plantas exóticas, além de tolerantes a altos teores de metais nos seus tecidos. Plantas nativas de diferentes espécies da família Fabaceae, de ocorrência natural em solos contaminados, já foram apontadas como potenciais fitorremediadoras (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011; BOECHAT et al., 2016).

## **2.6 Associação de rizóbios e leguminosas na fitorremediação**

Os micro-organismos presentes no solo exercem diversas atividades que influenciam fatores físicos, químicos e biológicos do solo. Estes atuam na ciclagem de nutrientes, degradação da matéria orgânica, degradação de xenobióticos, formação e sedimentação dos solos, entre outros. Além disso, os micro-organismos são capazes de transformar íons ativos de metais pesados nos solos, diminuindo sua biodisponibilidade. Incrementos na taxa de fitoextração podem ser obtidos por meio da inoculação de bactérias promotoras de crescimento (ULLAH et al., 2015), sugerindo que os micro-organismos podem ser grandes aliados das plantas fitoextratoras.

Nos solos, as bactérias são os organismos mais abundantes. Acredita-se que a abundância média desses micro-organismos está na ordem de  $10^5$  a  $10^7$  células bacterianas por grama de solo. De uma forma geral, as bactérias desempenham papéis importantes nos solos, como: degradação da matéria orgânica, nitrificação, fixação biológica de nitrogênio, estabilização de agregados, além de serem pioneiras na degradação de rochas e áreas degradadas e algumas tolerantes a metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na rizosfera do solo, área caracterizada como próxima às raízes e influenciada por uma gama de micro-organismos, ocorrem diversas trocas bioquímicas capazes de selecionar grupos microbianos de interesse para as plantas. Nesse cenário, plantas que se desenvolvem em áreas contaminadas podem selecionar, através de comunicação química (liberação de exsudados), comunidades bacterianas nativas tolerantes a metais pesados. Os exsudados liberados pelas raízes de plantas podem auxiliar na captação do metal presente no solo. As reações que ocorrem entre os metais e os compostos químicos naturais, liberados pelos vegetais, são complexas, no entanto estão associadas ao aumento da absorção de metais do solo e à sua translocação para a parte aérea das plantas. Os ácidos orgânicos são apontados como os exsudados mais importantes para a fitoextração, porque possuem, sobretudo, a capacidade de formar complexos com os íons metálicos, e reduzem o pH em torno das raízes, aumentando, assim, a mobilidade do metal (NASCIMENTO; XING, 2006).

Uma estratégia que pode se revelar interessante para a fitorremediação de solos contaminados é a utilização da simbiose entre leguminosas (*Fabaceae*) e bactérias diazotróficas, vulgarmente denominadas de rizóbios, capazes de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Por exemplo, *Astragalus bisulcatus* é uma espécie hiperacumuladora de Se (FREEMAN et al., 2006) e sua capacidade de nodular pode representar uma vantagem ecológica para seu desenvolvimento em solos contaminados. A capacidade de formação de nódulos e FBN está presente em grande parte das leguminosas e o cultivo de espécies nodulantes fixadoras desempenha papel relevante na manutenção de estoques de

nitrogênio nos solos, melhorando conseqüentemente sua fertilidade (FREITAS et al., 2015). Além disso, em solos contaminados, essa relação simbiótica pode restaurar as funções e promover a cobertura eficiente do solo, evitando que ocorra erosão e conseqüente lixiviação dos contaminantes, e enriquecer a microbiota do mesmo (RANGEL et al., 2017).

A associação simbiótica entre leguminosas e rizóbios pode aumentar a tolerância de plantas fitorremediadoras, aliviando os estresses causados pelos metais pesados, como foi observado por Chen et al. (2018). Eles mostraram em que os efeitos da toxicidade causado pelo Cu foi amenizado pela simbiose em *Medicago sativa*, diminuindo o estresse oxidativo e a inibição de crescimento causado por esse metal nas plantas, revelando o importante papel dessa associação na biorremediação de Cu no solo.

Os rizóbios podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência a metais pesados, podendo bioacumular esses elementos em suas células. Os íons de metais podem ser adsorvidos nas camadas polissacarídicas das bactérias através de grupos funcionais, tais como grupos carboxila, amino, fosfato e sulfato (YIN et al., 2018).

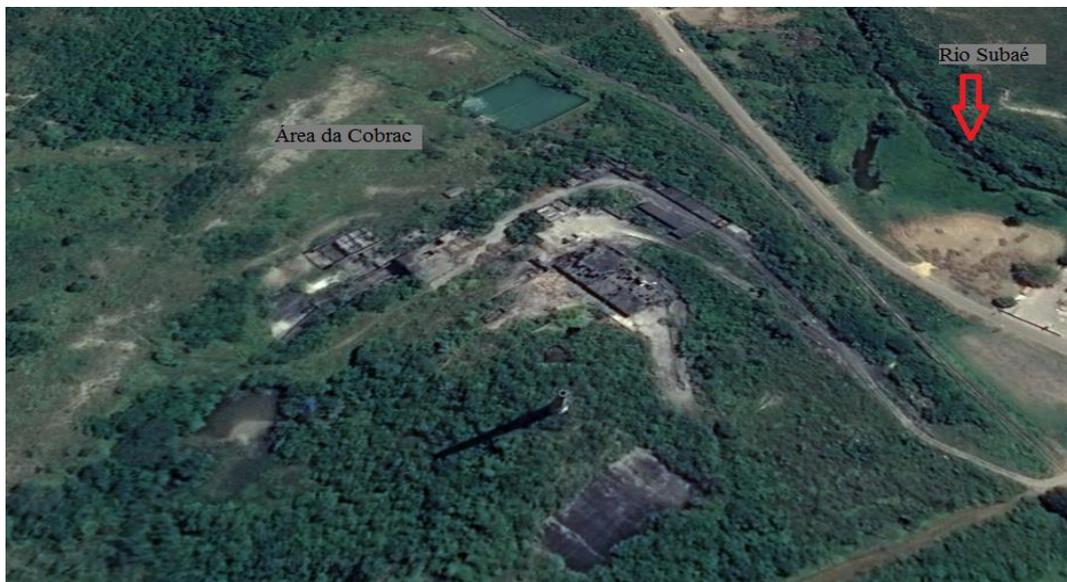
A seleção de rizóbios resistentes a metais pesados pode incrementar a taxa de metal retirado ou imobilizado no solo, dada a capacidade de alguns micro-organismos de alterar a solubilidade, mobilidade e biodisponibilidade de metais no solo, e beneficiar o estabelecimento e crescimento da planta (NONNOI et al., 2012). Sendo assim, o isolamento de rizóbios resistentes a metais pesados, para produção de inoculantes é uma opção viável e barata para a regeneração e enriquecimento de solos moderadamente contaminados (ZRIB et al., 2012).

Esforços para encontrar espécies de leguminosas e estirpes nativas tolerantes a solos com elevados teores de metais tóxicos são extremamente necessários. A utilização de espécies vegetais nativas em programas de fitorremediação, visto que essas plantas podem ser mais adaptadas às condições edafoclimáticas e estresses em relação a espécies exóticas, pode ser uma estratégia interessante (LEGUIZAMO, GÓMEZ; SARMIENTO, 2017). O território brasileiro é rico em leguminosas, entretanto, no Brasil estas espécies ainda são pouco exploradas e poucos estudos existem no que diz respeito a seus potenciais como fitorremediadoras. Por outro lado, estudar a diversidade de rizóbios nativos de solos contaminados, também pode ser de grande interesse para fins de remediação ambiental, visto que essas bactérias são adaptadas a esse tipo de estresse. Já foi observado que, mesmo em solos contaminados, as leguminosas inoculadas com rizóbios tolerantes conseguem crescer e nodular, sendo indicadas em programas de fitorremediação (ZRIB et al., 2012; DARY et al., 2010; PAJUELO et al., 2011; SAADANI et al., 2016).

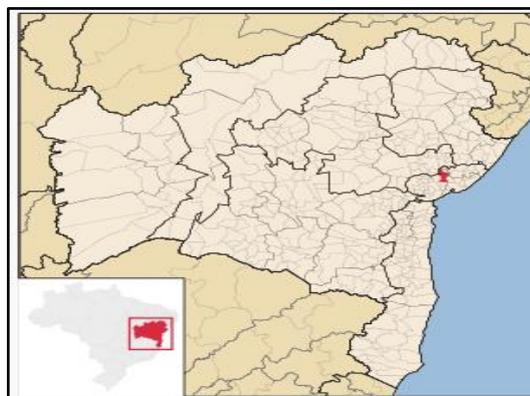
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem e caracterização do solo

Amostras de solos contaminados foram coletadas no município de Santo Amaro, Bahia (12° 32' 48" S 38° 42' 43" W), dentro da antiga propriedade da COBRAC (Figura 1), em uma área destinada ao descarte de resíduos. O solo foi coletado na camada superficial (0-20 cm) em três pontos distintos, com diferentes distâncias da fonte de contaminação, sendo esperado, com isso, diferentes níveis de contaminação com metais pesados, principalmente Cd, Pb e Zn.



**Figura 1:** Área da antiga Cobrac



**Figura 2:** Mapa da localização de Santo Amaro, Bahia

Para determinação dos atributos químicos e da granulometria das amostras de solo (Tabela 1), sub-amostras foram tomadas das amostras coletadas em cada ponto amostral, secadas ao ar, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. Foram determinados o pH em água (1:2,5); K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e P foram extraídos com Mehlich-1, os dois primeiros foram dosados por fotometria de chama e o P por colorimetria do complexo fosfomolibdico (redução do molibdato com o ácido ascórbico) (EMBRAPA 2009). A análise granulométrica foi determinada pelo método do densímetro de acordo com Embrapa (2009).

**Tabela 1:** Atributos químicos e granulométricos dos solos coletados em áreas a distâncias decrescentes do ponto destinado ao descarte de resíduos da antiga COBRAC (Santo Amaro - BA)

Atributo	Distância do foco de contaminação			
	Área de maior distância do foco da contaminação	Área de média distância do foco da contaminação	Área de menor distância do foco da contaminação	
pH (1:2,5) - Água	7,55	7,46	5,5	
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	98a	90,5	58	
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	36	30,5	41,5	
P (mg Kg <sup>-1</sup> )	48,04	16,86	21,63	
Areia (%)	41,2	15,17	11,30	
Silte (%)	23,1	35,14	40,12	
Argila (%)	35,7	49,68	48,84	
Classe textural	Franco argiloso	Argiloso	Argiloso	
	mg Kg <sup>-1</sup>			
	VI	N1	N2	N3
	A; I			
Cd	3; 20	1,45	8,00	89,30
Cr	150; 400	35,90	44,60	54,10
Cu	200; 600	33,08	46,83	171,33
Fe	-	32386,85	37301,85	46541,85
Mn	-	352,68	540,23	711,23
Ni	70; 130	18,38	25,48	33,83
Pb (mg Kg <sup>-1</sup> )	180; 900	195,43	1004,58	5529,08
Zn (mg Kg <sup>-1</sup> )	450; 2000	218,53	490,68	1043,63

\* N1 = menor nível de contaminação do solo, correspondendo a amostras coletadas à maior distância do foco da contaminação; N2 = nível intermediário de contaminação do solo, correspondendo a amostras coletadas à distância intermediária do foco da contaminação; e N3 = maior nível de contaminação do solo, correspondendo a amostras coletadas à menor distância do foco da contaminação. VI= Valor de investigação (A – agrícola), (I – Industrial).

Para determinação dos teores de Cd, Pb e Zn no solo, as amostras foram pulverizadas em almofariz de ágata e passadas em peneira de abertura de 0,3 mm (ABNT n° 50), com malha de aço inoxidável. A digestão das amostras de solo foi baseada no método 3051A (USEPA, 1998), que consiste em adicionar 9 mL de HNO<sub>3</sub> e 3 mL de HCl em 0,5 g de amostras de solos pulverizadas, em tubos de teflon. As amostras foram levadas ao forno de micro-ondas (Mars Xpress), por 18 minutos até atingir a temperatura de 175° C, mantendo essa temperatura por 4 minutos e 30 segundos. Após o resfriamento os extratos foram vertidos para balões volumétricos de 50 ml, sendo o volume completado com água ultrapura e os filtrados em papel de filtragem lenta (Macherey Nagel®). Os teores de Cd, Pb e Zn foram determinados por espectrometria de emissão óptica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer), enquanto que os de alumínio (Al), Fe, manganês (Mn), cobre (Cu) e níquel (Ni) foram determinados por espectrofotômetro de absorção atômica (Analyst 800 Perkin Elmer).

### 3.2 Execução do experimento

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada no Departamento de Agronomia. No experimento foram utilizadas duas plantas herbáceas, da família Fabaceae, o feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L.) e a mucuna preta, *Stizolobium aterrimum* (Piper & Tracy). Essas plantas foram escolhidas por serem bem adaptadas ao clima tropical, apresentando tolerância a altas temperaturas, rápido crescimento, grande produção de fitomassa em um curto espaço de tempo e, sobretudo, capacidade para estabelecer simbiose eficiente com rizóbios.

Os tratamentos do experimento consistiram nas duas espécies de leguminosas, três solos coletados a distâncias crescentes do foco de contaminação, representando diferentes níveis de contaminação do solo (1, 2 e 3) e presença ou ausência de inoculação com rizóbios previamente selecionados. Foram utilizadas cinco espécies de bactérias diazotróficas (estirpes de referência), obtidas da coleção de bactérias do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD), da Embrapa Agrobiologia: BR2811 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR3501 (*Ensifer* sp.), BR7606 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), BR10026 (*Rhizobium etli*), BR 10247 (*Bradyrhizobium neotropicae*). Este experimento totalizou 108 parcelas.

Para preparo dos inoculantes, os rizóbios foram cultivados em meio extrato de levedura-manitol (YM) (Vincent, 1970), em condições monoxênicas, durante o período de crescimento adequado para cada bactéria.

As sementes das espécies herbáceas foram adquiridas em casas comerciais. Antecedendo a semeadura, as sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool 95,8 % por 3 segundos e hipoclorito de sódio 1 % por 5 minutos, com lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada, para retirar o hipoclorito de sódio. Em cada vaso foram semeadas três sementes, sendo realizado um desbaste após 10 dias de emergência, sendo deixada 1 planta por vaso. Os vasos tinham capacidade para 1 dm<sup>3</sup> de solo.

A inoculação de bactérias diazotróficas ocorreu na época do plantio na aérea próxima às sementes e foi repetida dez dias após o plantio (DAP). A irrigação foi realizada para manter o solo próximo à capacidade de vaso, o que foi avaliado visualmente.

As plantas foram colhidas aos 65 DAP. Na ocasião da coleta, as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas em água corrente e água destilada, acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h, sendo posteriormente pesadas para obtenção da biomassa produzida. Os nódulos foram destacados, contados, os nódulos dos tratamentos que não receberam inoculação foram armazenados em sílica gel para posterior isolamento das bactérias. Após pesagem, as amostras de tecido vegetal foram moídas em moinho tipo Willey, para determinações químicas. Foram determinadas as biomassas das plantas (parte aérea, nódulos e sistema radicular), e os teores totais de N, Cd, Pb e Zn na parte aérea da planta.



**Figura 3:** Semente de feijão de porco (A) e mucuna preta (B) germinando

### 3.4 Determinações químicas nas plantas

O nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método da destilação – titulação de Kjeldahl (EMBRAPA, 2009), utilizando o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para digestão.

Para determinar os teores ambientalmente disponíveis de Cd, Pb e Zn nas plantas usou-se, na etapa da extração, o método 3051A (USEPA, 1998), que consiste em adicionar 8 mL de

HNO<sub>3</sub> em 0,5 g de amostras de plantas, em tubos de teflon. As amostras foram digeridas no forno de micro-ondas (Mars Xpress), por 20 minutos até atingir a temperatura de 175° C, mantendo essa temperatura por 10 minutos. As amostras digeridas foram vertidas para balões volumétricos de 25 ml, sendo o volume completado com água ultrapura e os extratos filtrados em papel de filtragem lenta (Macherey Nagel®).

Os teores de Cd, Pb e Zn foram determinados por espectrometria de emissão óptica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer).

### 3.5 Eficiência da fitoextração

O fator de bioconcentração, que indica a eficiência de uma espécie em acumular o metal em seus tecidos em relação ao meio (solo), foi calculado pela fórmula:

$$\text{Fator bioconcentração (FB)} = \frac{[\text{metal planta}]}{[\text{metal solo}]}$$

Em que [metal planta] é a concentração do metal na planta colhida e [metal solo] é a concentração do mesmo metal no solo.

### 3.6 Isolamento e caracterização de bactérias de nódulos

Os nódulos obtidos das raízes das plantas dos tratamentos sem inoculação foram submetidas ao isolamento de bactérias endofíticas, para avaliação das populações de rizóbio nativos. Os nódulos reidratados com água destilada autoclavada por 40 minutos, desinfestados superficialmente com álcool a 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos e lavados 10 vezes em água destilada e esterilizada. Com uma pinça, os nódulos desinfestados foram pressionados em uma placa de Petri contendo meio YMA (VICENT, 1970) e Congo red (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). As placas foram incubadas em 28 °C até o aparecimento das colônias. Para purificar os isolados, as culturas foram inoculadas sucessivas vezes em meio YMA contendo azul de bromotimol como indicador de pH para obter culturas puras. Os isolados foram caracterizados em meio YMA observando-se os caracteres: 1) tempo necessário para o aparecimento de uma colônia; 2) pH do meio após o crescimento celular (determinado pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol, os isolados acidificantes tornam o meio amarelo e os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os

neutros não modificam a coloração do meio de cultura.); 3) Tamanho da colônia (puntiforme ou não puntiforme); 4) Forma (circular ou irregular), 5) Borda da colônia (lisa ou irregular), 6) Aparência da colônia (homogênea ou heterogênea) 7) transparência da colônia; 8) cor da colônia (branca, amarela, creme, algumas podem apresentar coloração rósea) e 9) elevação da colônia. Também foram determinadas características do muco produzido pelas células: 10) quantidade (pouca ou média e muita), 11) faixa de alça (observada pela faixa formada pela alça de platina no muco, 12) elasticidade (observada a partir da formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura com o auxílio da alça de platina e Aspecto da colônia (brilhante, úmida ou seca.).

Após a caracterização morfofisiológica, as colônias das bactérias foram estocadas em tubos tipo Eppendorf (com capacidade para 1,5 mL) contendo 1,0 mL de meio YM com glicerina (50%), para estudos subsequentes. Após a caracterização morfofisiológicas os dados foram codificados, visto que o programa só aceita informações binárias, (Tabela 2) visando a utilização do programa NtsysPC para o agrupamento e construção do dendrograma de similaridade dos isolados de acordo com (ROHLF, 1994).

**Tabela 2:** Características utilizadas na avaliação fenotípica dos isolados

Característica	Padronização		Código Correspondente	
Tempo (em dias)	1	Mais de 1	0	1
Forma	Circular	Não circular	0	1
Borda	Regular	Irregular	0	1
Aparência da Colônia	Homogênea	Heterogênea	0	1
Tamanho	Puntiforme, 1 e 2 mm	Não puntiforme	0	1
pH	Ácido	Neutro ou alcalino	0	1
Elevação	Sem elevação	Com elevação	0	1
Transparência	Opaco	Transparente	0	1
Cor	Branca	Amarela	0	1
Muco	Sim	Não	0	1
Quantidade de muco	Pouca	Média e muita	0	1
Faixa de alça	Quando retorna	Quando permanece limpa	0	1
Elasticidade	Sem elasticidade	Com elasticidade	0	1
Aspecto	Brilhante	Sem brilho	0	1

### 3.7 Análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições e arranjo fatorial. Para comparar a produtividade de biomassa aérea e de raiz, e a nodulação, os dados foram submetidos a análise de variância, considerando experimentos independentes para cada espécie. As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e os dados de número de nódulos transformados em  $(x + 1)^{1/2}$ . As análises foram realizadas utilizando o software Sisvar (Versão 5.2).

Os dendrogramas e os índices de diversidade de Shannon (H), Margalef (f) e equitabilidade (J) foram obtidos através do programa PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Níveis de contaminação do solo e sintomas apresentados pelas plantas

Os teores de Cd, Pb e Zn nos solos estudados, principalmente no solo com maior nível de contaminação (N3), foram muito acima dos valores de prevenção (VP) estabelecidos pelo Conama (2009). O Cd e o Pb apresentaram valores cerca de 70 e 76 vezes, respectivamente, acima do VP. Nos solos N2 e N3 os valores encontrados estão acima dos valores de investigação (VI) para Pb e para o Cd no N3, segundo o Conama (2009), ficando evidenciada a necessidade de correção desses solos.

O pH dos solos (Tabela 1) contaminados com diferentes concentrações de metais pesados foi similar para os solos com baixos e médios níveis de contaminação (N1 e N2, respectivamente) e quase neutro (7,55 e 7,46, respectivamente), e ácido no solo mais contaminado (N3). O pH dos solos é um dos fatores químicos que mais influenciam na disponibilidade de metais. Em pH mais ácido alguns elementos se tornam mais móveis e mais disponíveis para as plantas, enquanto em pH mais neutro ou alcalino, os metais pesados podem tornar-se mais indisponíveis (MELO et al., 2008). O teor de fósforo disponível foi maior no N1 (48,04 mg kg<sup>-1</sup>) e decresceu em N2 e N3 (16,86 e 21,63 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). O que distinguiu os solos pouco e altamente contaminado foram, principalmente, as concentrações de Cd (1,45; 8 e 89,3 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (195, 43; 1000,58 e 5529,08 mg kg<sup>-1</sup>). e Zn (218,53; 490,68 e 1043,63 mg kg<sup>-1</sup>). O teor de Cd no solo foi 446,05 vezes maior que a concentração média natural para solos da Bahia de Todos os Santos, de acordo com Santos, Nascimento e Accioly (2017). Além da presença dos metais pesados já mencionados, foi verificado teores elevados de Cu, Cr, Fe, Mn, Ni.

No início do experimento, após a semeadura, foi verificado que algumas plantas, apresentaram dificuldades para germinar, bem como apresentaram sintomas de fitotoxicidade como necrose e clorose foliar (Figuras 4 e 5). Embora alguns metais pesados sejam essenciais para o crescimento de plantas. O excesso desses elementos pode desencadear estresses em respostas fisiológicas incluindo a inibição da germinação e do crescimento das plantas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a absorção de nutrientes (BERNI et al., 2018). Estes resultados estão em concordância com relato de Majeed, Muhammad e Siyar (2017), que avaliaram as respostas do estresse induzido por metais em plantas de ervilhas. Segundo esses autores, o excesso de Cd induz anormalidades na germinação de sementes,

absorção de nutrientes, fotossíntese e regulação do crescimento nas plantas, enquanto o Pb influencia processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, interagindo com enzimas, alterando a captação de água, a fotossíntese e as funções da membrana celular. Assim pode-se argumentar que a não germinação de sementes e os sintomas de toxidez das plantas crescidas sob estresse de vários metais no presente estudo, podem ter sido causados pela atuação em conjunto desses metais após a acumulação em partes vivas da planta, provocando alterações fisiológicas e bioquímicas nos vegetais.



**Figura 4:** Presença de pragas nas plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn



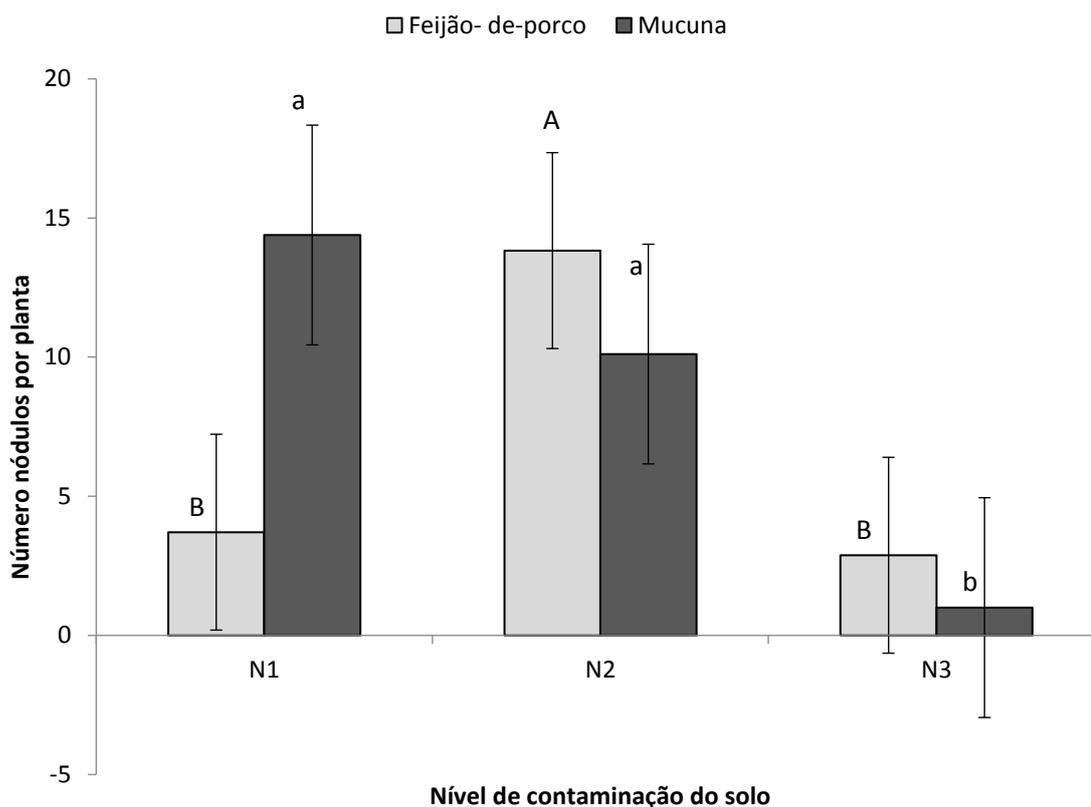
**Figura 5:** Sintomas característicos de fitotoxidez nas plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn

Apesar dos sintomas de toxicidade apresentados, as plantas de mucuna-preta e feijão-de-porco cresceram em todos os vasos, mostrando-se tolerantes às altas concentrações de metais pesados. Esses resultados estão em concordância com o que foi relatado pela Romeiro et al. (2007), que testaram a eficiência da *Canavalia ensiformes* L. (feijão de porco), em diferentes concentrações de Pb em solução nutritiva, em sistema hidropônico. A *Mucuna sp.* também já foi testada quanto a sua capacidade de fitoremediação, mostrando-se tolerante, segundo relatos do Boechat et al. (2017), Nwaichi, Wegwu e Onyeike (2009) e Procópio (2005).

#### **4.2 Nodulação e Produção de biomassa das leguminosas**

A inoculação com as estirpes recomendadas não teve efeito sobre a nodulação das leguminosas assim como a nodulação foi baixa nas plantas não inoculadas. Todas as plantas cultivadas nos níveis 1 e 2 nodularam, mesmo nos tratamentos não inoculados. No nível 3, a nodulação além de baixa, foi errática, ocorrendo ausência de nódulos em algumas plantas não inoculadas e mesmo em algumas plantas inoculadas. Por outro lado, a nodulação natural (em plantas não inoculadas) nos solos contaminados, apesar de reduzida, indica a presença de rizóbios capazes de formar simbiose com as leguminosas. Essas populações de rizóbios nativos são tolerantes e apresentam resistência às altas concentrações de metais, tais como Cd, Pb e Zn (FATNASSI et al., 2015).

De forma geral, as plantas de feijão de porco obtiveram maior número de nódulos quando comparadas às plantas de mucuna. Essa diferença não foi submetida a teste de médias porque pode ser uma característica intrínseca de cada espécie relacionada a especificidade em estabelecer simbiose. Para a mucuna, o excesso de metais no solo induziu uma redução significativa no número de nódulos entre as plantas cultivadas nos solos do N2 e N3, porém os nódulos coletados estavam aparentemente ativos, mostrando que o excesso de metais não tem efeito sobre a atividade dos nódulos. (Figura 6). Esses resultados estão em concordância com o relato de Kong et al. (2015) que utilizou a *Medicago lupulina* inoculada com rizobios ao estresse do metal pesado Cu, observando uma redução na nodulação das plantas, mas não observaram efeito sobre a taxa de nódulos ativos. O excesso de metais no solo afeta a nodulação de plantas leguminosas, no entanto a presença de nódulos ativos indica que a ocorrência a fixação de nitrogênio.



**Figura 6:** Número de nódulos em plantas de feijão de porco e mucuna preta, cultivadas em vasos contendo solos contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC (Santo Amaro - BA). Barras acompanhadas pelas mesmas letras, maiúsculas para o feijão-de-porco e minúsculas para mucuna preta

A produção de biomassa da parte aérea do feijão-de-porco não foi afetada pelos níveis crescentes de contaminação, ou seja, não houve diferença significativamente entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 3). No entanto, as plantas crescidas nos solos com maior nível de contaminação, na mucuna preta apresentaram crescimento significativamente inferiores ( $P \leq 0,05$ ) quando comparadas as plantas crescidas nos solos com N1 e N2 de contaminação (Figura 7). No menor nível de contaminação, dentro dos tratamentos com inoculação as estirpes BR 3251 e BR 10026 apresentaram melhor efeito nas plantas de feijão de porco. O solo sem inoculação, porém com bactérias nodulíferas nativas, apresentou uma produção de biomassa da parte aérea significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ), em relação a outros tratamentos com inoculação.

Os níveis crescentes de contaminação não afetaram a produção de biomassa aérea do feijão-de-porco, entretanto, a inoculação das plantas cultivadas no solo com o menor nível de contaminação com a estirpe BR 2811 promoveu um incremento de mais de 400 % na produção de matéria seca da planta em relação à inoculação com a BR 7606, porém sem apresentar efeito

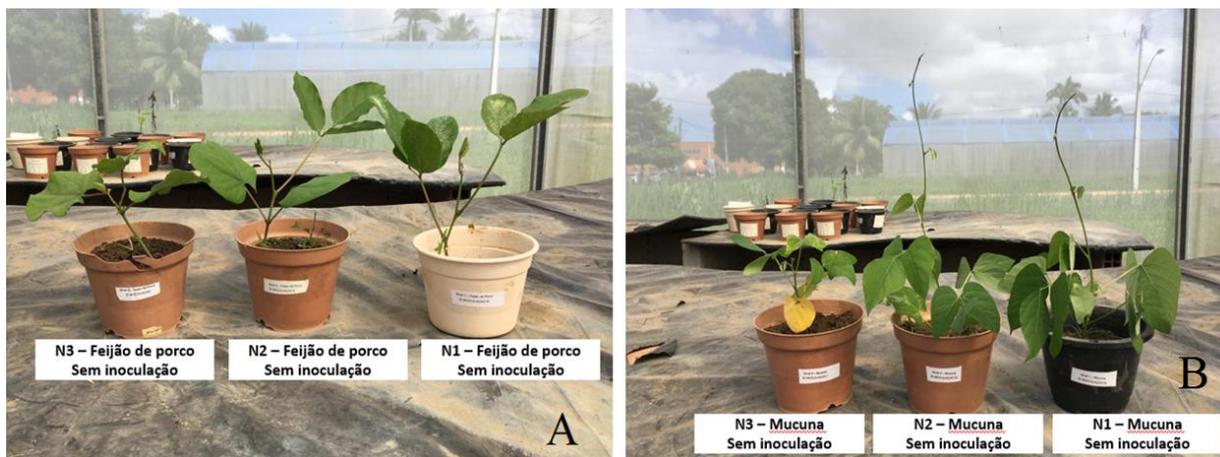
em relação à inoculação com as demais estirpes nem com relação à simbiose estabelecida com as bactérias nativas do tratamento sem inoculação (Tabela 3).

O crescimento das raízes também foi afetado nos solos mais contaminados, e nos tratamentos com inoculação bacteriana não houve diferenças significativas no crescimento das raízes. MacFarlane e Burchett (2002), observaram que o excesso de Zn reduziu a altura das mudas e a biomassa aérea e radicular das plantas. Assim como, o excesso de Pb provoca nas plantas inibição do crescimento das raízes, supostamente devido à inibição da divisão celular na ponta da raiz. De forma geral, o excesso de metais provoca diminuição na produção de biomassa aérea, raízes e outros parâmetros fisiológicos da planta (WANI; KHAN; ZAIDI, 2008).

**Tabela 3:** Biomassa seca da parte aérea, em gramas (g), de plantas cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação. Abreviaturas: N1- Solo Santo Amaro - baixa contaminação; N2 Solo Santo Amaro - média contaminação; N3 - Solo Santo Amaro - alta contaminação

MSPA	Feijão de porco			Média global
	N1	N2	N3	
	G			
Sem inoculação	3,69 ab	5,50 a	3,48 a	4,22
BR 2811	5,27 a	4,33 a	3,24 a	4,28
BR 3251	2,81 ab	3,10 a	4,46 a	3,46
BR 7606	1,15 b	2,87 a	1,99 a	2,01
BR 10026	3,58 ab	4,85 a	3,76 a	4,01
BR 10247	3,16 ab	2,75 a	2,89 a	2,93
Média Global	3,28	3,89	3,30	
MSPA	Mucuna preta			Média global
	N1	N2	N3	
Sem inoculação	5,05	5,05	3,55	4,53 a
BR 2811	3,38	3,89	3,92	3,73 a
BR 3251	3,93	3,80	3,73	3,82 a
BR 7606	4,25	4,64	2,01	3,63 a
BR 10026	4,78	6,05	2,93	4,59 a
BR 10247	4,30	4,41	4,36	4,36 a
Média global	4,28 AB	4,64 A	3,42 B	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey



**Figura 7:** Indivíduos de feijão de porco e mucuna preta 65 DAP. Produção de biomassa em solos com diferentes concentrações de Cd, Pb e Zn

A produção de biomassa das raízes das leguminosas variou entre 0,63 e 1,18 g por planta (Tabela 4), não sendo afetado pela inoculação de bactérias nem pelos níveis de contaminação dos solos em que as espécies foram cultivadas. Esses resultados não estão de acordo com o que foi observado por Fan et al. (2018), em experimento semelhante. Esses mesmos autores, utilizando solos com distintos níveis de metais pesados (levemente e altamente contaminados) observaram que as plantas inoculadas com diferentes espécies de *Rhizobium* apresentaram aumento da produção de biomassa da parte aérea e das raízes. Segundo esses autores a rizosfera da planta após inoculação rizobiana sofreu variações nas comunidades e funções bacterianas. As comunidades microbianas são influenciadas pelos exsudados radiculares expelidos pelas raízes das plantas. A liberação desses metabólitos pelas plantas determina a microbiota rizosférica, podendo tanto favorecer como inibir o desenvolvimento de comunidades vegetais e microbianas. Ou seja, os exsudados radiculares influenciam o desenvolvimento de organismos benéficos para as plantas, como organismos fixadores de nitrogênio assim como podem inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos (AHKHAMI et al., 2017). O mesmo pode ter ocorrido, no presente trabalho, afetando crescimento dos rizóbios inoculados. Além disso, nossos resultados apontam que as bactérias nativas foram eficientes, certamente por estarem adaptadas às condições dos solos estudados.

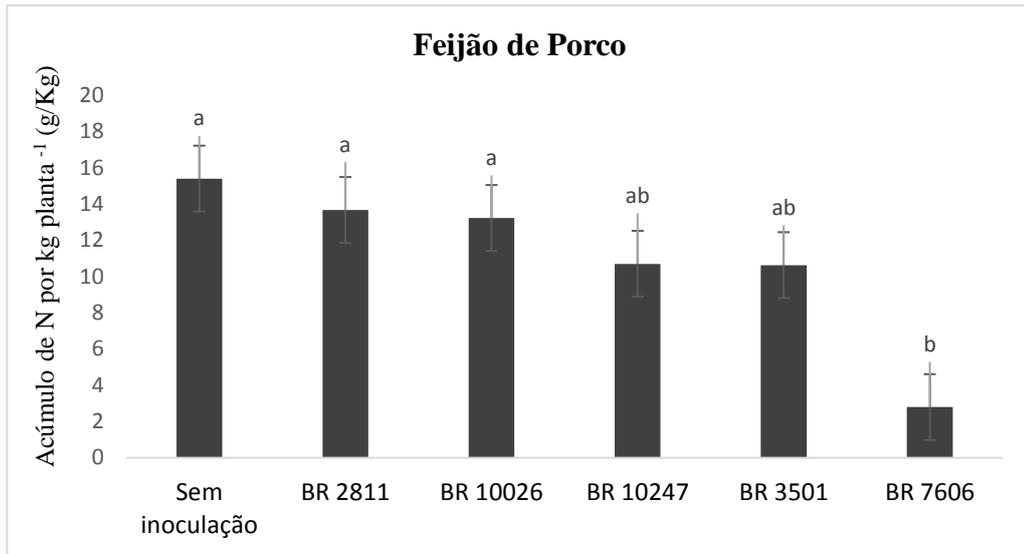
A mucuna apresentou comportamento diferente, apresentando uma produção de biomassa seca das raízes prejudicada no nível mais alto de contaminação em relação ao nível intermediário, sem nenhum efeito da inoculação. Para esta espécie, não houve efeito da inoculação na produção de raízes.

**Tabela 4:** Biomassa seca das raízes, em g, de plantas cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação. Abreviaturas: N1- Solo Santo Amaro - baixa contaminação; N2 Solo Santo Amaro - média contaminação; N3 - Solo Santo Amaro - alta contaminação

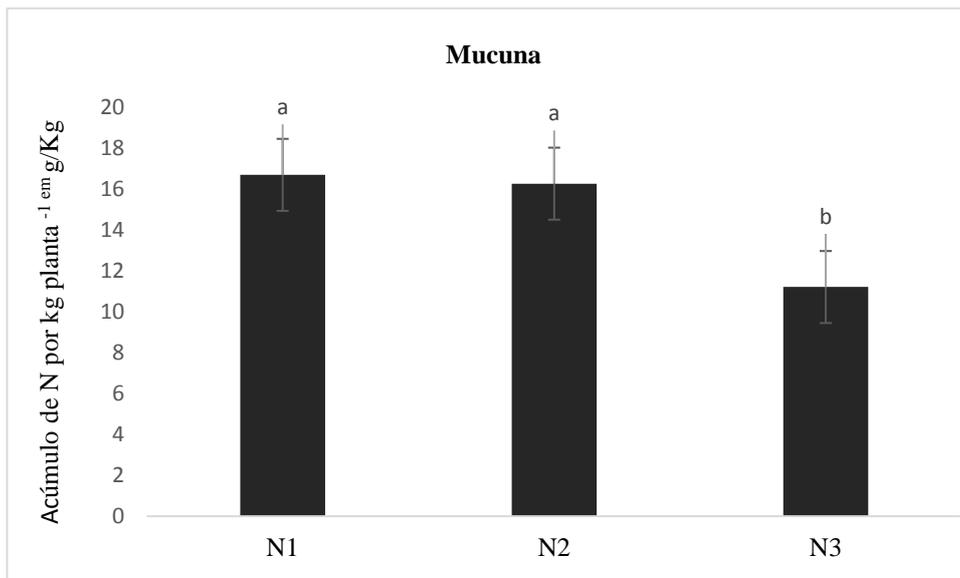
MSR	N1	N2	N3
Feijão de porco	0,63	0,94	0,63
Mucuna preta	1.16	1.28	1.11B

#### 4.2 Concentração e acúmulo de Nitrogênio nas leguminosas

Seguindo o comportamento em relação ao número de nódulos (Figura 8) e biomassa da parte aérea, o estresse causado pelos metais no solo, principalmente no N3, diminuiu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o teor de N na mucuna preta. Os teores de N total (Nt) (Tabela 5) e o N acumulado diferiram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 8). Curiosamente, o estresse por metais pesados não reduziu significativamente a concentração de N nas plantas de feijão de porco não inoculadas, mas reduziu nas plantas inoculadas. Esses resultados são consistentes com os relatos anteriores sobre estresse causados por metais pesados na simbiose leguminosa-rizóbio (CHEN et al., 2018) Esses autores observaram que o excesso de metal influencia diretamente na a simbiose leguminosa-rizóbio reduzindo a nodulação (número e peso do nódulo) em plântulas inoculadas Na mucuna, por sua vez, foi observado que as plantas cultivadas nos solos com o nível mais baixo de contaminação N1 foi a que apresentou a maior taxa de N fixado, quando comparado com plantas cultivadas no N2 e N3 (Figura 9). Esses resultados estão dentro do esperado, e corroboram com trabalhos anteriores, mostrando que elevadas concentrações de metais reduzem a nodulação e conseqüentemente o N fixado pelos rizobios. (KONG et al., 20015; PAJUELO, 2011). A fixação do N2 atmosférico, em plantas de feijão de porco e mucuna preta demonstra que os isolados foram eficientes, embora reduzida quando submetidos a concentrações mais elevadas de Cd, Pb e Zn.



**Figura 8:** Comparação do conteúdo de N nas plantas de feijão de porco inoculadas e a planta não inoculada com rizóbios



**Figura 9:** Conteúdo de N em plantas de mucuna preta nos diferentes níveis de contaminação

**Tabela 5:** Teor de N em plantas de feijão de porco e mucuna preta, em g kg<sup>-1</sup>, cultivadas em vasos contendo solos contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC (Santo Amaro - BA)

Teor de N	Feijão de porco			
	N1	N2	N3	Média global
Sem inoculação	1,54 a	1,30 a	1,47 a	1,43 a
BR 2811	1,34 a	1,16 a	1,02 a	1,71 ab
BR 3501	1,06 ab	1,45 a	1,48 a	1,33 a
BR 7606	0,28 b	1,11 a	0,75 a	0,71 b
BR 10026	1,32 a	1,57 a	0,85 a	1,25 ab
BR 10247	1,07 ab	1,39 a	1,64 a	1,37 a
Média Global	1,10	1,33	1,20	
Teor de N	Mucuna			
	N1	N2	N3	Média global
Sem inoculação	1,92	1,63	0,81	1,46 a
BR 2811	1,50	1,80	1,38	1,56 a
BR 3501	1,35	1,43	1,55	1,44 a
BR 7606	1,60	1,71	0,84	1,39 a
BR 10026	1,54	1,62	1,05	1,40 a
BR 10247	2,10	1,55	1,09	1,58 a
Média global	1,67 A	1,63 A	1,12 B	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

### 4.3 Eficiência da fitoextração

O conteúdo de Cd, Pb e Zn nos tecidos vegetais e o Fator de bioconcentração (FB) são apresentadas na Tabela 6. Em geral, a mucuna preta acumulou mais metal pesado na parte aérea, provavelmente porque a produção de biomassa da parte aérea na mucuna foi superior a do feijão do porco (Tabela 3). O teor de Cd variou de 1,10 a 90,5 mg kg<sup>-1</sup>, no feijão de porco e na mucuna preta essa variação foi de 0,20 a 37,25. O conteúdo de Pb nas plantas variou 191,2% entre os solos N1 e N3. O conteúdo de Zn nas plantas variou de 24 a 192 mg kg<sup>-1</sup> no feijão, N1 e N3 respectivamente, e 49 a 218 na mucuna preta, apresentando uma variação menos acentuada entre três níveis de contaminação. Os teores de Cd, Pb e Zn encontrados na biomassa aérea das plantas de feijão de porco e mucuna preta foram mais expressivos nos solos com maiores níveis de contaminação. Esses resultados podem ser explicados pelo baixo valor do pH do solo N3 (Tabela 1), quando comparado aos outros dois solos (N1 e N2). A disponibilidade de metais pesados é influenciada pelo pH dos solos, sendo aumentada em pHs mais baixos.

As inoculações tiveram efeito na absorção de metais pelas plantas. As estirpes BR 2811 e a estirpe BR 10247 e a BR 10026 promoveram aumentos nos teores de Cd, Pb e Zn na biomassa aérea do feijão de porco e mucuna preta. Assim como, a absorção desses metais foi reduzida nos tratamentos sem inoculação.

As plantas estudadas apresentaram valores baixos de fator de bioconcentração (FB) para Pb, sendo 0,03 e 0,21 na mucuna preta e de 0,04 a 0,07 no feijão de porco. Os FBs de Zn das plantas variaram entre 0,39 e 1,28. Os valores de FB para Cd foram entre 1,62 a 15,1 na mucuana. Segundo Zhuang et al., (2007), o fator de bioconcentração é a característica vegetal mais importante na fitorremediação, ela refere-se à absorção de metais pelas plantas, sua mobilização nos tecidos vegetais e armazenamento na biomassa da planta aérea. Sendo assim baixos valores de FBs indicam que a planta teve dificuldade em mobilizar o metal para parte aérea. As plantas de feijão de porco e mucuna preta não foram eficientes em translocar o Cd para sua biomassa aérea, portanto não podem ser consideradas como plantas acumuladoras desse metal. As plantas de feijão de porco apresentaram uma eficiência maior em acumular o Cd quando inoculadas. Tanto o feijão de porco quanto a mucuna não foram eficientes em acumular Pb e Zn.

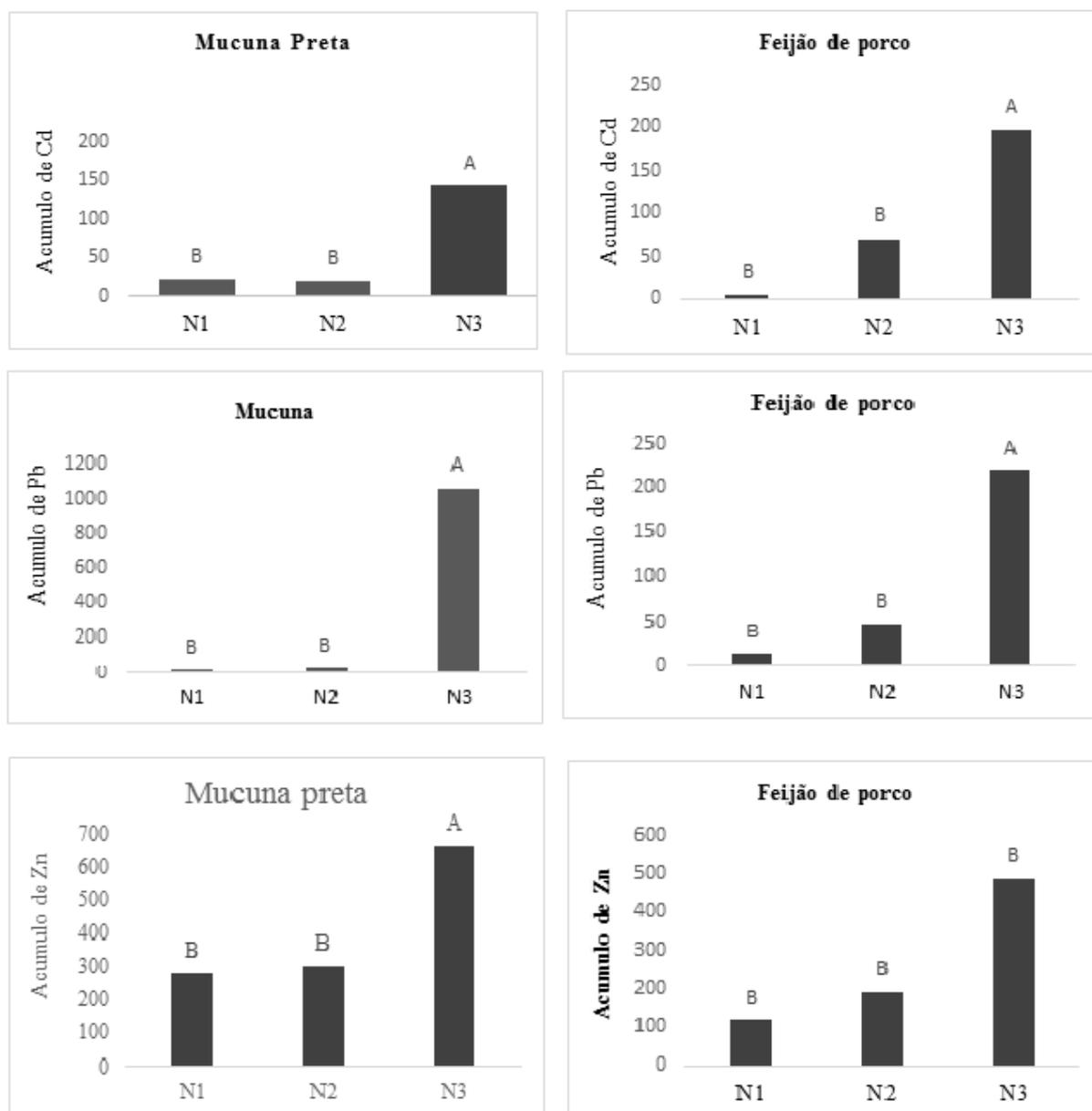
**Tabela 6:** Conteúdo de Cd, Pb e Zn, em mg kg<sup>-1</sup>, nas plantas e no Fator de bioacumulação (FB)  
(Continua)

<b>Cd</b>						
<b>Teor de Cd na planta</b>			<b>Fator de bioconcentração</b>			
<b>Feijão de porco</b>						
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Sem inoculação	1,23 aB	7,35 aB	69,40 aA	0,84	0,92	0,78
BR 2811	1,40 aB	5,98 aB	93,80 aA	0,97	0,75	1,05
BR 3251	1,10 aB	6,18 aB	73,23 aA	0,76	0,77	0,82
BR 7606	1,10 aB	6,98 aB	59,55 abA	0,76	0,87	0,67
BR 10026	1,75 aA	7,13 aA	0,50 bA	1,21	0,89	1,01
BR 10247	1,58 aB	5,53 aB	90,53 aA	1,09	0,69	0,01
<b>Mucuna preta</b>						
Sem inoculação	0,28 aB	1,30 aB	37,25 aA	0,19	0,16	0,42
BR 2811	0,58 aB	2,10 aAB	25,97 aA	0,40	0,26	0,29
BR 3501	0,20 aB	1,07 aAB	26,37 aA	0,14	0,13	0,30
BR 7606	0,33 aB	1,20 aAB	15,50 aA	0,22	0,15	0,17
BR 10026	0,30 aB	1,40 aB	36,33 aA	0,21	0,18	0,41
BR 10247	0,27 aB	0,78 aB	24,28 aA	0,18	0,10	0,27
<b>Pb</b>						
<b>Teor de Pb na planta</b>			<b>Fator de bioconcentração</b>			
<b>Feijão de porco</b>						
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Sem inoculação	0,48 aA	7,95 aA	36,90 aA	0,00	0,01	0,01
BR 2811	1,53 aB	11,15 aAB	50,60 aA	0,01	0,01	0,01
BR 3251	2,20 aB	3,25 aB	51,65 aA	0,01	0,00	0,01
BR 7606	0,55 aB	3,78 aB	95,60 aA	0,00	0,00	0,02
BR 10026	5,83 aA	3,15 aA	38,55 aA	0,03	0,00	0,01
BR 10247	10,53 aAB	2,60 aB	56,13 aA	0,05	0,00	0,01
<b>Mucuna preta</b>						
Sem inoculação	10,80 aB	11,73 aB	186,93 aA	0,06	0,01	0,03
BR 2811	0,08 aB	2,13 aB	89,90 aA	0,00	0,00	0,02
BR 3501	0,15 aB	4,25 aB	111,67 aA	0,00	0,00	0,02
BR 7606	1,10 aB	18,85 aB	42,75 aA	0,01	0,02	0,01
BR 10026	9,60 aB	4,13 aB	148,05 aA	0,05	0,00	0,03
BR 10247	1,95 aB	1,25 aB	92,48 aA	0,01	0,00	0,02

**Tabela 6:** Conteúdo de Cd, Pb e Zn, em mg kg<sup>-1</sup>, nas plantas e no Fator de bioacumulação (FB)  
(Conclusão)

<b>Zn</b>						
	<b>Teor de Zn na planta</b>			<b>Fator de bioconcentração</b>		
	<b>Feijão de porco</b>					
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Sem inoculação	28 aB	26 aB	141 aA	0,13	0,05	0,14
BR 2811	24 aB	34 aAB	139 aA	0,11	0,07	0,13
BR 3251	31 aB	31 aB	150 aA	0,14	0,06	0,14
BR 7606	33 aB	36 aB	157 aA	0,15	0,07	0,15
BR 10026	30 aB	31 aB	192 aA	0,14	0,06	0,06
BR 10247	38 aA	27 aA	64 aA	0,17	0,06	0,18
	<b>Mucuna preta</b>					
Sem inoculação	58 aB	68 aB	205 aA	0,26	0,14	0,20
BR 2811	74 aAB	62 aB	184 aA	0,34	0,13	0,18
BR 3501	49 aB	59 aB	172 aA	0,22	0,12	0,16
BR 7606	61 aA	97 aA	80 aA	0,28	0,20	0,08
BR 10026	55 aB	62 aB	218 aA	0,25	0,13	0,21
BR 10247	58 aB	57 aB	173 aA	0,26	0,12	0,17

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

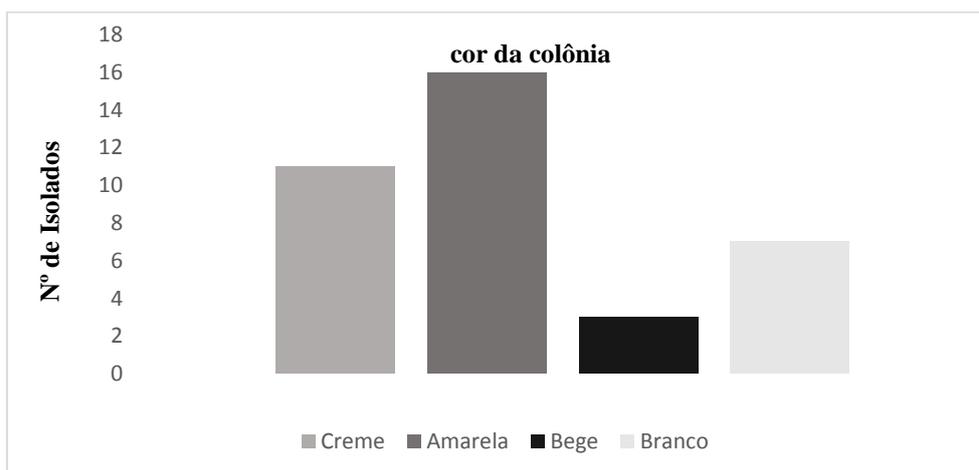


**Figura 10:** Acúmulo de Cd, Pb e Zn na parte aérea das plantas de mucuna preta e feijão de porco, em  $\text{g kg}^{-1}$ , cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação

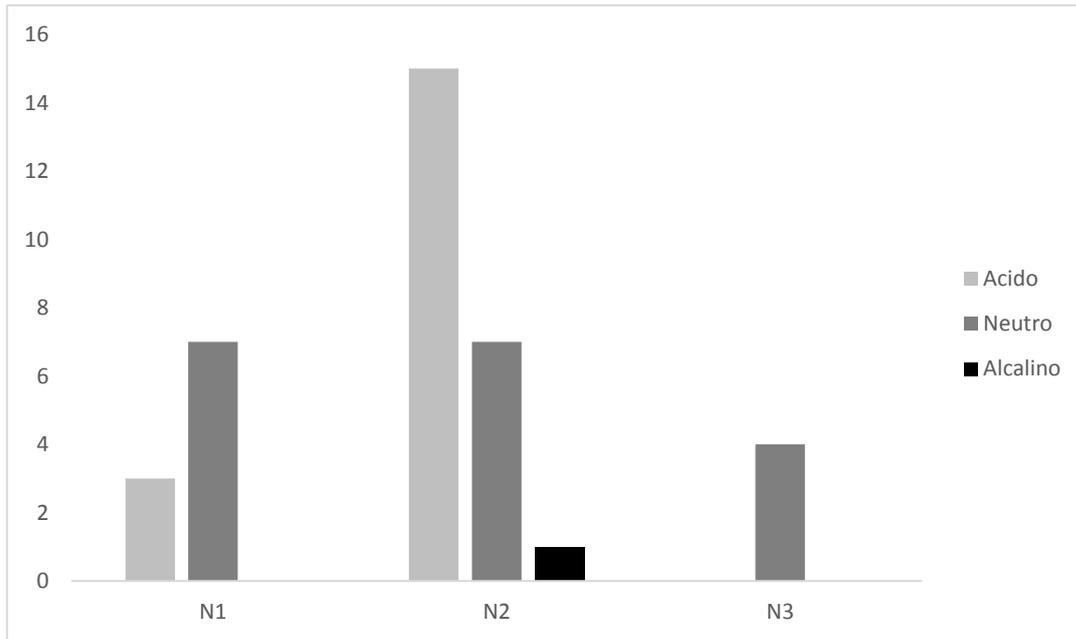
#### 4.4 Caracterização morfofisiológica de rizóbios nativos de solos contaminados

Um total de 37 isolados bacterianos foi obtido a partir de nódulos das leguminosas cultivadas sem inoculação em solos com diferentes níveis de contaminação, todos de crescimento rápido ( $> 24$  horas), com colônias circulares de produtoras e exopolissacarídeos (Tabela 6). A grande maioria dos isolados de rizóbios apresentaram reação de pH ácido ou neutro em meio YMA (Figuras 8 e 9), com colônias puntiformes amarelas em sua maioria,

brancas, cremes e bege. No solo com maior nível de contaminação (N3) predominaram bactérias que não modificaram o pH do meio da cultura. Os outros parâmetros observados foram bem uniformes nos diferentes níveis de contaminação (Tabela 9). Os nódulos presentes nas plantas estavam aparentemente funcionais, observando características visuais. A tolerância do *Rhizobium* em simbiose com leguminosas a altas concentrações de metais pesados já foi relatada pelo Carrasco et al. (2005), eles observaram uma alta diversidade genética de rizóbios encontrada em solos altamente contaminados com metais pesados. Outros trabalhos, no entanto, afirmam que a presença de metais pesados inibi a diversidade genética de populações de rizóbios (HIRSCH et al., 1993). Podemos inferir que os rizóbios assim como outros grupos microbianos, podem desenvolver estratégias de resistência para adaptarem-se à ambientes hostis, inclusive com altos teores de metais como Cd, Pb e Zn.



**Figura 11:** Cor das colônias bacterianas em meio YMA isoladas de feijão de porco e mucuna cultivadas em solos sob diferentes níveis de contaminação



**Figura 12:** Modificação do pH do meio YMA das bactérias isoladas de nódulos de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos sob diferentes níveis de contaminação.

**Tabela 7:** Caracterização morfofisiológica das bactérias isoladas de solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn  
(Continua)

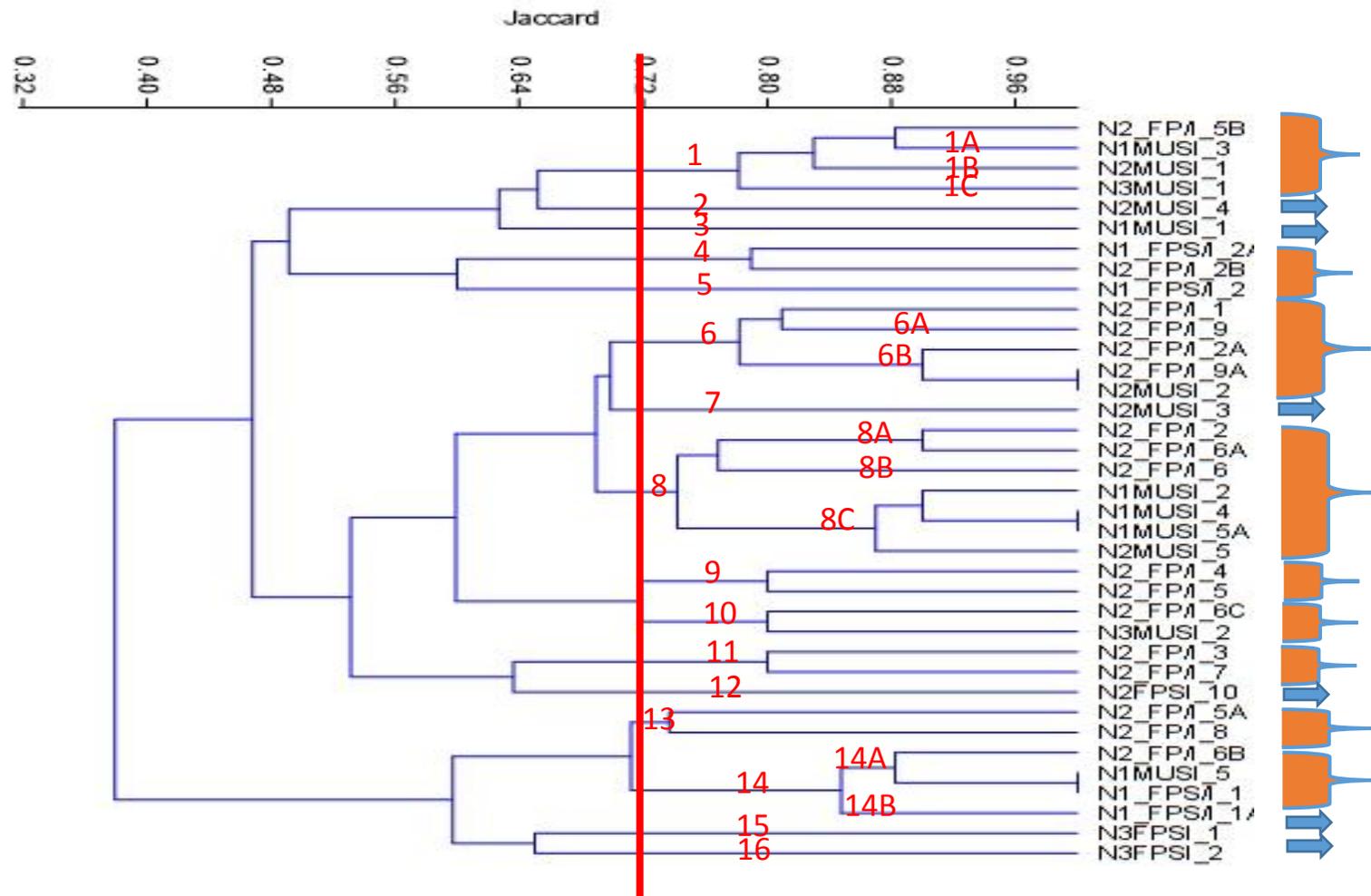
Código	Tempo	Forma	Borda	Colônia	Tamanho	pH	Elevação	Transparência
N1 FPS/I 1	24	Circular	Irregular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Sim
N1 FPS/I 1A	24	Circular	Irregular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Sim
N1 FPS/I 2	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Neutro	Com	Não
N1 FPS/I 2A	24	Circular	Regular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Com	Não
N2 FP/I 1	24	Circular	Irregular	Homogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N2 FP/I 2	24	Circular	Regular	Heterogênia	Puntiforme	Ácido	Com	Não
N2 FP/I 2A	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N2 FP/I 2B	24	Circular	Regular	Heterogênia	Puntiforme	Neutro	Com	Não
N2 FP/I 3	24	Circular	Irregular	Homogênia	Puntiforme	Ácido	Sem	Sim
N2 FP/I 4	24	Circular	Regular	Heterogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Não
N2 FP/I 5	24	Circular	Regular	Heterogênia	Puntiforme	Neutro	Com	Sim
N2 FP/I 5A	24	Circular	Irregular	Homogênia	Puntiforme	Ácido	Sem	Não
N2 FP/I 5B	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Neutro	Com	Sim
N2 FP/I 6	24	Circular	Irregular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Não
N2 FP/I 6A	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Não
N2 FP/I 6B	24	Circular	Irregular	Homogênia	Não	Neutro	Sem	Sim
N2 FP/I 6C	24	Circular	Regular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Com	Sim
N2 FP/I 7	24	Circular	Irregular	Homogênia	Não	Ácido	Sem	Não
N2 FP/I 8	24	Circular	Regular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Sim
N2 FP/I 9	24	Circular	Irregular	Homogênia	Não	Ácido	Sem	Sim
N2 FP/I 9A	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Não
N2FPSI 10	24	Circular	Irregular	Heterogênia	Puntiforme	Ácido	Com	Não
N3FPSI 1	24	Circular	Irregular	Heterogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Não
N3FPSI 2	24	Circular	Irregular	Heterogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Sim
N1MUSI 1	24	Circular	Regular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Com	Sim
N1MUSI 2	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N1MUSI 3	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Neutro	Com	Sim
N1MUSI 4	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N1MUSI 5	24	Circular	Irregular	Homogênia	Puntiforme	Neutro	Sem	Sim
N1MUSI 5A	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N2MUSI 1	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Alcalino	Com	Sim
N2MUSI 2	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Ácido	Com	Sim
N2MUSI 3	24	Circular	Irregular	Heterogênia	Não	Ácido	Sem	Sim
N2MUSI 4	24	Circular	Regular	Homogênia	Puntiforme	Ácido	Com	Sim
N2MUSI 5	24	Circular	Regular	Heterogênia	Não	Ácido	Com	Não
N3MUSI 1	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Neutro	Com	Não
N3MUSI 2	24	Circular	Regular	Homogênia	Não	Neutro	Com	Sim

**Tabela 7:** Caracterização morfofisiológica das bactérias isoladas de solos contaminados com As, Cd, Pb e Zn (Conclusão)

Cor	Muco	Quantidade de Muco	Limpa	Elasticidade	Aspecto
Creme	Sim	Pouco	Sim	Não	Seca
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Sim	Seca
Branco	Sim	Pouco	Sim	Sim	Umida
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Não	Umida
Creme	Sim	Médio	Não	Não	Umida
Amarela	Sim	Muito	Sim	Sim	Umida
Creme	Sim	Muito	Sim	Sim	Umida
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Sim	Brilhante
Creme	Sim	Pouco	Não	Sim	Umida
Amarela	Sim	Médio	Não	Não	Umida
Bege	Sim	Muito	Não	Não	Umida
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Não	Seca
Branco	Sim	Muito	Não	Não	Umida
Creme	Sim	Médio	Não	Sim	Umida
Amarela	Sim	Muito	Sim	Sim	Umida
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Não	Seca
Creme	Sim	Médio	Sim	Não	Brilhante
Amarela	Sim	Pouco	Não	Não	Umida
Creme	Sim	Pouco	Sim	Não	Seca
Creme	Sim	Médio	Sim	Não	Umida
Amarela	Sim	Muito	Sim	Não	Umida
Creme	Sim	Pouco	Não	Não	Brilhante
Creme	Sim	Pouco	Não	Sim	Seca
Bege	Sim	Pouco	Sim	Não	Brilhante
Branco	Sim	Pouco	Não	Não	Umida
Amarela	Sim	Muito	Não	Sim	Umida
Branco	Sim	Muito	Sim	Não	Umida
Amarela	Sim	Muito	Não	Não	Umida
Amarela	Sim	Pouco	Sim	Não	Seca
Amarela	Sim	Médio	Não	Não	Umida
Branco	Sim	Muito	Não	Sim	Brilhante
Bege	Sim	Médio	Sim	Não	Umida
Amarela	Sim	Médio	Sim	Sim	Umida
Branco	Sim	Muito	Sim	Não	Umida
Amarela	Sim	Muito	Não	Não	Umida
Branco	Sim	Médio	Sim	Não	Umida
Creme	Sim	Muito	Não	Não	Umida

Um corte acima de 70% de similaridade formou 16 agrupamentos em função das características fenotípicas das colônias. Dos 37 isolados, sete (N2MUSI-4 (G2), N2MUSI-19 (G3), N2MUSI-3 (G7), N1FPSA-2 (G5), N2FPSI-10 (G12), N3FPSI-1 (G15), N3FPSI-2 (G16)) formaram ramas monofiléticas, demonstrando serem os mais diferentes da coleção. Tais isolados são provenientes tanto das duas espécies de leguminosas, quanto dos três níveis de contaminação. O agrupamento 1 formou três sub-agrupamentos (1A – isolados N2-FPA-5B, N1MUSI-3, 1B – N2MUSI-1 e 1C – N3MUSI-1). Neste grupo, o subgrupo 1A foi o que

apresentou maior similaridade de características culturais (88%). Os grupos 4, 9, 10, 11 e 13 apresentaram dois isolados com a mesma similaridade abaixo de 80%. Finalmente, os grupos 6, 8 e 14 tiveram sub-agrupamentos distintos, sendo que apenas o 6B (N2FPA-9A e N2MUSI-2), o 8C (N1MUSI-4 e N1MUSI-5A) e o 14A (N1MUSI-5 e N1FPSA-1A) apresentaram 100% de similaridade, ou seja, são idênticos. Normalmente, as características fenotípicas de colônias não são capazes de distinguir isolados de forma tão clara como aconteceu com os isolados deste estudo. É possível que estes rizóbios sejam de espécies ainda não estudadas. Estudos taxonômicos por meio de sequenciamento e *fingerprint* poderá ajudar a corroborar esta possibilidade.



**Figura 13:** Dendrograma de similaridade baseado em características culturais entre 37 isolados de rizóbios, obtidos de nódulos de plantas de feijão de porco e mucuna preta cultivadas em solos da contaminados oriundos da área da antiga propriedade da COBRAC

Os índices de diversidade, Margalef e equitabilidade foram calculados para cada espécie nos diferentes níveis de contaminação ao qual as plantas estavam expostas. (Tabela 7). O índice de Shannon ( $H'$ ), que estima a diversidade de espécies em uma comunidade foi maior nos solos com médio nível de contaminação em feijão de porco e no solo com menor nível de contaminação em mucuna. Da mesma forma, o padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies, ou seja, os valores de equitabilidade para N2 e N1 no feijão de porco e mucuna, respectivamente, também foram superiores sugerindo que nestas áreas há uma maior uniformidade na distribuição dos grupos bacterianos, ou seja, sem a dominância forte de qualquer grupo. O índice de Margalef ( $f$ ), que avalia a riqueza das espécies, foi maior nos solos com média contaminação, indicando que nesses solos ocorre uma diversidade.

**Tabela 8:** Índice de diversidade de Shannon (H), Dominance e Margalef em comunidades nativas de solos com diferentes níveis de concentração de Cd, Pb e Zn.

Índices	Feijão de porco			Mucuna		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Individuos	4	8	2	6	5	2
Dominance	0,25	0,68	0,5	0,22	0,2	0,5
Shannon (H)	1,39	2,74	0,69	1,56	1,61	0,69
Margale (f)	2,16	5,19	1,44	2,23	2,48	1,44
Equitabilidade (J)	0,97	1	1	1	0,97	1

## 5. CONCLUSÕES

Do ponto de vista econômico e ambiental, nossos resultados sugerem que plantas de feijão de porco e mucuna preta podem ser utilizadas em solos contaminados com Cd, Pb e Zn, visto que essas apresentam tolerância a elevados teores desses elementos. A fixação de nitrogênio, embora reduzida, foi eficiente mostrando que as estirpes de rizóbios estudadas não foram inibidas com as concentrações elevadas de metais pesados nos solos. As plantas não inoculadas apresentaram nódulos ativos, indicando a presença de bactérias nativas, que após caracterizadas geneticamente podem ser indicadas para assistir essas leguminosas na remediação de solos contaminados.

As estirpes BR 10026 e BR 10247 podem ser recomendadas para assistir leguminosas remediadoras. Essa utilização de rizóbios em plantas fitorremediadoras nos fornece uma estratégia ecológica e sustentável para obtenção de incrementos na fitorremediação de solos contaminados. No entanto, é fundamental um entendimento maior a respeito da relação simbiótica leguminosas-rizóbios e os metais.

Uma investigação maior deve ser realizada na rizosfera das plantas estabelecidas em áreas com concentrações elevadas de metais pesados, afim de compreender a estrutura das comunidades microbianas nativas desses solos.

As características fenotípicas destes isolados mostraram uma diversidade elevada nos 37 isolados. Elevada diversidade não é comum para grupos pequenos de rizóbios, necessitando de maiores estudos com ferramentas moleculares para determinar que espécies são capazes de nodular em ambiente tão inóspito como solos contaminados de metais pesados.

## 6. BIBLIOGRAFIA

AHKAMI, A.; WHITE III, R. A.; HANDAKUMBURA, P. P.; JANSSON, C. Rhizosphere Engineering: Enhancing Sustainable Plant Ecosystem Productivity in a Challenging Climate. **Rhizosphere**, Quebec, v. 3, p. 233-243, 2017.

ALI H.; KHAN E.; SAJAD M. A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, p. 869-881, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>>.

ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J. M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Oxford v. 3, n. 1, p. 71-90, 2004.

AL-SALEH, I.; ABDULJABBAR, M. Heavy metals (lead, cadmium, methylmercury, arsenic) in commonly imported rice grains (*Oryza sativa*) sold in Saudi Arabia and their potential health risk. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 220, p. 1168-1178, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.07.007> >.

ANDRADE LIMA, L.R.P. de ; BERNARDEZ, L.A.; Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 189, p.692-699, 2011.

ANDRADE, M. F. DE; MORAES, R. S. Contaminação por chumbo em Santo Amaro desafia décadas de pesquisas e a morosidade do poder público. **Ambiente & Sociedade**. Campinas, 2013. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/pdf/317/31727843005>>.

ANJOS, J. A. S. A. **Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação - BA**. 2003. 327f. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) – Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, São Paulo, 2003.

ARUNAKUMARA, K.; WALPOLA, B. C.; SONG, J-S.; SHIN, M-J.; LEE, C-J.; YOON, M-H. Phytoextraction of Heavy Metals Induced by Bioaugmentation of a Phosphate Solubilizing Bacterium. Korean. **Journal of Environmental Agriculture**, Korea, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5338/KJEA.2014.33.3.220>>.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. **Toxicological profile for zinc**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>>. Acessado em 14 de outubro de 2017.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2017. **Priority List of Hazardous Substances**. Disponível em: < <https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>. Acesso em 14 de outubro de 2017.

BABULA, P.; ADAM, V.; OPATRILOVA, R.; ZEHNALÉK, J.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 6, p 189–213, 2008. Disponível em: < <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10311-008-0159-9> >.

BERNI, R.; LUYCKX, M.; XU, X.; LEGAY, S.; SERGEANT, K.; HAUSMAN, J-F.; LUTTS, S.; CAI, G.; GUERRIERO, G. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, In Press.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, v.17, p. 21-34, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>>.

BOECHAT, C. L.; PISTÓIA, V. C.; GIANELO, C.; CAMARGO, F. A. O. Accumulation and translocation of heavy metal by spontaneous plants growing on multi-metal-contaminated site in the Southeast of Rio Grande do Sul state, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 23, n. 3, p. 2371-2380, 2016.

BOECHAT, C. L.; GIOVANELLA, P. ; AMORIM, M. B. ; DE SÁ, E. L. S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Metal-resistant rhizobacteria isolates improve *Mucuna deeringiana* phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soils from a gold mining area. **Environmental Science and Pollution Research International**, Mexico, v. 24, p. 3063/03-3073, 2017. Disponível em: < <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11356-016-8103-1>>.

BOMFIM, M. R, SANTOS, J. A. G.; COSTA, O. V. ; OTERO, X. L.; BOAS, G. S. V.; CAPELÃO, V. S.; SANTOS, E. S.; NACIF, P. G. S. Genesis, Characterization, and Classification of Mangrove Soils in the Subaé River Basin, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 1247-1260, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20140555>>.

BOTHE, H.; SŁOMKA, A.; Divergent biology of facultative heavy metal plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 219, p. 45-61, 2017.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Cytotoxicity and genotoxicity in water of the Subaé River (Humildes, Bahia, Brazil) using *Allium cepa* L. as a bioindicator. **Revista Ambiente & Água, Taubaté**, Taubaté, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1459>>.

CARRASCO, J. A.; ARMARIO, P.; PAJUELO, E.; BURGOS, A.; CAVIEDES, M. A.; LÓPEZ, R.; CHAMBER, M. A.; PALOMARES, A. J. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 37, p. 1131-1140, 2005.

CHEN, J.; LIU, Y-Q.; YAN, X-W.; WEI, G-H.; ZHANG, J-H.; FANG, L-C. Rhizobium inoculation enhances copper tolerance by affecting copper uptake and regulating the ascorbate-glutathione cycle and phytochelatin biosynthesis-related gene expression in *Medicago sativa* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 162, p. 312-323, 2018.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução N° 420, de 28 de dezembro de 2009.

CUNHA, FERNANDA GONÇALVES DA. **Contaminação humana e ambiental por chumbo no Vale do Ribeira, nos estados de São Paulo e Paraná**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Geociências), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências, Campinas, 2003.

DARY, M.; PÉREZ, M. A. C. PALOMARES, A. J. PAJUELO, E. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.177, p. 320-330, 2010.

DE ANDRADE, A. A. X.; SOARES, E. M. B.; CUNHA, D. A.; OLIVEIRA, M. L. R.; Riscos e incertezas: a realidade pós-extração do minério de chumbo em Boquira, BA. **Interações**, Campo Grande, v. 18, p. 103-117, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.20435/1984-042X-2017-v.18-n.1\(08\)](http://dx.doi.org/10.20435/1984-042X-2017-v.18-n.1(08))>.

ETESAMI, H. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 147, p. 175-191, 2018.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**. Manual de Métodos de Análise de Solo, 2ª Ed. 2009.

FAHR, M.; LAPLAZE, L.; BENDAOU, N.; HOCHER, V.; EL MZIBRI, M.; BOGUSZ, D.; SMOUNI, A. Effect of lead on root growth. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 175, 2013.

FAN, M.; XIAO, X.; GUO, Y.; ZHANG, J.; WANG, E.; CHEN, W.; LIN, Y.; WEI, G. Enhanced phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* in heavy metal-contaminated soils with rhizobia and the associated bacterial community structure and function. **Chemosphere**, Kidlington, v. 197, p. 729-740, 2018.

FATNASSI, I. C.; CHIBOUB, M.; SAADANI, O.; JEBARA, M.; JEBARA, S. H. Impact of dual inoculation with Rhizobium and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. **Comptes Rendus Biologies**, Issy-Les-Moulineaux, v. 338, p. 241-254, 2015.

FERRAN, A. P. N.de. A Mineração e a flotação no Brasil – Uma perspectiva histórica. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), Ministério de Minas e Energia, 2007. In: SOUZA, K. V.; LIMA, M. F. D. S. Passivos socioambientais da minero-metalurgia do chumbo em Santo Amaro (BA), Boquira (BA), Vale do Ribeira (PR) e Mauá da Serra (PR).

- FERNÁNDEZ, S.; POSCHENRIEDER, C.; MARCENÒ, C.; GALLEGO, J. R.; JIMÉNEZ-GÁMEZ, D.; BUENO, A.; AFIF, E. Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain. **Journal of Geochemical Exploration**. Amsterdam, v.174, p. 10-20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.05.015>>.
- FREEMAN, J. L.; ZHANG, L. H.; MARCUS, M. A.; FAKRA, S.; MCGRATH, S.; PILON-SMITS E. A.H. Spatial Imaging, Speciation, and Quantification of Selenium in the Hyperaccumulator Plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 124–134, 2006
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B. ; SANTOS, C. E. R. E. S. ; SILVA, A. F. ; SOUZA, R. J. C. . Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 8, p. 585-597, 2015.
- FREITAS, E. V.; NASCIMENTO, C. W.; SILVA, W. M. Citric Acid-Assisted Phytoextraction of Lead in the Field: The Use of Soil Amendments. **Water, Air and Soil Pollution**, New York, v. 225, p. 1796, 2014. Disponível em: <<https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11270-013-1796-6>>.
- GALL, J. E.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, Bar Harbor, v.187, p. 201, 2015. Disponível em: <<https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10661-015-4436-3>>.
- GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Heavy metals and soil microbes. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 41, p. 2031-2037, 2009.
- GÓMEZ-SAGASTI, M. T.; MARINO, D. PGPRs and nitrogen-fixing legumes: a perfect team for efficient Cd phytoremediation? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne v. 6, p. 81, 2015.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, 2001.
- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; MCGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of rhizobium leguminosarum biovar trifolii populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 25, p. 1485-1490, 1993.
- KIM, R.Y.; YOON, J.K.; KIM, T.S.; OWENS, Y.G.; KIM, K.R. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 37, p. 1041–1061, 2015.
- KHALID, S.; SHAHID, M.; NIAZI, N. K.; MURTAZA, B.; BIBI, I.; DUMAT, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 182, p. 247-268, 2017.

KONG, Z.; OSAMA, A. M.; ZHENSHAN, D.; XIAODONG, L.; BERNARD, R. G.; WEI, G. Rhizobial symbiosis effect on the growth, metal uptake, and antioxidant responses of *Medicago lupulina* under copper stress. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 16, p. 12479-12489, 2015.

KUMMER, L.; MELO, V. DE F.; BARROS, Y. J.; AZEVEDO, J. C. R. DE. Extrações sequenciais de chumbo e zinco em solos de área de mineração e metalurgia de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 2005-2018, 2011. Disponível em: <[http:// www.redalyc.org/html/1802/180221446017/](http://www.redalyc.org/html/1802/180221446017/)>.

LEGUIZAMO, M. A. O; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G.. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands—a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 168, p. 1230-1247, 2017

LIMA, F. DE S ; NASCIMENTO, C. W. A ; SILVA, F. B. V DA ; CARVALHO, V.GB DE ; RIBEIRO FILHO, M. R. Lead concentration and allocation in vegetable crops grown in a soil contaminated by battery residues. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 362-365, 2009.

LIU, Y.; WANG, H.; LI, X.; LI, J. Heavy Metal Contamination of Agricultural Soils in Taiyuan, China. **Pedosphere**, Beijing, v. 25, p. 901-909, 2015.

MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Environmental Research**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 65-84, 2002.

MACHADO, S. L.; RIBEIRO, L. D.; KIPERSTOK, A.; BOTELHO, M. A. B.; CARVALHO, M. F. "Diagnóstico da Contaminação por Metais Pesados em Santo Amaro da Purificação-BA." **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 140-155, 2004.

MAGNA G. A. M.; MACHADO, S. L.; PORTELLA, R. B.; CARVALHO, M. DE F. Avaliação da exposição ao Pb e Cd em crianças de 0 a 17 anos por consumo de alimentos vegetais cultivados em solos contaminados no município de Santo Amaro (BA). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 3-12, 2014.

MAGNA, G. A. M. **Análise da exposição por chumbo e cádmio presentes em alimentos vegetais e gramíneas no município de Santo Amaro – BA: caso do passivo ambiental da COBRAC**. 2011. 176f. Tese (Engenharia Ambiental Urbana – Universidade Federal da Bahia), Salvador, 2013.

MAJEED, A.; MUHAMMAD, Z.; SIYAE, S. Assessment of heavy metal induced stress responses in pea (*Pisum sativum* L.). **Acta Ecologica Sinica**, Kidlington, In press.

MANN, R. M.; VIJVER, M. G.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. Metals and metalloids in terrestrial systems: Bioaccumulation, biomagnification and subsequent adverse effects. **Ecological impacts of toxic chemicals**, Bentham Science Publishers, v. 3, p. 43-62, 2011.

MELO, E. E. C.; Nascimento, C. W. A.; Santos, A. C. Q.; Silva, A. S. Availability and fractionation of Cd, Pb, Cu, and Zn in soil as a function of incubation time and pH. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 776-784, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. In: \_\_\_\_\_. 2. ed. **Os Organismos do solo**. Lavras: UFLA, 2006. p. 17 - 82.

MOTUZOVA, G.V.; MINKINA, T.M.; KARPOVA, E.A.; BARSOVA, N.U.; MANDZHIEVA, S.S. Soil contamination with heavy metals as a potential and real risk to the environment. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 144, p. 241-246, 2014.

NAGAJYOTI, P. C; LEE, K. D; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 8, p. 199 - 216, 2010.

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

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, BAOSHAN. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n.3, p. 299-311, 2006.

NIEMEYER, J. C.; SANTOS, M.M.; RIBEIRO, R.; RUTGERS, M.; NOGUEIRA, M. A.; SILVA, E. M. da; SOUSA J. P. Ecological risk assessment of a metal-contaminated area in the tropics. Tier II: detailed assessment. **PloS one**, San Francisco, v. 10, p. 1-25, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141772> >.

NWAICHI, E. O.; WEGWU, M. O.; ONYEIKE, E. N. Phytoextracting cadmium and copper using *Mucuna pruriens*. **African Journal of Plant Science**, Louisiana v. 3, n. 12, p. 277-282, 2009.

PAJUELO, E.; LLORENTE, D. I. R.; LAFUENTE, A.; CAVIEDES, M. A. Legume–Rhizobium Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. **Biomangement of Metal-Contaminated Soils**, Dordrecht, v. 20, p. 95-123, 2011.

PEIXOTO, J. DE S. **Estimativa das perdas de solo e do transporte de chumbo e zinco por erosão hídrica no entorno da cidade de Santo Amaro da Purificação, Bahia**. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado em solos e qualidade ambiental) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

POURRET, O.; BOLLINGER, J. C.; “Heavy metal” - What to do now: To use or not to use?. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 610-611, p. 419-420, 2018.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F.R.I; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; SANTOS, E. A. Potential of plant species for remediation of trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.

RANGEL, W. DE M.; DE OLIVEIRA L. SILVIA M.; FERREIRA, P. A. A.; BONALDI, D. S.; GUIMARÃES, A. A.; THIJS, S.; WEYENS, N.; VANGRONVELD, J.; MOREIRA, F. M. S. Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. **International journal of phytoremediation**, Philadelphia, v. 19, p. 925-936, 2017.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, Irland, v. 180, P. 169-181, 2011.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; PEDRO FURLANI, R.; ABREU, C. A. DE; PEREIRA, B.F. F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes*. **Bragantia**, Campinas, v.66, p.327-334, 2007.

SAADANI, O.; FATNASSI, I. C.; CHIBOUB, M.; ABDELKRIM, S.; BARHOUMI, F.; JEBARA, M.; JEBARA, S. H. In situ phytostabilisation capacity of three legumes and their associated Plant Growth Promoting Bacteria (PGPBs) in mine tailings of northern Tunisia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 130, p. 263-269, 2016.

SANTOS, N.M.; DO NASCIMENTO, C.W.A.; ACCIOLY, A. M. A. Guideline Values and Metal Contamination in Soils of an Environmentally Impacted Bay. **Water, Air and Soil Pollution**, New York, v. 228, p. 1-12, 2017. Disponível em: < <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11270-017-3279-7> >.

SARWAR, N.; IMRAN, M.; SHAHEEN, M.R.; ISHAQUE, W.; KAMRAN, M.A.; MATLOOB, A.; REHIM, A.; HUSSAIN, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, Oxford, v. 171, p. 710-721, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>.

SENEVIRATNE, M.; RAJAKARUNA, N.; RIZWAN, M.; MADAWALA, H. M. S. P.; SILK, Y. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, p 1–19, 2017. Disponível em: < <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10653-017-0005-8> >.

SILVA, J.; MELLO J. W. V.; GASPARON, M.; ABRAHÃO, W. A. P.; CIMINELLI, V. S. T.; JONG, T. The role of Al-Goethites on arsenate mobility. **Water Research**, Oxford, v. 44, p. 5684-5692, 2010.

SILVA, W. R. **Fitoextração e bioassebilidade de As, Cd, Pb e Zn em solos contaminados por resíduos metalúrgicos**. 2015. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, G. S.; GLOAGUEN, T. V. ; COUTO, C. F.; MOTTA, P. N. S. D. Persistence and mobility of metals in an estuarine environment 25 years after closure of a lead smelter, Bahia State, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, New York, v. 76, p. 548, 2017a.

SILVA, W. R.; SILVA, F. B. V.; ARAÚJO, P. R. M.; NASCIMENTO, C. W. A. do. Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 144, p. 522-530, 2017b.

SOBRAL, L. G. S.; OLIVEIRA, D. B.; SOUZA, C. E. G.; SILVA, S. C. A. F.; BRAGA, P. F. A. **Metalurgia do chumbo: processos de produção e refino**. In: FERNANDES, F. R. C.; BERTOLINO, L. C.; EGLER, S. Projeto Santo Amaro – BA: aglutinando ideias, construindo soluções –diagnósticos. 2. ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2012. p. 150 – 173.

SOMASEGARAN, P. ; HOBEN, H. J.; **Methods in legume-rhizobium technology**, New York by Springer-Verlag, 1994.

SONG, B.; ZENG, G.; GONG, J.; LIANG, J.; XU, P.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; CHENG, M.; LIU, Y.; YE, S.; YI, H.; REN, X. Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. **Environment International**, Oxford, v. 105, p. 43-55, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.001>>.

SOUZA, K. V.; LIMA, M. F. D. S. Passivos socioambientais da minero-metalurgia do chumbo em Santo Amaro (BA), Boquira (BA), Vale do Ribeira (PR) e Mauá da Serra (PR). In: FERNANDES, F. R. C.; BERTOLINO, L. C.; EGLER, S. **Projeto Santo Amaro – BA: aglutinando ideias, construindo soluções –diagnósticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: CETEM – Centro de Tecnologia Mineral/MCTI, 2012 p. 19-41.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Method 3051a – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. 1998.

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

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970

WANI, P. A; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Chromium-reducing and plant growth-promoting Mesorhizobium improves chickpea growth in chromium-amended soil. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 159-163, 2008.

WAHSHA; M.; NADIMI-GOKI; M.; BINI, C. Land contamination by toxic elements in abandoned mine areas in Italy. **Journal Of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 16, p. 1300 – 1305, 2016.

WUANA, R.A.; OKIEIMEN, F.E.; Heavy metals in contaminated soil: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for bioremediation. **International Scholarly Research Network**, Nasr City, v. 2011, p. 20. 2011.

YANG, G.; SHAO H.; JU, M. Heavy Metal Contamination Assessment and Partition for Industrial and Mining Gathering Areas. **Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 11, p.286-303, 2014. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/7/7286/htm>>.

YIN, K.; WANG, Q.; LV, M.; CHEN, L. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>>

ZHUANG, P.; YANG, Q. W.; WANG, H. B.; SHU, W. S. Phytoextraction of Heavy Metals by Eight Plant Species in the Field. **Water, Air, and Soil Pollution**, New York, v. 184, p. 235-242, 2007.

ZRIBI, K.; DJÉBALI, N.; MRABET, M.; KHAYAT, N.; SMAOUI, A.; MLAYAH, A.; AOUANI, M. E. Physiological responses to cadmium, copper, lead, and zinc of *Sinorhizobium* sp. strains nodulating *Medicago sativa* grown in Tunisian mining soils. **Annals Of Microbiology**, New York, v. 62, p.1181-1188, 2012.