INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

FISIOLOGIA DE LEGUMINOSAS COM POTENCIAL FITOEXTRATOR PARA O METAL PESADO CÁDMIO

SARITA CARNEIRO ROSSI

Orientadora: Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa
Co-orientadora: Marlene Aparecida Schiavinato

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola

Campinas, SP
Fevereiro 2007

À minha família por todo o apoio e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa, pelos ensinamentos, apoio, incentivo, atenção, amizade e orientação nestes dois anos;

- À minha co-orientadora, Dra. Marlene Aparecida Schiavinato, também pelo apoio, incentivo, ensinamentos, orientação, amizade e dedicação ao desenvolvimento do meu projeto na Unicamp;

- À Dra. Mônica Ferreira de Abreu pela importante contribuição nas avaliações químicas realizadas no meu trabalho;

- Ao Dr. Eduardo Caruso Machado pelos ensinamentos e empréstimo de equipamentos;

- Às funcionárias da secretaria da pós-graduação, Adilza, Angelina, Beth e Célia pela atenção, dedicação e amizade;

- Às funcionárias da biblioteca por toda a ajuda prestada a mim durante este tempo;

- Aos funcionários do setor de Fertilidade do Solo, Carmem, Luiz e Terezinha pelo apoio e ajuda em minhas análises;

- À funcionária Eliete pelo gostoso cafezinho e amizade;

- Ao setor de Sementes do IAC pela oferta de sementes das espécies utilizadas;

- A todos os pesquisadores e professores do curso de pós-graduação do IAC pelos ensinamentos valiosos para minha formação profissional;

- Aos meus mais que queridos amigos da pós-graduação que dividiram comigo momentos bons e ruins, que me ajudaram, me incentivaram, sempre estando ao meu lado;

- Ao Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp pela oportunidade de desenvolver meu trabalho em suas dependências;

- Aos funcionários da Unicamp, Carlos, Denise, Domingos, Dulce, Lorenza, Néia e Paiola por toda a ajuda e atenção prestadas a mim;

- Aos estagiários da Unicamp, Fernanda, Carlos e Alice, pela amizade, ajuda e contribuição ao meu trabalho;

- À estagiária do IAC, Jeanne Marie, também pela amizade e apoio no período experimental;

- Aos estagiários, mestrandos e doutorandos da Unicamp pelo incentivo e ajuda no meu trabalho;

- A todos os professores do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho;

- À minha família que me ajudou muito em mais uma conquista, dando amor, conselhos e motivação;

- Ao Marco Antonio pelo incentivo, ajuda e muita compreensão nos momentos mais estressantes da realização do meu trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....vii
LISTA DE ANEXOS.....x
RESUMO.....xi
ABSTRACT.....xii
1 INTRODUÇÃO.....1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....3
2.1 Considerações Gerais.....3
2.2 O Cádmio e sua Fitotoxicidade.....4
2.3 Fitorremediação.....7
2.4 Nodulação e Metais Pesados.....9
2.5 Mecanismos de Tolerância.....11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....12
3.1 Material Vegetal.....12
3.2 Condições de Cultivo.....12
3.3 Tratamentos.....13
3.4 Instalação e Realização do Experimento.....13
3.5 Medidas de Crescimento.....15
3.6 Determinação das Trocas Gasosas.....15
3.7 Determinação do Potencial Hídrico Foliar.....15
3.8 Determinação dos Teores de Clorofila.....16
3.9 Determinação da Atividade Específica da Nitrogenase.....16
3.10 Determinação de Nitrogênio Total no Tecido.....17
3.11 Determinação dos Teores de Cd.....17
3.12 Cálculo do Índice de Translocação.....18
3.13 Cálculo do Índice de Produção Relativa.....18
3.14 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....19
4.1 Feijão-de-porco.....19
4.2 Crotalária.....37
5 CONCLUSÃO.....49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....50
7 ANEXO.....59
7.1 Anexo I.....59
7.2 Anexo II.....60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Teste F para diferentes variáveis obtidas em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais.....41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de emergência de sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. em função do tempo após o plantio, submetidas a diferentes concentrações de cádmio (μmol L^{-1}) sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Dados transformados arco seno √x.....19

Figura 2 - Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Transformação √x para dados de número de folhas.....20

Figura 3 - Área foliar de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....21

Figura 4 - Matéria seca dos cotilédones de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....22

Figura 5 - Matéria seca da raiz (A) e do caule (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....23

Figura 6 - Plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Nota-se diferença no tamanho das raízes e sua coloração e tamanho das folhas conforme as concentrações de Cd aumentaram.....24

Figura 7 - Plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Nota-se acentuada clorose na maior concentração do MP.....24

Figura 8 – Número de folhas de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5% Dados transformados √x.....25

Figura 9 – Área foliar (A) e altura (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....26

Figura 10 - Massa da matéria seca do caule (A) e da folha (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....27

Figura 11 - Taxa de absorção de CO_2 (A) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....28

Figura 12 - Teor de clorofila total de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.....29

Figura 13 - Potencial hídrico de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....30

Figura 14 – Número de nódulos por plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Dados transformados √x.....31

Figura 15 – Teor de nitrogênio total nos caules (A) e nas folhas (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....32

Figura 16 – Atividade da nitrogenase em plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....33

Figura 17 – Teor de cádmio nas raízes (A) e parte aérea (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....35

Figura 18 – Acúmulo de cádmio por planta de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....36

Figura 19 - Porcentagem de emergência de sementes de *Crotalaria juncea* L. em função do tempo após plantio, submetidas a diferentes concentrações de cádmio, sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% Dados transformados arco seno √x.....37

Figura 20 – Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....38

Figura 21 – Área foliar de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....39

Figura 22 – Matéria seca das raízes de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....39

Figura 23 – Matéria seca dos caules (A) e folhas (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....40

Figura 24 – Altura de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.....43

Figura 25 – Números de folhas (A) e área foliar (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5% ** Significativo a 1% Transformação √x para dados de número de folhas....44

Figura 26 – Matéria seca das raízes de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.....45

Figura 27 – Número de nódulos por plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Dados transformados √x.....45

Figura 28 – Teor de clorofila *b* (A) e total (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5% ** Significativo a 1%.....46

Figura 29 – Atividade da nitrogenase em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.....47

Figura 30 – Teor de cádmio em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Signifiativo a 1%.....48

LISTA DE ANEXOS

Anexo I - Composição química da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1939) modificada.....59

Anexo II - Composição química da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1939) modificada sem adição de nitrogênio.....60

ROSSI, Sarita Carneiro. **Fisiologia de leguminosas com potencial fitoextrator para o metal pesado cádmio**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Pós–Graduação – IAC.

RESUMO

A contaminação do solo por metais pesados (MP) tóxicos às plantas e aos animais tem sido promovida, principalmente, pela ação antropogênica. A presença de metais como o cádmio (Cd) no solo é, hoje, uma realidade. Por isso, há a necessidade de se desenvolver técnicas de fitorremediação, como a fitoextração, que envolve o uso de plantas acumuladoras de MP para removerem poluentes inorgânicos do ambiente. O presente trabalho teve por objetivo determinar o potencial fitoextrator das leguminosas *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. e *Crotalaria juncea* L. para o MP Cd, por meio de estudos fisiológicos, e a sua influência na nodulação das espécies. Os experimentos foram realizados sob condições de luz e temperatura naturais, em casa de vegetação. Os dois experimentos tiveram os tratamentos iguais, ou seja, foram utilizadas três concentrações de Cd (0, 25 e 100 μmol L^{-1}) e plantas das duas espécies, com e sem inoculação de estirpes de rizóbio. Foram realizadas análises de crescimento de todas as partes das plantas e também a quantificação de Cd e de nitrogênio total, além da atividade da enzima nitrogenase. Verificou-se que a germinação de feijão-de-porco não foi inibida e a de crotalária foi inibida apenas na maior concentração. De maneira geral, as plantas de feijão-de-porco foram mais afetadas na maior concentração, inclusive a produção de nódulos radiculares. Pelo índice de translocação observou-se que o Cd transloca melhor em concentrações mais baixas nesta espécie. As plantas de crotalária, por sua vez, não apresentaram características de plantas fitoextratoras. Pode-se concluir que as plantas de feijão-de-porco têm maior potencial para a fitoextração que as de crotalária e que a fixação de N_2 pelos nódulos de feijão-de-porco não é afetada pela presença de Cd.

Palavras-chave: *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., *Crotalaria juncea* L., fitorremediação.

ROSSI, Sarita Carneiro. **Physiology of Leguminous with phytoextractor potencial for metal heavy cadmium**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Pós–Graduação – IAC.

ABSTRACT

The contamination of soil with heavy metals (HM) which are toxic to the plants and the animals have been promoted, mainly, by the anthropogenical action. The metal presence as cadmium (Cd) in the soil is, today, a reality. Therefore, there is the necessity of developing techniques of phytoremediation for the degraded soil. One of these techniques is the phytoextraction that involves the use of accumulative plants of HM to remove inorganic pollutants of the environment. The present paper as for objective to determine the phytoextractor potencial of the *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. and *Crotalaria juncea* L. for the HM Cd by means of physiological studies and the influence of this metal in the nodulation of the species. The experiments were conducted under conditions of natural light and temperature, in the greenhouse. The two experiments had the equal tratament, that is, were used three concentrations of Cd (0, 25 and 100 μmol L^{-1}) and plants of the two species inoculated or not with lineages of rhizobia. The parts of the plants had been carried through analyses of growth of all and also the quantification of Cd and total nitrogen, besides the activity of the enzyme nitrogenase. It was verified that the germination of jack bean was not inhibited by the presence of Cd while the germination of crotalaria was inhibited only in the highest concentration. In general, the jack bean plants were more affected in the highest concentration, also the production of nodules. For the translocation index it was observed that the Cd move better in lower concentrations in this species. The crotalaria plants, in turn, did not presente characteristics of phytoextraction plants. It can be concluded that the jack bean plants have greater potential for phytoextraction that of crotalaria. and that the fixation of N_2 in the jack bean nodules is not affected by the presence of Cd.

Key-words: *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., *Crotalaria juncea* L., phytoremediation.

1 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental promovida, principalmente, pela ação antropogênica, tem exercido forte pressão sobre a qualidade dos ecossistemas. A contaminação do solo por metais pesados (MPs) tóxicos às plantas e aos animais tem sido uma constante. Neste sentido, a presença de metais como o cádmio (Cd) no solo é, hoje, uma realidade (KHAN et al., 2000; PAIVA et al., 2002). No Brasil, não existem estatísticas da extensão da contaminação por MPs, mas sabe-se que esta ocorre em todo território nacional (PEREIRA, 2004).

Dentre os MPs, encontram-se elementos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como Fe, Cu, Mo, Mn, Zn e outros considerados úteis ao desenvolvimento como o Ni. Entretanto, outros metais como Cr, Cd, Pb, As e Hg não têm ação biológica conhecida e são considerados tóxicos às plantas (McBRIDE, 1994; MARSCHNER, 2002). Porém, quando ocorrem em elevadas concentrações, podem causar danos ao meio ambiente e à cadeia alimentar. Esses contaminantes podem se concentrar no ar, nas águas subterrâneas e superficiais, no solo, alterando as suas características e as circundantes (ROMEIRO, 2005).

A contaminação do solo por MP é um tema bastante discutido, devido à presença desses elementos em diversos materiais adicionados ao solo como resíduos de mineração e siderurgia, fertilizantes fosfatados e agrotóxicos, corretivos, lodo de esgoto, composto de lixo urbano, deposição atmosférica de emissões industriais, baterias, etc. A preocupação ambiental com relação às áreas onde estes elementos se acumulam tem aumentado e o problema é agravado pela provável absorção pelas plantas e pela introdução na cadeia alimentar (KÄRENLAMPI et al., 2000; ANDRADE, 2001; PAIVA et al., 2002; BARRIQUELO et al., 2003).

O metal Cd está entre os elementos mais tóxicos para os humanos. Pode causar distúrbios nas funções renais e osteoporose (HANSSON et al., 2005) além de enfisemas pulmonares, destruição dos eritrócitos e câncer (GHOSROY et al., 1998).

A remediação de áreas contaminadas é alcançada por inúmeras tecnologias que envolvem processos químicos ou físicos. Dentre estas tecnologias, destacam-se a biorremediação e a fitorremediação (FR) que são opções que promovem a limpeza do local ou removem elementos contaminantes do solo (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Mais recentemente, uma atenção maior tem sido dada ao desenvolvimento da FR para recuperar solos contaminados (SHEN et al., 2002). Embora com algumas variações conceituais, a FR pode ser definida como uma estratégia de biorremediação que consiste em procedimentos que envolvem o emprego de plantas e da microbiota associada a suas raízes e de amenizantes do solo, além de práticas agronômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos ao ecossistema, mantendo as propriedades fisico-químicas do solo (CUNNINGHAM et al., 1996; KHAN et al., 2000; SUSARLA et al., 2002).

O processo conhecido como fitoextração, que é uma técnica de FR, envolve o uso de plantas acumuladoras de MP para removerem poluentes inorgânicos do ambiente (ROBINSON et al., 2003; SALT, 2005).

A planta ideal para a fitoextração de MP deve ser tolerante as suas altas concentrações, acumular grandes quantidades na parte aérea, ter alta taxa de crescimento, produzir muita biomassa e ter sistema radicular abundante (GARBISU & ALKORTA, 2001).

Várias evidências sugerem que os microrganismos do solo possuem mecanismos capazes de alterar a mobilidade do metal contaminante com subseqüentes efeitos no potencial de absorção da raiz. Por exemplo, podem catalizar reações redox, alterando a mobilidade de metais no solo (LASAT, 2002). Por outro lado, existem evidências de que a presença de MP pode alterar, significativamente, as populações de microrganismos do solo, modificando as interações destes com as raízes (GIBBS et al., 2005).

As leguminosas capazes de estabelecer simbiose eficiente com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2) são espécies promissoras em programas de revegetação com leguminosas em solos degradados. O desenvolvimento de trabalhos de revegetação com leguminosas em solos contaminados requer, entre outros fatores, a obtenção de rizóbios tolerantes à toxicidade de MPs (MATSUDA et al., 2002).

O presente trabalho teve por objetivo determinar o potencial fitoextrator das leguminosas *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. e *Crotalaria juncea* L. para o MP Cd por meio de estudos fisiológicos e a influência deste metal na nodulação das espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

A contaminação ambiental por MPs se tornou extensa com o aumento das atividades de mineração e industrial no final do século XIX e início do século XX. Esses contaminantes têm afetado progressivamente mais e mais ecossistemas diferentes devido à ação antropogênica: efluentes industriais, resíduos de lixo, lodo de esgoto, atividades marítimas, uso de fungicidas, depósitos de lixo doméstico, etc (BENAVIDES et al., 2005).

Consideram-se MPs os elementos metálicos, de densidade maior que 5 g cm^{-3}, que possuem a capacidade de exercer efeitos tóxicos em células microbianas e em outras formas de vida (TAN, 2000). Alguns metais como, Rb, Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg e Pb não apresentam uma função essencial em plantas (ANDRADE, 2001). De 90 elementos naturais, 53 são MPs (BENAVIDES et al., 2005).

Os MPs ocorrem naturalmente, constituindo menos de 1% das rochas da crosta terrestre. Eles podem ser liberados pelo intemperismo provenientes de fontes geológicas ou adicionados ao solo pela atividade humana como mineração, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes (CAMARGO et al., 2001).

A presença de MPs, essenciais ou não, na atmosfera, solo e água, em quantidades excessivas pode causar sérios problemas para todos os organismos. Por isso, há a necessidade de se conhecer as interações planta-metal para a segurança do ambiente e também para reduzir os riscos associados à entrada do MP na cadeia alimentar (BENAVIDES et al., 2005).

Os MPs não alteram suas propriedades químicas, apenas variam entre as formas insolúvel e solúvel, sendo esta última ideal para a absorção pelas plantas (ROMEIRO, 2005).

As plantas, quando submetidas a ambientes contaminados por MPs, apresentam uma série de distúrbios fisiológicos e nutricionais. Entre os distúrbios nutricionais têm-se as interferências desses metais sobre a absorção, a translocação e as funções dos nutrientes (PAIVA et al., 2002). Além disso, podem ser encontrados sintomas de senescência, assim como baixas concentrações de clorofila, de carotenóides e de proteínas, diminuição da atividade da fosfatase ácida, da peroxidação de lipídios e da razão de clorofila *a/b* comparadas com plantas não estressadas por metais (OLIVARES,

2003). Podem ocorrer ainda mudanças nos seguintes processos biológicos: fotossíntese, respiração, atividade enzimática e crescimento, resultando em baixa produtividade agrícola (KÄRENLAMPI et al., 2000).

2.2 O Cádmio e sua Fitotoxicidade

O MP Cd situa-se em sétimo lugar na lista dos 20 compostos mais tóxicos existentes na natureza (AL-KEDHAIRY et al., 2001). Sua densidade é de 8,6 g cm^{-3} e são as atividades antropogênicas que liberam as quantidades mais preocupantes no meio ambiente. São elas: mineração, atividades metalúrgicas, queima de combustíveis fósseis, incineração do lixo, adição de pesticidas e fertilizantes fosfatados, uso do lodo de esgoto ou a produção, uso e dejeto de baterias (WAGNER, 1993; LAGRIFFOUL et al., 1998).

Descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco (Zn), este elemento químico pertence ao grupo IIB da tabela periódica, juntamente com o Zn e o mercúrio (Hg). Hoje em dia, a concentração de Cd na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg Kg^{-1} (MATTIAZO-PREZOTTO citado por Patrícia Felipe Cardoso, 2000).

São considerados solos poluídos por Cd aqueles que apresentam concentrações acima de 0,5 mg Kg^{-1} de Cd. Calcula-se que as emissões antropogênicas de Cd se situam em torno de 30.000 toneladas por ano (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLE, 1999).

Segundo Ernest (1996) a biodisponibilidade de MPs no solo é regulada por processos físicos, químicos e biológicos e suas interações. No solo, o Cd apresenta-se, principalmente, na sua forma disponível, trocável, sendo facilmente absorvido pelas plantas causando fitotoxicidade (SOARES et al., 2005). O controle da absorção de Cd pelas plantas depende da sua concentração, do pH, da capacidade de troca catiônica (CTC) e da textura do solo (JAUERT et al., 2002). Para Singh & Soledad (2005), o pH é um dos fatores que mais interferem na disponibilidade dos metais no solo. Conforme Pierangeli et al. (2001), pequenas variações de pH podem causar grandes modificações na disponibilidade de metais.

Se a contaminação do solo irá se tornar ambientalmente tóxica ou não depende de vários fatores: a) das condições físico-químicas do solo como, acidez, umidade, presença de argilas, óxidos de Fe/Mn e matéria orgânica; b) do solo e da hidrologia, que

podem não só diluir o contaminante como também transportar o efeito poluente da sua origem a uma nova área e c) dos componentes microbiano e vegetal do ecossistema que podem absorver e reciclar o metal (STEVENSON, 1986). A toxicidade dos MPs é atribuída à habilidade de se ligarem a enzimas, provocando sua inativação ou mesmo aumentando a atividade de algumas, resultando em alterações na sua função catalítica (PAIVA et al., 2004).

O Cd é um metal extremamente tóxico para os seres vivos. Ele é um poluente muito significante devido às suas toxicidade e solubilidade na água. Diferenças na solubilidade, absorção, transporte e reações químicas desse metal podem levar a diferenças específicas na toxicidade dentro do corpo. Esta toxicidade envolve a neuro, a hepato e a nefrotoxicidade (BENAVIDES et al., 2005). Os MPs acumulam-se facilmente em plantações e, conseqüentemente, nos animais e até humanos pela cadeia alimentar (LIN & LIN, 2005).

O Cd pode afetar as plantas em muitos aspectos: germinação, crescimento, nutrição, fisiologia, etc. Lee & Leustek (1999) sugerem que a presença de altos teores de Cd pode impedir o acúmulo de enzimas necessárias para a desintoxicação das plantas. Além disso, o Cd pode alterar a absorção de minerais pelas plantas, afetar a abertura estomática, a transpiração, a fotossíntese, a permeabilidade da membrana plasmática, a translocação do floema, interferir na absorção, no transporte e uso de Ca, Mg, P, K e água. Todos estes efeitos da fitotoxicidade ao Cd podem aparecer mesmo quando as concentrações forem baixas (BENAVIDES et al., 2005).

Segundo Poschenrieder et al. (1989) o crescimento de plantas superiores em substrato contendo Cd mostra distúrbios no balanço hídrico, afetando a elasticidade da parede celular e inibindo a expansão celular. A redução da biomassa é efeito direto de todas essas transformações sofridas mediante exposição ao Cd.

Peralta et al. (2001) afirmaram que doses altas de Cd podem causar desordens metabólicas e inibição da germinação em várias espécies. Munzuroglu & Geckil (2002) afirmaram também que o Cd reduziu a germinação de sementes de lentilha, mostarda e arroz. Normalmente, o estádio da germinação dentro do ciclo de vida da planta é bem protegido contra vários estresses. Porém, após a inibição de processos de desenvolvimento vegetativos subseqüentes as plantas tornam-se, em geral, sensíveis ao estresse por MPs (LI et al., 2005).

Os efeitos do Cd variam em função do tempo de exposição da planta, sendo muitas vezes, de recuperação impossível dependendo da intensidade da toxicidade

(ROSSI et al., 1998). Quanto maior o tempo de exposição das plantas ao Cd, maiores são os danos sobre seus sistemas metabólicos, incluindo a produção de energia e/ou sobre a síntese de proteínas formadoras do canal iônico através do qual o Cd entra nas células (OLIVEIRA et al., 2001).

Para o Cd causar qualquer efeito tóxico ou fisiológico nas células, ele precisa estar na forma iônica e entrar na célula (NIES, 1999). O Cd entra na raiz através do tecido cortical e pelo espaço apoplástico chega ao xilema, complexado por vários tipos de ligantes (CATALDO et al., 1988). Uma vez dentro da planta, o Cd torna-se relativamente móvel e pode influenciar a nutrição mineral (HERNANDEZ & COOKE, 1997). Na parte aérea, o MP Cd se acumula preferencialmente nas células epidérmicas e no mesófilo, dependendo da espécie em questão. Os tricomas encontrados nas folhas funcionam também como um importante compartimento de acumulação (MARIE-PIERRE et al., 2005). Dentro das células de *Thlaspi caerulescens*, Salt (2005) verificou que há uma desintoxicação dos íons metálicos pela compartimentalização no vacúolo.

O primeiro efeito do Cd na planta é indireto e afeta a abertura dos estômatos, ocasionado pelo aumento do potencial osmótico nas folhas. O Cd também age diretamente nas células-guarda e causa severa inibição do crescimento das raízes que limita a absorção de água e promove o fechamento dos estômatos. Quando a concentração deste metal se torna elevada, há um declínio metabólico com perda da turgidez foliar e fechamento estomatal hidropassivo (SOARES et al., 2005).

Efeitos degenerativos no núcleo celular de tecido foliar de plantas de rabanete submetidas ao Cd foram observados por Vitória et al. (2006). Houve claramente uma intensa degradação e posterior ruptura do envoltório nuclear dessas plantas comparadas com as não tratadas com este MP. Esta ruptura pode ter sido devida ao aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Nas plantas, as ROS são produzidas em reações nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nos peroxissomos, envolvendo enzimas antioxidantes como, por exemplo, a catalase e a superóxido dismutase, que são muito importantes no metabolismo dessas ROS. Já foi demonstrado que o Cd induz a formação de ROS (FORNAZIER et al., 2002a).

Sabe-se que as dicotiledôneas acumulam altas quantidades de Cd em relação às monocotiledôneas (SICHOROVÁ et al., 2005). Estas espécies possuem mecanismos que impedem que esses metais potencialmente tóxicos alcancem a parte aérea por meio das raízes, bombeando os íons metálicos de volta para o solo ou os armazenando em seus compartimentos vacuolares (SALT, 2005).

2.3 Fitorremediação

É definida como uma técnica que utiliza plantas para retirar contaminantes do meio ambiente (ANDRADE, 2005). A FR é uma técnica ainda em desenvolvimento, onde plantas superiores são utilizadas para neutralizar poluentes inorgânicos, orgânicos ou nucleotídeos (TAN, 2000).

Muitas espécies de plantas conseguem absorver MPs através de suas raízes e podem acumulá-los nos tecidos vegetais (ANDRADE, 2005). Essas plantas que conseguem acumular metais em altas concentrações são chamadas de hiperacumuladoras (GRATÃO et al., 2005). Elas são capazes de acumular metais em concentrações 100 vezes maiores que os tipicamente medidos na parte aérea de plantas não acumuladoras (LASAT, 2002; SHEN et al., 2002).

Essa idéia do uso de plantas hiperacumuladoras de MP surgiu com a descoberta de diferentes espécies, geralmente endêmicas de solos naturalmente mineralizados, que acumulavam altas concentrações de metais em sua folhagem (GARBISU & ALKORTA, 2001).

Introduzida em 1983, a FR tornou-se uma tecnologia prática e com maiores vantagens econômicas do que as técnicas de substituição, de solidificação ou de lavagem do solo (CHANEY et al., 2000). Para que a FR ocorra, os contaminantes devem estar ao alcance da zona de raízes das plantas, estarem biodisponíveis e serem biologicamente absorvidos (KHAN et al., 2000).

O uso de plantas que naturalmente acumulam metais e a aplicação da engenharia genética acelerariam o processo de transferência de toda essa tecnologia do laboratório ao campo. É essencial, portanto, investigar e entender como essas plantas funcionam e quais caminhos metabólicos e genes estão envolvidos no processo. As plantas hiperacumuladoras são resistentes aos MPs e capazes de acumular e transportar esses poluentes do solo em altas concentrações. Além disso, precisam ter boa capacidade de absorção, acumulação e biomassa aérea. É preciso notar que as concentrações de metais tóxicos em solos contaminados são centenas de vezes maiores do que as plantas podem tolerar (GRATÃO et al., 2005).

Para se obter sucesso na FR, é necessário conhecer o potencial fitotóxico dos elementos contaminantes nas espécies vegetais com potencial para a introdução em áreas contaminadas (SOARES et al., 2005). Com essa técnica, as propriedades físico-químicas e biológicas do solo são mantidas e a fertilidade e a biodiversidade podem ser

melhoradas. Em contrapartida, são necessárias plantas com alta biomassa. Pode haver uma certa demora no processo de descontaminação e ainda acontecer somente a descontaminação da porção superficial do solo (CITTERIO et al., 2003).

A FR é uma tecnologia barata mas em solos com contaminação muito profunda ou com altas concentrações ela não pode sozinha solucionar o problema e outras técnicas devem ser empregadas (KHAN et al., 2000; ROBINSON et al., 2003; GRATÃO et al., 2005). Mesmo assim, essa tecnologia apresenta uma série de vantagens: permite a reciclagem de metais e produção de madeira; é uma solução permanente; permite a aplicação *in situ*; usa energia solar para realizar os processos; é aplicável a grandes variedades de contaminantes; tem grande aceitação pública e ideal para grandes áreas de solos com contaminação de médias a baixas concentrações ou quando se empregam amenizantes (WATANABE, 1997; ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). É necessário citar também algumas desvantagens: é mais lenta que outras técnicas, depende da sazonalidade para o crescimento vegetal, pode não atingir 100% de remediação, limita-se à camada superficial do solo e o contaminante deve estar na zona radicular, é ineficiente para contaminantes fortemente adsorvidos e pode resultar em bioacumulação em animais (WATANABE, 1997; SUSARLA et al., 2002).

A FR envolve, por ação direta ou indireta e pelo seu estímulo sobre a microbiota rizosférica, a descontaminação por meio da extração ou degradação por diversos processos conceituados como: fitoextração, fitodegradação, fitovolatização e fitoestimulação, além da fitoestabilização (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000; KHAN et al., 2000).

O interesse na fitoextração tem crescido significativamente, seguindo a identificação de plantas hiperacumuladoras de MPs. O entendimento dos mecanismos fisiológicos das plantas na hiperacumulação e sobre a relação entre a absorção de Cd e as características do solo ainda é limitado (YANAI et al., 2005).

A identificação de espécies hiperacumuladoras de metais demonstra que as plantas têm potencial genético para a descontaminação do solo (LASAT, 2002). Existem trabalhos que demonstraram que a presença de um determinado gene regula o potencial de hiperacumulação de Cd em plantas de trigo (HANSSON et al., 2005).

O sucesso da fitoextração, como uma tecnologia de descontaminação, depende de vários fatores incluindo a extensão da área contaminada, a disponibilidade de MPs para as raízes (biodisponibilidade) e o potencial da planta em interceptar, absorver, acumular e tolerar MP na parte aérea. A planta deve ter crescimento rápido, alta

biomassa e ser facilmente colhida. Desta forma, o potencial de uma espécie como fitoextratora depende da interação entre solo, metal e planta (KÄRENLAMPI et al., 2000; LASAT, 2002). A fitoextração oferece benefícios como a manutenção da fertilidade do solo e a grande aceitação pública por ser uma tecnologia "verde", além de ter como fonte de energia a luz solar (KHAN et al., 2000; ROBINSON et al., 2003).

A fitoextração é praticada em várias partes do mundo, entretanto no Brasil, ainda não é explorada por desconhecimento do mercado, falta de capacitação técnica e pelo fato de serem as espécies conhecidas de plantas hiperacumuladoras, em sua maioria, de clima temperado (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

2.4 Nodulação e Metais Pesados

As leguminosas já eram utilizadas pelo homem como alimento e para enriquecimento do solo antes mesmo de se conhecer a habilidade que membros dessa família tinham em se associar com rizóbios e desenvolver nódulos fixadores de nitrogênio atmosférico (N_2) (KERBAUY, 2004). As espécies *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. e *Crotalaria juncea* L., são leguminosas utilizadas para adubação verde, que apresentam simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae, genericamente denominadas rizóbios.

Na associação simbiótica entre leguminosas e rizóbios, as primeiras suprem as bactérias com fotoassimilados, principalmente sacarose, que são fonte de energia para a atividade da nitrogenase, enzima responsável pelo processo de fixação do N_2 em amônio. As bactérias, por sua vez, suprem as plantas com amônio que é, posteriormente, utilizado por estas para a produção de compostos nitrogenados (KERBAUY, 2004).

A importância dos microrganismos do solo é resultado da sua atividade metabólica que, interferindo diretamente nas características e nas propriedades do solo, proporcionam um ambiente adequado ao desenvolvimento das plantas. As bactérias do solo compõem uma microcomunidade essencial ao ecossistema (DORAN & ZEISS, 2000).

Mudanças na composição ou na atividade da comunidade microbiana do solo podem ter efeitos prejudiciais no funcionamento do ecossistema. A contaminação por metais, por exemplo, pode afetar drasticamente o crescimento, o metabolismo e a diferenciação celular dos microrganismos do solo e a reciclagem de nutrientes. Isto ocorre devido à multiplicidade e à variedade de componentes da parede celular e de

outras estruturas externas dos microrganismos que se ligam aos MPs. Os efeitos tóxicos dos MPs nos microrganismos devem-se ao bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas e à desnaturação de proteínas ou à perda de integridade das membranas celulares.

Em termos gerais, é freqüentemente estabelecido que os metais tóxicos afetam os microrganismos em ambientes naturais reduzindo sua biomassa e sua diversidade e enriquecendo ou selecionando uma população resistente, ou seja, a população microbiana é afetada quantitativa e qualitativamente (ANDRADE, 2001).

A força de ligação ou adesão das bactérias às partículas do solo ou à planta pode ser muito importante para o desenvolvimento da tolerância ao metal (ALMÅS et al., 2005). Os microrganismos têm uma alta razão área-volume por causa do seu menor tamanho, o que fornece uma ampla superfície de contato para possível interação com metais encontrados no meio ambiente (LEDIN, 2000).

Algumas características estruturais e bioquímicas conferem aos microrganismos capacidade de sobreviver na presença de concentrações altas de MPs como, por exemplo, paredes celulares impermeáveis a determinados elementos, produção de polissacarídeos extracelulares ou excreção de outros metabólitos que imobilizam o metal potencialmente tóxico (ANDRADE, 2001). Segundo Burnett et al. (2005), as paredes das células bacterianas dispõem de um grande número de diferentes tipos de grupos ativos funcionais de prótons (carboxílico, amino, hidroxil, etc) que são ionizados em função do pH ambiental. A deprotonação desses grupos funcionais confere mudanças eletrostáticas para a periferia da célula e confere, então, características aniônicas à parede celular e a habilidade de ligar-se com os metais removendo-os do meio.

Gadd (1992) define tolerância como a habilidade que os microrganismos têm para competir com os MPs pelos seus mecanismos intrínsecos, por exemplo, manter os MPs fora de suas células por meio das bombas de efluxo. A resistência, por outro lado, é a habilidade que os microrganismos têm de sobreviver na presença de MPs, utilizando mecanismos de desintoxicação produzidos diretamente em resposta aos MPs, por exemplo, transfomando-os em formas inócuas de metal.

Segundo Matsuda et al. (2002), as bactérias do gênero *Rhizobium* são tolerantes ao MP Cd, mesmo em concentrações altas como 60 mg L^{-1}.

2.5 Mecanismos de Tolerância

As respostas das plantas ao excesso de Cd e outros metais não essenciais são diversas, sendo que alguns dos mecanismos no nível celular podem estar envolvidos na desintoxicação e, portanto, na tolerância ao estresse causado pelo excesso de metais. Estes mecanismos têm como principal objetivo evitar a acumulação de concentrações tóxicas em locais sensíveis do interior celular (HALL, 2002).

Há vários mecanismos de defesa da planta ao excesso de Cd como, por exemplo: imobilização, exclusão, síntese de fitoquelatinas, compartimentação, sínteses de proteínas do estresse e produção de etileno (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999).

A primeira barreira ao estresse por Cd é a imobilização que opera principalmente nas raízes, na parede celular e por meio de carboidratos extracelulares (mucilagem, calose, etc) (WAGNER, 1993). Os carboidratos da parede celular das raízes podem adsorver íons metálicos de forma limitada, não sendo totalmente eficazes ao excesso de metais (ERNST, 1996). A importância desse mecanismo pode variar de acordo com a concentração de Cd aplicada e, também, com a espécie envolvida (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999).

A exclusão de íons metálicos por meio da ação da membrana plasmática poderia representar teoricamente o melhor mecanismo de defesa da planta, envolvendo canais de Ca no interior da membrana (RIVETTA et al., 1997). Mesmo assim, os exemplos de exclusão em plantas superiores são bastante reduzidos. A presença de mecanismos específicos de absorção restringindo a entrada de íons tóxicos seria outra forma de exclusão (HALL, 2002).

Uma vez que o Cd entra no citosol, um sistema relacionado com o metabolismo do enxofre é ativado, produzindo importantes agentes complexantes chamados fitoquelatinas, os quais são decisivos na desintoxicação celular e na tolerância ao íon metálico (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999). As fitoquelatinas formam vários complexos com o Cd, os quais quelam o metal evitando a circulação de Cd^{+2} livre no citoplasma (GRILL et al., 1985). Nos últimos anos, as fitoquelatinas estão sendo amplamente estudadas em plantas superiores, particularmente em relação à tolerância ao Cd (COBBET, 2000).

Ácidos carboxílicos, como o cítrico e málico e aminoácidos, como a histidina são quelantes potenciais de MPs. Mesmo que ainda não se tenha demonstrado claramente a relação entre a quantidade de ácido produzido e a exposição ao metal

(CLEMENS, 2001), esses ligantes orgânicos podem desenvolver um papel na desintoxicação e tolerância ao excesso de MPs (HALL, 2002).

Um papel muito importante na desintoxicação e tolerância ao Cd é a compartimentação vacuolar a qual impede a circulação de íons de Cd livres no citosol e os força a entrar numa área limitada (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999). A acumulação do Cd no vacúolo, na forma livre Cd^{+2} ou complexado a fitoquelatinas requer um gasto energético, já que é transportado contra um gradiente de concentração através do tonoplasto por sistemas de antiporte $Cd^{+2}/2H^{+}$ ou de carregadores específicos, no caso das fitoquelatinas (KROTZ et al., 1989).

Outro mecanismo de tolerância é o aumento da expressão das chamadas proteínas de choque térmico que ocorre em resposta a várias condições de estresse, inclusive ao de metais Essas proteínas têm função de proteger as membranas do Cd pois foram encontradas no núcleo, citoplasma e membrana plasmática das células estudadas (HALL, 2002).

O estímulo da produção de etileno induzido pelo Cd foi observado por Mehlhorn (1990) em *Phaseolus vulgaris* e o autor sugeriu que isso possa ser um mecanismo de defesa da planta .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (feijão-de-porco) e *Crotalaria juncea* L. (crotalária) fornecidas pelo Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio dos Grãos e Fibras, do Instituto Agronômico (IAC).

3.2 Condições de Cultivo

Os experimentos foram realizados sob condições de luz e temperatura naturais, em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP - Campinas SP, com as seguintes coordenadas geográficas: 22º 49’ 45’’ S, 47º 06’ 33’’ W e altitude média de 670 m, no período de abril a maio de 2006, para o primeiro

experimento, e de março a junho de 2006 para o segundo. A temperatura média foi de 25ºC e 26ºC, respectivamente, para o primeiro e segundo ensaio.

3.3 Tratamentos

Em ambos os experimentos os tratamentos foram iguais, ou seja, foram utilizadas três concentrações de Cd (0, 25 e 100 μmol L^{-1}) e plantas das duas espécies, com e sem inoculação de estirpes de rizóbio.

Utilizou-se a solução de Hoagland & Arnon (1939) modificada contendo ou não N mineral e com a adição ou não de cloreto de Cd ($CdCl_2.2,5H_2O$) (Anexo I e II).

3.4 Instalação e Realização dos Experimentos

Para o primeiro experimento, sementes das espécies de leguminosas *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (feijão-de-porco) e *Crotalaria juncea* L. (crotalária), previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial a 1% por 5 minutos e lavadas com água destilada, foram colocadas para germinar em vasos plásticos de 500 mL contendo areia lavada e esterilizada em autoclave a 121ºC por 50 minutos.

Foram semeadas 5 sementes de feijão-de-porco e 15 de crotalária por vaso. Nos tratamentos com rizóbio, somente sementes de crotalária foram embebidas previamente à semeadura em suspensão de estirpe de rizóbio (estirpe BR 2001 fornecida pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica – RJ) (VICENT, 1970). Para obtenção da suspensão de rizóbios para crotalária, parte da cultura mantida em meio sólido (tubos "estoque" em meio sólido, conservados em geladeira) foi transferida para erlenmeyers contendo meio de cultura "79" líquido (FRED & WASKMAN, 1928). Os frascos foram colocados no escuro sob agitação constante (agitador Mod. NT712, Nova Técnica). Após 2 ou 3 dias de crescimento a suspensão de rizóbio foi utilizada após determinação do número de células viáveis na cultura de rizóbio (unidades formadoras de colônias - UFC) (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). Este método consiste em inocular diferentes diluições de uma suspensão de *Rhizobium* na superfície de meio sólido, até obter uma contagem de colônias dispersas e isoladas, neste caso, de aproximadamente 10^8 células de rizóbio mL^{-1} de meio líquido. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara asséptica de fluxo laminar (Veco).

Nos tratamentos sem rizóbio, as sementes de feijão-de-porco e crotalária foram embebidas apenas em água destilada.

Após 13 dias do plantio, foi realizado o desbaste mantendo-se uma planta por vaso, para avaliação do desenvolvimento inicial. Selecionaram-se plântulas com alturas semelhantes para manter o mesmo padrão no experimento. As plantas foram regadas uma vez por semana com 100 mL de solução nutritiva de Hoagland modificada (Anexo 1) Nos tratamentos com rizóbio, as plantas receberam solução nutritiva sem acréscimo de nitrogênio (Anexo 2). Após o desbaste, foram adicionados aos vasos mais 2 mL de suspensão de rizóbio.

As plantas permaneceram nos vasos até o final do experimento, 30 dias após o desbaste. Quando necessário, as plantas foram regadas com água de torneira.

Para o segundo experimento, a semeadura foi feita em bandejas plásticas contendo vermiculita lavada com sementes previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial a 1% por 5 minutos e lavadas com água destilada. Uma semana após a semeadura (após a emissão da folha primária), as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2 L, com areia previamente lavada e autoclavada. Para seguir um mesmo padrão, escolheram-se plântulas de mesmo tamanho. Todos os tratamentos receberam rizóbio. As plantas tiveram suas raízes imersas em uma suspensão de rizóbio (crotalária- estirpe BR 2001 fornecida pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica – RJ e feijão-de-porco- estirpe SEMIA 6158 fornecida pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária –FEPAGRO- Porto Alegre - RS) por dois minutos, antes de serem colocadas nos vasos. O preparo das suspensões de rizóbio seguiu como descrito anteriormente.

A irrigação com 100 mL de solução nutritiva foi realizada uma vez por semana. No primeiro experimento, o Cd foi adicionado desde a semeadura das sementes nas concentrações de 0, 25 e 100 μmol L^{-1} . Para o segundo experimento, o Cd foi colocado no primeiro dia do transplantio nas concentrações de 0, 25 e 100 μmol L^{-1}, na forma de $CdCl_2.2,5H_2O$ diluído em solução nutritiva. Quando necessário, regou-se as plantas com água de torneira.

As plantas permaneceram nos vasos até o momento da coleta, 35 dias após o transplantio para o feijão-de-porco e 42 dias para a crotalária.

3.5 Medidas de Crescimento

Todas as medidas de crescimento foram realizadas no final dos experimentos. As medições da altura e do número de folhas visíveis foram feitas antes da separação das plantas em lâminas foliares, caule + pecíolos, raízes,cotilédones e nódulos. Após a determinação da área foliar com o equipamento Model L. I 3.100 – Área Meter-SR nº LAM 1018, Licor – USA, todo o material foi colocado em estufa para secagem a 60ºC por 72 horas. A seguir, foi determinada a matéria seca (MS) por pesagem e feita a moagem de raízes, caules, folhas e nódulos para as outras determinações.

3.6 Determinação das Trocas Gasosas

As trocas gasosas foram determinadas no folíolo central do primeiro trifólio completamente expandido, da base para o ápice das plantas de feijão-de-porco do segundo experimento no período da manhã a partir das 8:00 hs. Devido ao reduzido tamanho dos folíolos de crotalária, insuficientes para completar a câmara do aparelho, estas medidas não foram realizadas com esta espécie. A característica avaliada foi a fotossíntese líquida (*A*) determinada pela taxa de absorção de CO_2 durante o processo fotossintético. Quando mais CO_2 é consumido na fotossíntese do que é liberado pela respiração, simultaneamente, o processo recebe o nome de assimilação aparente ou fotossíntese líquida. Essas medidas foram tomadas em sistema fechado (câmara de crescimento), com temperatura e luminosidade controladas, com um analisador de gases a infravermelho portátil, IRGA (Infra Red Gas Analyser, Li 6200, Licor).

3.7 Determinação do Potencial Hídrico Foliar

O potencial hídrico foliar foi medido por meio da câmara de pressão (Plant Moisture Stress, PMS Instruments) apenas nas plantas de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C (feijão-de-porco) no segundo experimento devido ao reduzido tamanho das folhas da espécie *Crotalaria juncea* L.. O potencial hídrico foliar mediu o estado hídrico da folha com a reversão do fluxo de seiva bruta no xilema do pecíolo, após o corte da folha. A pressão usada para a reversão da seiva é igual ao valor do potencial hídrico foliar.

3.8 Determinação dos Teores de Clorofila

As mesmas folhas utilizadas para as avaliações da fotossíntese em feijão-de-porco e as folhas mais jovens de crotalária do segundo experimento foram usadas para a extração de pigmentos, segundo Hiscox & Israelstam (1979). Foram coletados 6 discos foliares (0,64 cm^2/por disco), dos quais 3 foram imersos em 5 mL de DMSO (Dimethyl sulfoxide), em tubos de ensaio vedados e colocados no escuro. Os outros 3 discos coletados foram colocados em estufa para secagem a 60ºC por 48 horas e posteriormente pesados para determinação da massa da matéria seca. Após 24 horas, foram determinadas as leituras da densidade ótica das soluções contidas nos tubos, a 645 e 663 nm. Os teores de clorofila foram expressos em mg g^{-1} MS (matéria seca) e calculados de acordo com as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a = V \times \frac{(12{,}7 \times A663 - 2{,}69 \times A645)}{1000 \times MS}$$

$$\text{Clorofila } b = V \times \frac{(22{,}9 \times A645 - 4{,}68 \times A663)}{1000 \times MS}$$

$$\text{Clorofila total} = V \times \frac{(20{,}2 \times A645 + 8{,}02 \times A663)}{1000 \times MS}$$

3.9 Determinação da Atividade Específica da Nitrogenase

Para avaliar a eficiência das bactérias na fixação de N_2, foi realizada a determinação da atividade específica da enzima nitrogenase (N_2ase) no segundo experimento utilizando-se a técnica de redução de acetileno (ARA), por cromatografia gasosa (HARDY et al., 1968).

As raízes das plantas foram destacadas, lavadas e acondicionadas em frascos com capacidade de 280 mL fechados hermeticamente com uma tampa de borracha e 10% da atmosfera do interior do frasco foi retirada com seringa e o mesmo volume foi preenchido com acetileno. Após 30 minutos de incubação, amostras de 0,5 mL de ar foram retiradas dos frascos para dosagem da quantidade de etileno liberada. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, série GC-14B) com

detector de ionização de chama e coluna de aço inoxidável de 1,5 m e 1/8" com fase sólida constituída de Hayesep T. O gás de arraste utilizado foi o N_2, a um fluxo de 20 mL minuto^{-1}. As temperaturas do aparelho foram as seguintes: 80ºC (coluna), 110ºC (injetor) e 150ºC (detector). Como padrões foram utilizados etileno (500 µmol L^{-1}) e acetileno (puro), ambos fornecidos pela White Martins. As avaliações quantitativas do etileno liberado no interior dos frascos foram feitas a partir da comparação com o padrão de etileno e os dados transformados em ηmoles de etileno liberado mg^{-1} de matéria fresca de nódulos.

3.10 Determinação de Nitrogênio Total no Tecido

Amostras de 0,1 g de material vegetal seco a 60ºC (folhas e raízes do segundo experimento) foram transferidas para tubos de digestão (tipo Folin-Wu), contendo 1 g de mistura digestora (1000g de K_2SO_4 + 100g de $CuSO_4.5H_2O$ + 10g de Se), 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os tubos foram colocados em um bloco digestor e aquecidos lentamente até a temperatura de 360ºC, onde as amostras foram digeridas ao ponto de ebulição da mistura, até a obtenção de um extrato esverdeado. Após esse ponto, deixou-se em ebulição por mais 60 minutos. Os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e ao conteúdo adicionaram-se 5 mL de água MilliQ. O conteúdo de cada tubo foi usado na dosagem de nitrogênio, segundo o método de Kjeldahl (BREMNER, 1965).

3.11 Determinação dos Teores de Cádmio

Para a digestão do substrato e das partes das plantas (raiz, caule e folhasdo segundo experimento), utilizaram-se os métodos de via úmida e de via seca respectivamente, para determinação do Cd por absorção atômica.

Para a via úmida, foram pesados 2 g do substrato (areia) e colocados em tubos para digestão. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido nítrico e os tubos foram aquecidos a 120ºC por duas horas em chapa elétrica. Depois do aquecimento, completou-se o volume para 50 mL com água deionizada. A posterior filtragem foi realizada em papel de filtragem rápida faixa preta segundo Abreu (1997) modificado.

Para a via seca, foi pesado 1 g do material vegetal seco e moído. Em seguida, as amostras foram colocadas em mufla a 500ºC por duas horas e meia para incineração.

Após o resfriamento, adicionaram-se 2 mL de ácido clorídrico 6 N. As amostras foram colocadas na chapa elétrica a 50ºC por uma hora e meia, até ocorrer a evaporação. Adicionaram-se mais 10 mL de ácido clorídrico 2 N e aqueceu-se por mais 5 min. Foram realizadas duas filtragens que foram feitas em papel de filtragem rápida faixa preta, sendo que entre uma e outra, mais 10 mL do ácido nítrico 2 N foram adicionados. Os balões volumétricos utilizados foram completados com água deionizada aquecida para o volume de 25 mL, baseado em Abreu modificado (1997).

3.12 Cálculo do Índice de Translocação

O índice de translocação (IT) foi calculado baseado na quantidade acumulada de Cd na planta, de acordo com Abichequer & Bohnen (1998), pela seguinte equação:

$$IT = \frac{\text{Teor de Cd na parte aérea (folhas + caule)}}{\text{Teor de Cd na planta}} \times 100$$

3.13 Cálculo do Índice de Produção Relativa

O índice de produção relativa, que traduz a influência do metal na variação de produção de matéria seca da planta, foi calculado segundo a equação:

$$PR\% = \frac{\text{matéria seca produzida com a dose do metal}}{\text{matéria seca produzida na ausência do metal}} \times 100$$

3.14 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Cada vaso constituiu uma repetição, sendo 7 repetições para cada tratamento e para cada espécie, dispostas em delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância (teste F) e foram realizadas análises de regressão polinomial (linear e quadrática) para a comparação entre os níveis de concentrações de Cd.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Feijão-de-Porco

No primeiro experimento, as sementes de feijão-de-porco apresentaram um atraso na velocidade de emergência na maior concentração de Cd utilizada (100 μmol L^{-1}) (Figura 1). Porém, a partir do décimo dia, em todas as concentrações, a porcentagem de germinação ficou próxima de 100%. Munzuroglu & Geckil (2002), empregando concentrações entre 0,5 e 0,8 mM de Cd, sendo esta última semelhante à maior concentração utilizada neste trabalho, observaram que a porcentagem de germinação de sementes de pepino e de trigo diminuiu conforme as concentrações de Cd para germinação do que as espécies acima citadas.

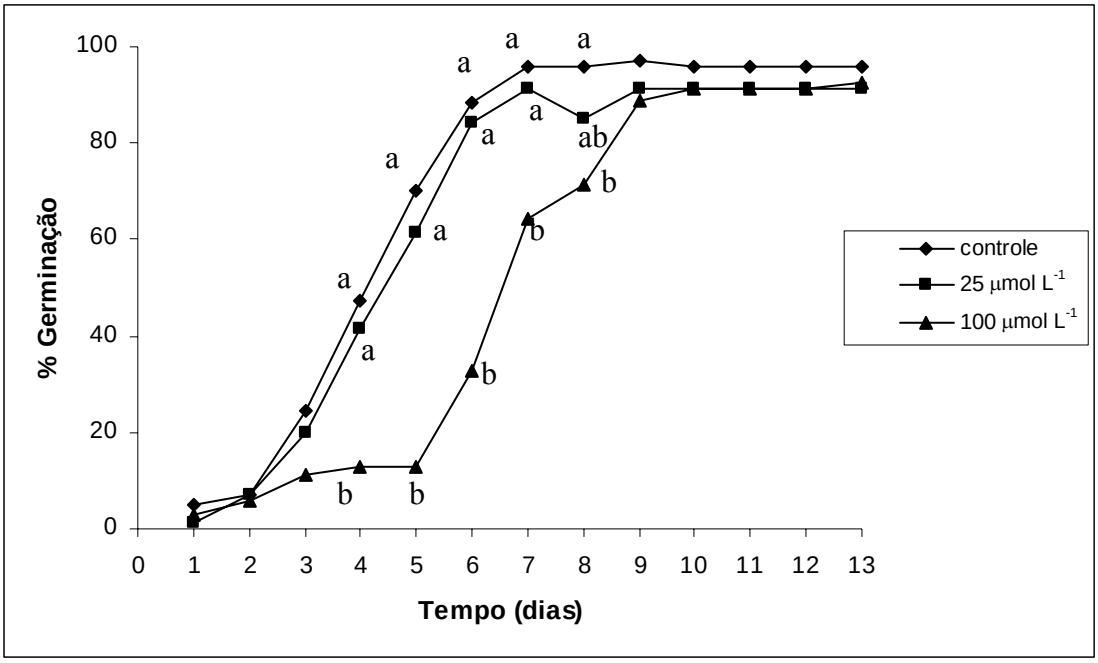


Figura 1 - Porcentagem de emergência de sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. em função do tempo após plantio, submetidas a diferentes concentrações de cádmio (μmol L^{-1}) sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Dados transformados arco seno √x.

Após a germinação, no desenvolvimento inicial das plantas, tanto a altura como o número de folhas diminuíram linearmente com o aumento das concentrações

utilizadas (Figuras 2 A, B). A área foliar diminuiu exponencialmente em função do aumento das concentrações de Cd (Figura 3). O crescimento de espécies de eucalipto também foi reduzido com o aumento das concentrações de Cd (SOARES et al., 2005) e plantas de cevada expostas a este metal também sofreram uma redução no crescimento, segundo Guo et al. (2006). Poschenrieder et al. (1989) afirmaram que as plantas de feijão são altamente sensíveis ao Cd, no entanto, Andrade (2005) verificaram que, mesmo com a adição de Cd, na concentração de 5 μmol L^{-1} o crescimento do feijão-de-porco não foi afetado e não foi observada clorose nas folhas.

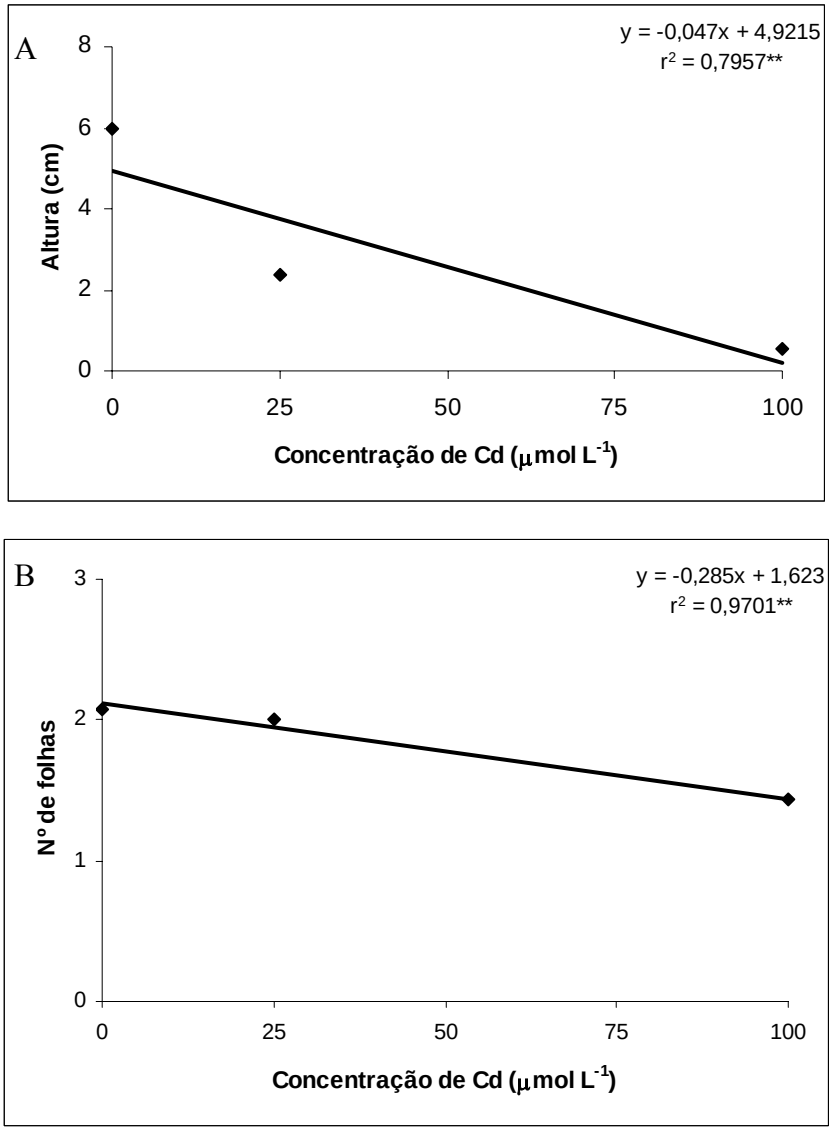


Figura 2 – Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Transformação √x para dados de número de folhas.

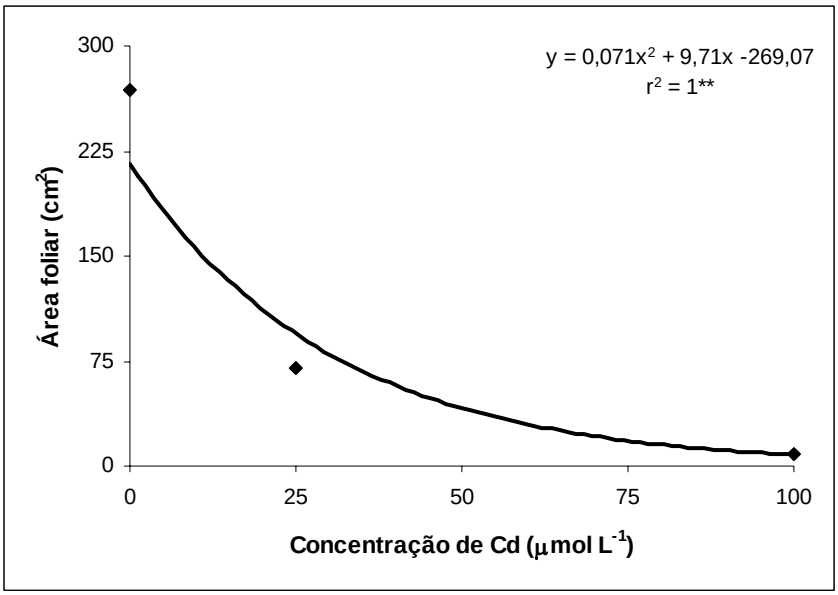


Figura 3 – Área foliar de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

As plantas que receberam Cd na solução nutritiva (25 e 100 µmol L^{-1}) permaneceram com os cotilédones bem verdes, ou seja, não usaram as reservas e a massa da matéria seca dos cotilédones aumentou com a concentração do metal na solução, enquanto que as plantas controle (sem adição de Cd) utilizaram-se das reservas cotiledonares para seu crescimento (Figura 4). Este fato contrasta com os resultados de Rossi et al. (1998), os quais verificaram em plantas de feijão que na presença de Cd nas concentrações de 10 e 200 µmol L^{-1}, houve um aumento no consumo das reservas cotiledonares.

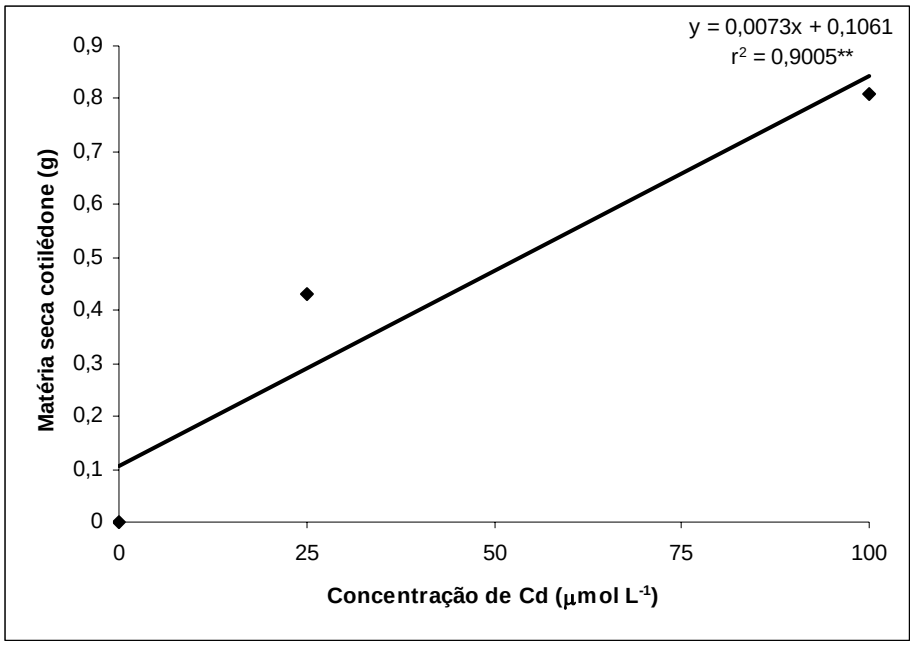


Figura 4 – Matéria seca dos cotilédones de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

O efeito da adição de Cd foi evidente na produção de matéria seca das raízes e caules, mas, principalmente, nas raízes (Figura 5 A e B), que apresentaram sinais claros de toxicidade (atrofia e escurecimento) (Figura 6). Oliveira et al. (2001) observaram os mesmos sintomas em plantas de aguapé na dose de 5 μmol de Cd. Segundo os autores, esses sintomas podem ser resultados de alguma alteração no metabolismo da planta ou mesmo da acumulação do MP nas raízes.

A massa da matéria seca das folhas não variou significativamente com a dose de Cd adicionada à solução (dados não apresentados), entretanto, algumas folhas de plantas tratadas com o metal apresentaram clorose (Figura 7).

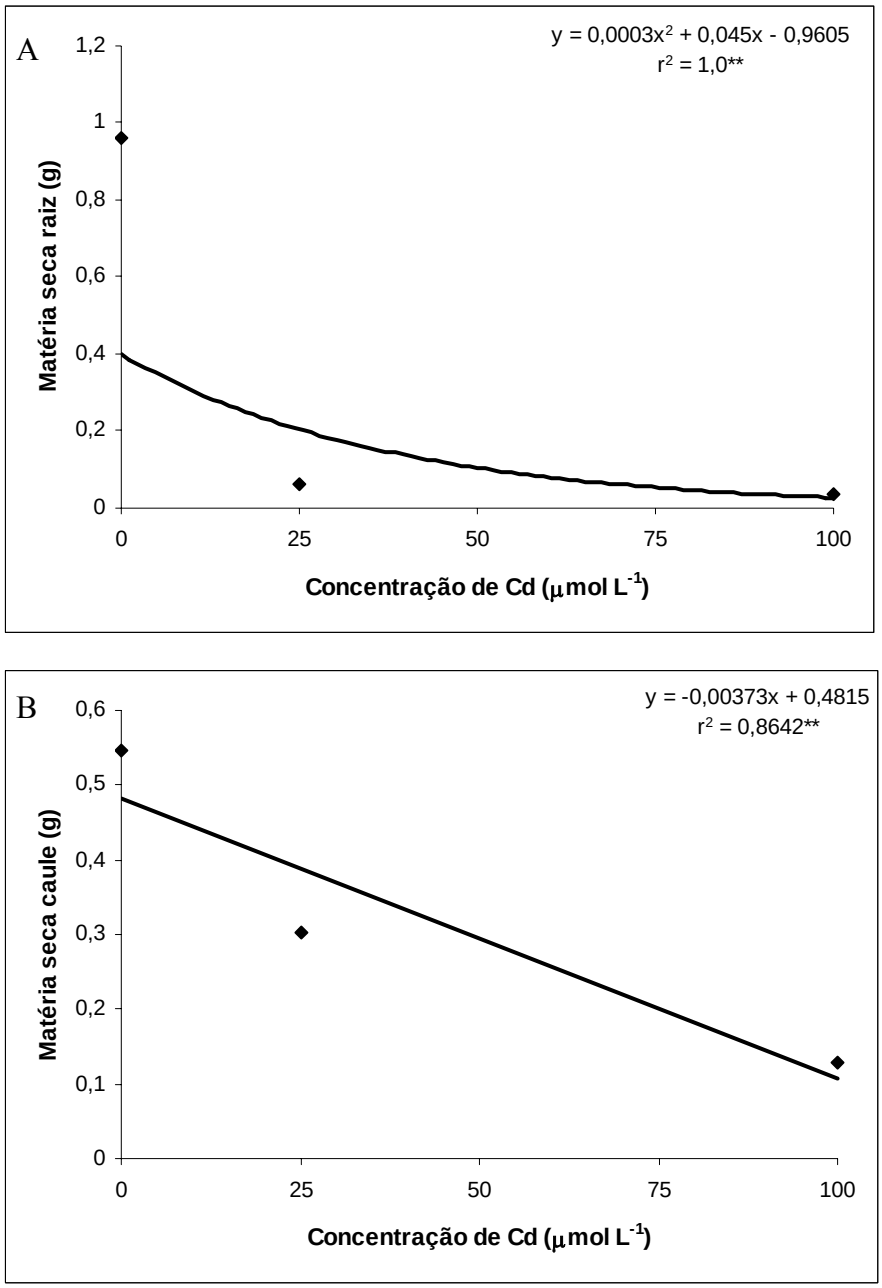


Figura 5 – Matéria seca da raiz (A) e do caule (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

Figura 6 – Plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Nota-se diferença no tamanho das raízes e sua coloração e tamanho das folhas conforme as concentrações de Cd aumentaram.

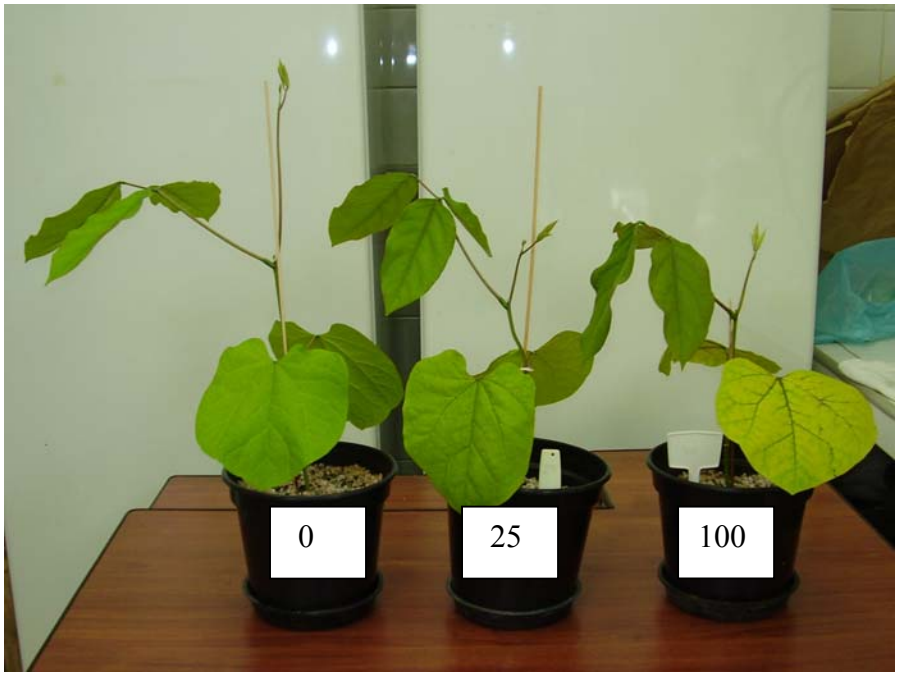


Figura 7 – Plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Nota-se acentuada clorose na maior concentração do MP.

No segundo experimento, exceto a massa da matéria seca das raízes que não apresentou ajuste significativo (dados não apresentados), o número de folhas, a área foliar, a altura e as matérias secas de caules e folhas, sofreram uma diminuição conforme as concentrações de Cd aumentaram (Figuras 8; 9 A, B e 10 A, B). O Cd pode reduzir o crescimento de caules devido à supressão do alongamento das células (SANITÀ DI TOPPI & GABRIELLI, 1999).

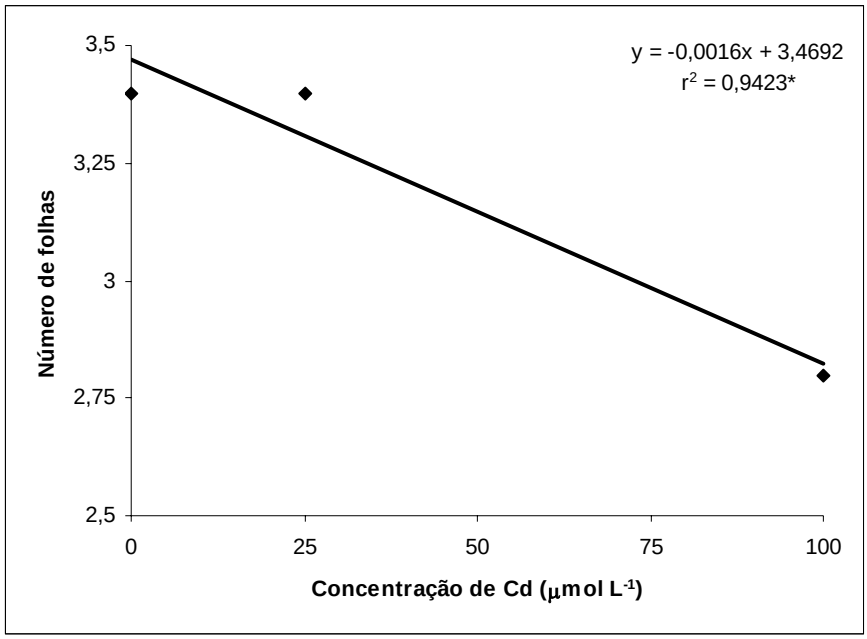


Figura 8 - Número de folhas de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%. Dados transformados √x.

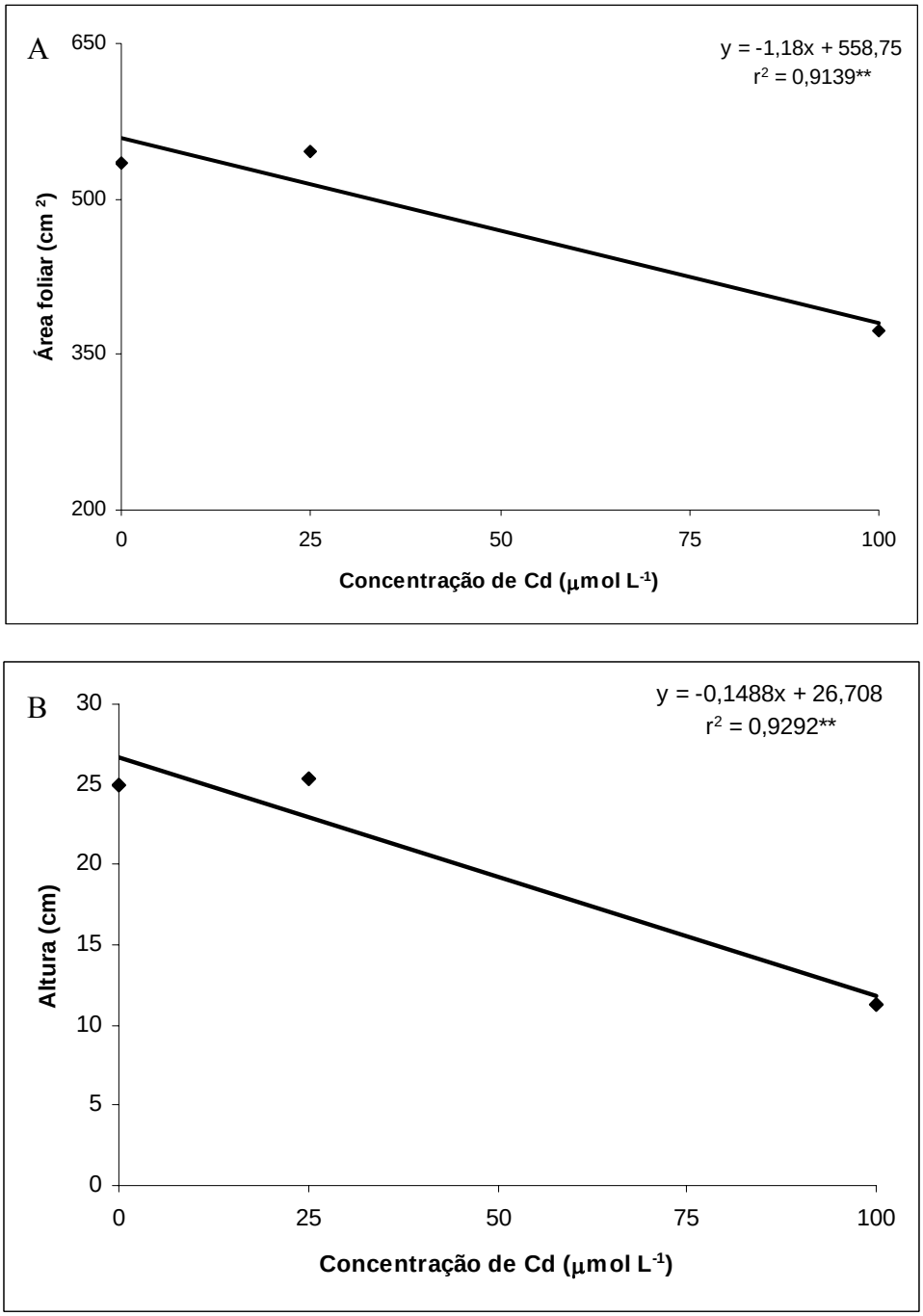


Figura 9 – Área foliar (A) e altura (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

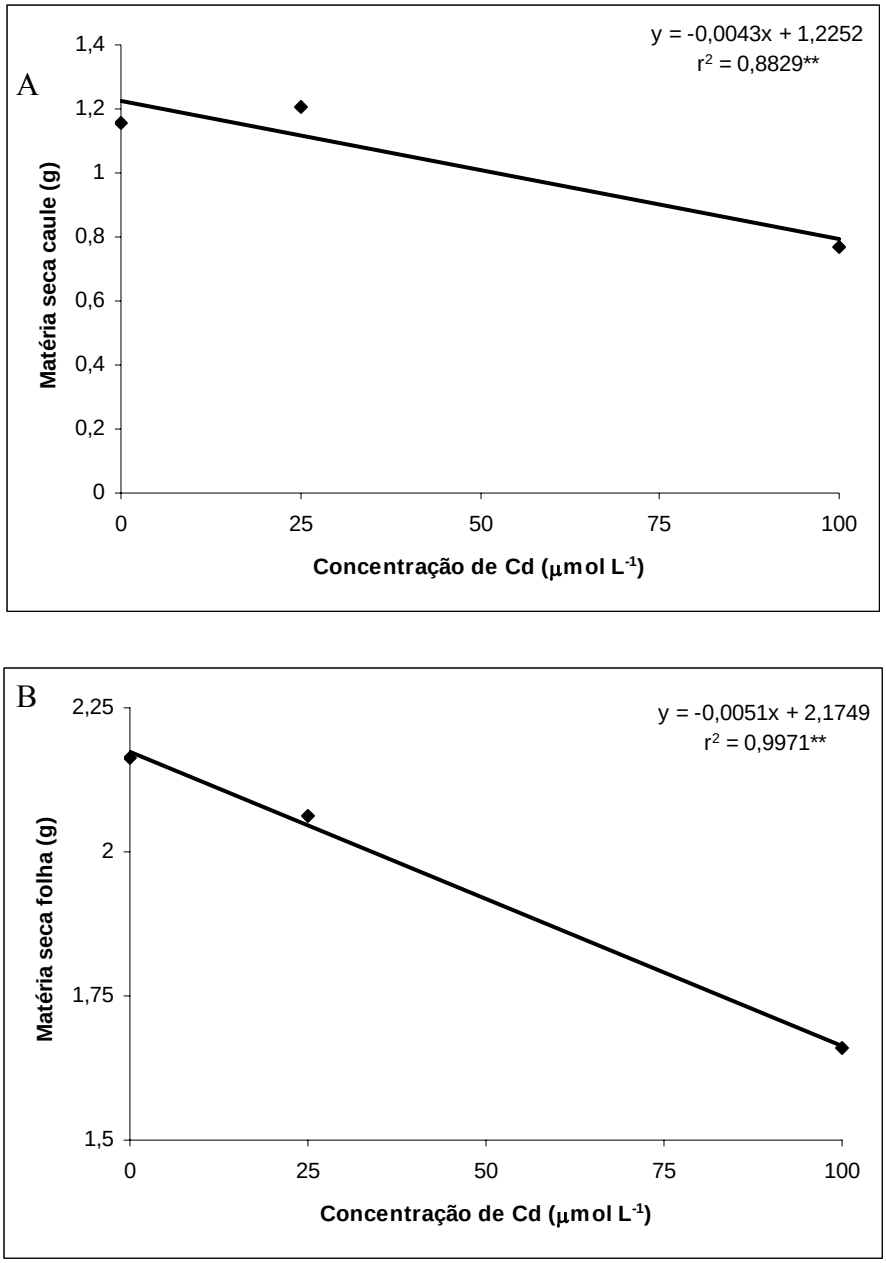


Figura 10 - Massa da matéria seca do caule (A) e da folha (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

Em relação à fotossíntese, houve diminuição da taxa de absorção de CO_2 das plantas com o aumento da concentração de Cd na solução (Figura 11). O mesmo foi observado em plantas de soja, na presença de Cd nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3 mM, por El-Shintinawy (1999). A presença de Cd pode reduzir a taxa de absorção de CO_2 devido a alterações provocadas nas funções dos estômatos, no transporte de elétrons e no ciclo de Calvin. O Cd também pode causar desordens na estrutura dos grana dos cloroplastos e na síntese de clorofila (BARCELÓ et al., 1988).

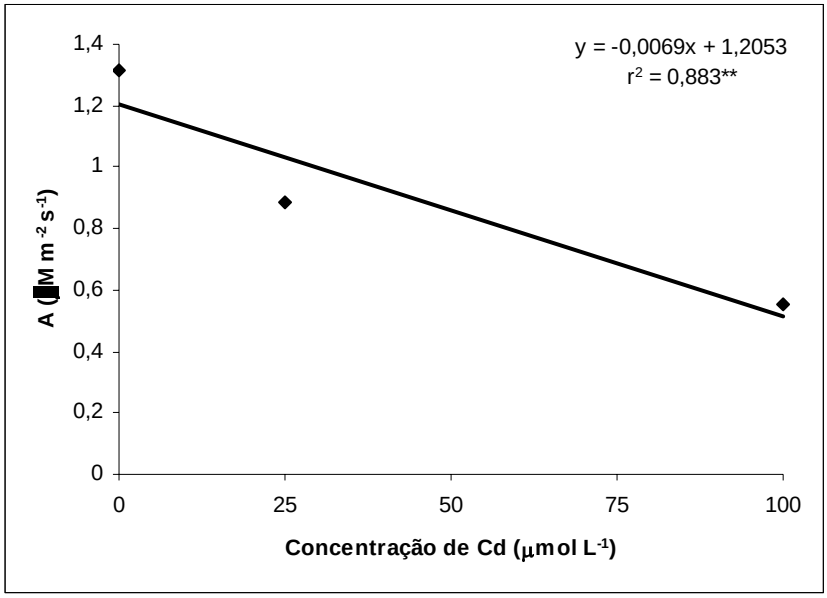


Figura 11 – Taxa de absorção de CO_2 (A) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

O teor de clorofila total das plantas de feijão-de-porco diminuiu com o aumento nas concentrações de Cd na solução (Figura 12). Como descrito anteriormente, um dos efeitos do Cd nas plantas é a alteração da biossíntese de clorofila (VITÓRIA et al., 2003). A conseqüência dessa redução causou a clorose nas folhas das plantas. Essa clorose pode ter sido provocada pela competição de Cd com o Fe pelos sítios de adsorção na membrana plasmática (SIEDLECKA & KRUPA, 1999). Os teores de clorofila *a* e *b* das plantas não variaram significativamente com a dose de Cd adicionada (dados não apresentados).

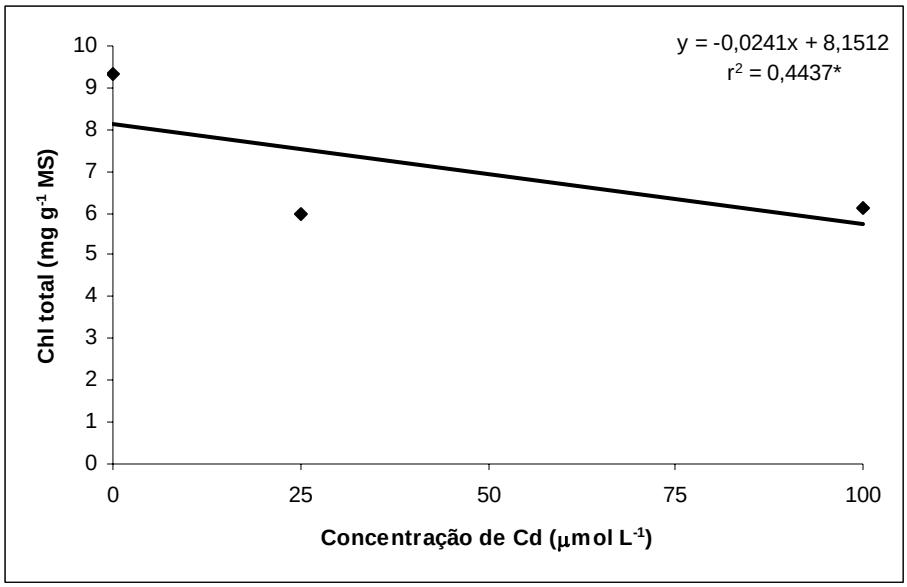


Figura 12 – Teor de clorofila total de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.

O potencial hídrico das plantas também diminuiu com o aumento das concentrações de Cd (Figura 13). Prasad (1995) relatou que a absorção de água em plantas de feijão diminuía devido à adição de Cd na concentração de 3µM.

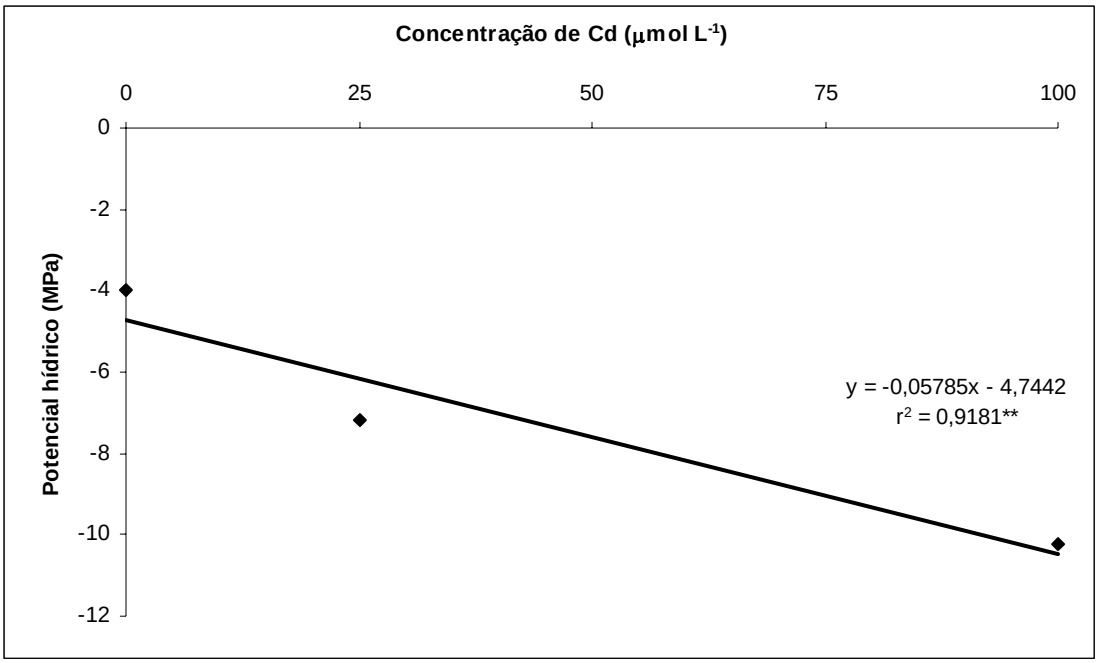


Figura 13 – Potencial hídrico de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

A formação de nódulos nas raízes das plantas foi afetada, sendo que o número de nódulos diminuiu com o aumento nas concentrações de Cd aplicadas (Figura 14). Os nódulos apresentaram coloração interna avermelhada, o que indicou a presença de leghemoglobina e conseqüente fixação ativa de N_2. Chen et al., (2003) verificaram que conforme as concentrações de Cd aumentaram (20 a 100 mg L^{-1}) a nodulação diminuiu acentuadamente, chegando a ser totalmente inibida, além dos nódulos apresentarem coloração interna branca. A ausência de nodulação pode ser devido a uma inibição do processo infeccioso levando a não formação dos nódulos (ZORNOZA et al., 2002).

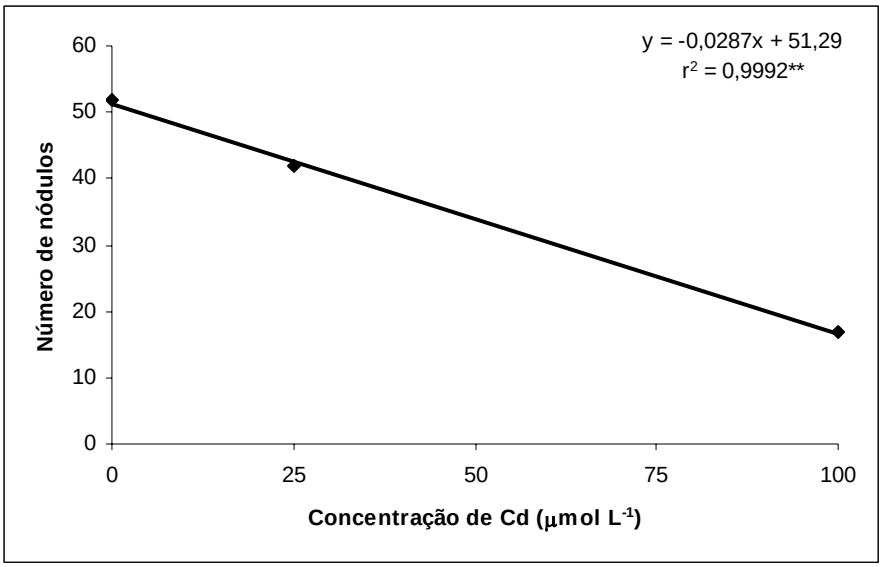


Figura 14 – Número de nódulos por plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Dados transformados √x.

Em relação ao teor de nitrogênio nas diferentes partes da planta, houve aumento dos teores de N na folha e no caule com o aumento nas concentrações de Cd na solução (Figura 15 A, B). O teor de N da raiz e o acúmulo de nitrogênio por planta não variaram significativamente com a concentração de Cd aplicada (dados não apresentados). Portanto, pode ter ocorrido um certo efeito de diluição/concentração do N na planta, oriundo da fixação biológica do N_2 pelo rizóbio inoculado, já que o N não foi fornecido pela solução nutritiva.

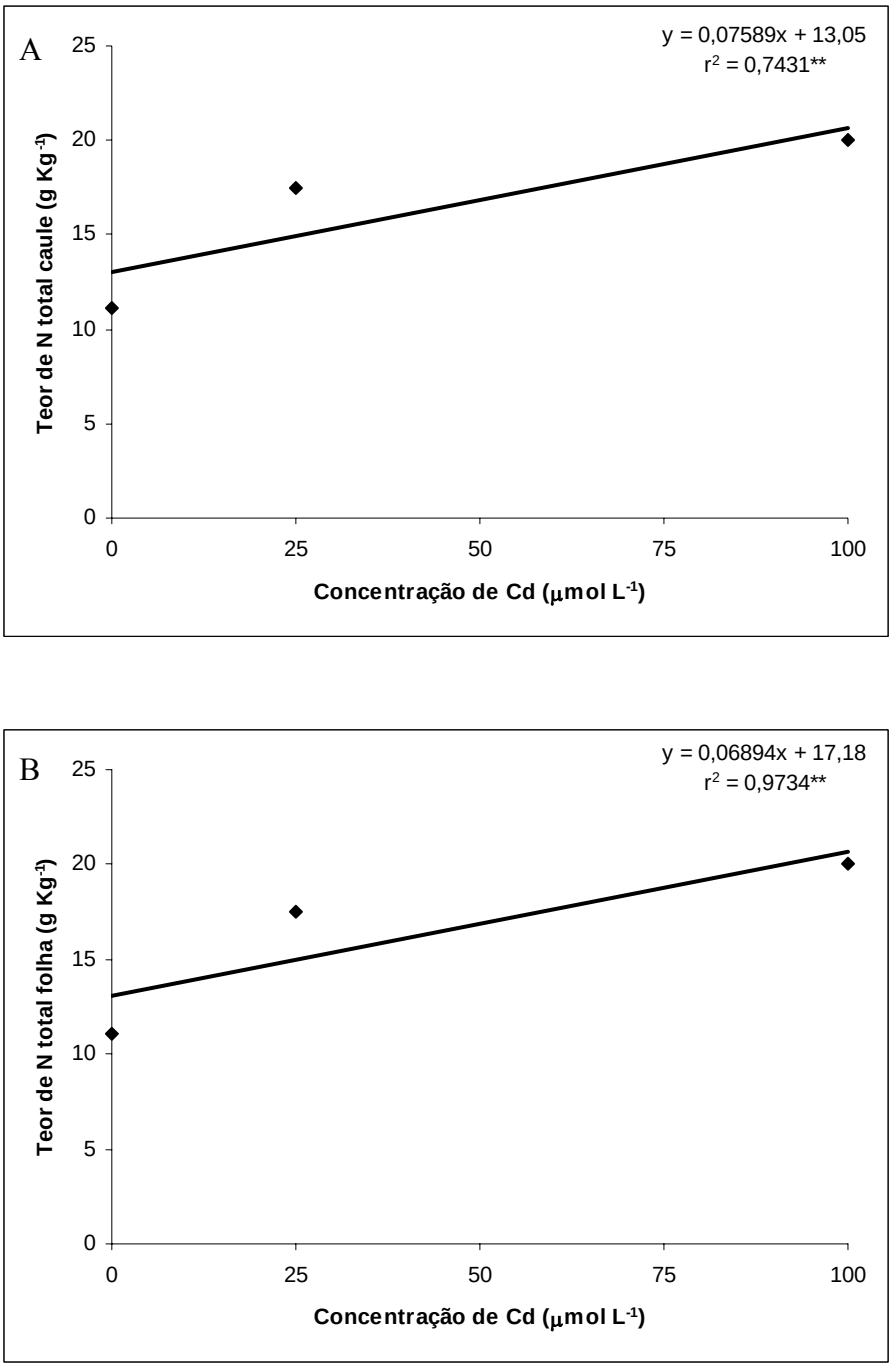


Figura 15 – Teor de nitrogênio total nos caules (A) e nas folhas (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

Esses resultados contrastam com os de Chen et al (2003) que verificaram uma diminuição na fixação do N_2 em plantas de soja nas maiores concentrações (100 e 60 mg L^{-1}) apesar de no início do experimento ter aumentado nas concentrações menores (20 e 40 mg L^{-1}). Entretanto, Wu et al. (2006), inoculando rizobactérias na presença de

Brassica juncea expostas ao Cd, verificaram um aumento no conteúdo de nitrogênio total na planta. Esse aumento pode ser atribuído ao melhor desenvolvimento radicular induzido pela inoculação das bactérias.

A atividade específica da nitrogenase aumentou conforme as concentrações de Cd aumentaram (Figura 16), resultando em uma maior disponibilidade de amônio para a planta, tanto que o teor de nitrogênio total foi maior nos caules e nas folhas (Figura 15).

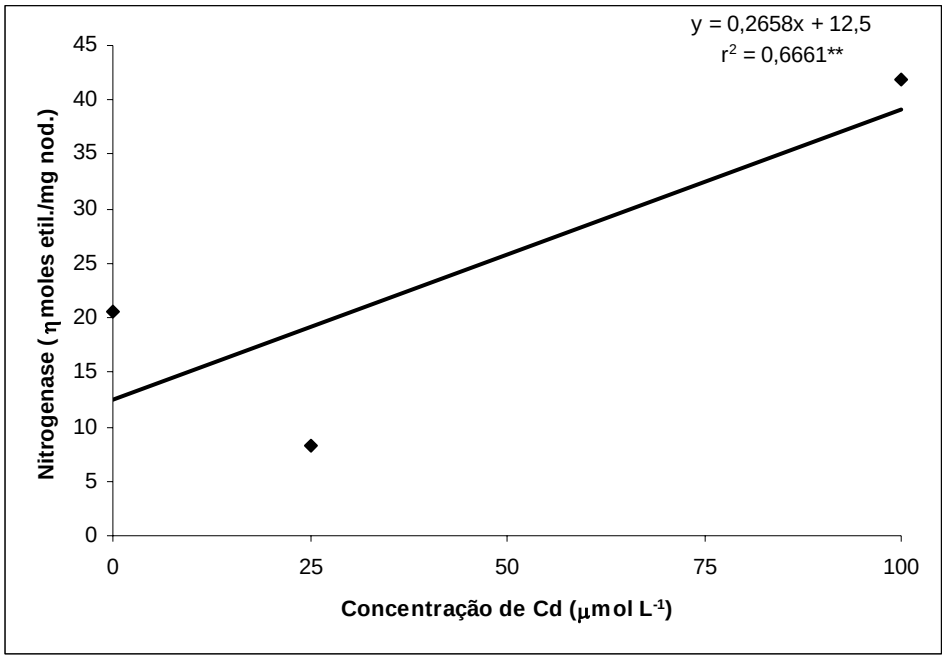


Figura 16 – Atividade da nitrogenase em plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

Gaulke et al. (2006) também verificaram esse aumento na atividade da enzima nitrogenase em plantas de *Alnus rubra*, que nodula com *Frankia*, na presença de MPs, inclusive o Cd.

Apesar da diminuição do número de nódulos observada em feijão-de-porco na presença de Cd, pelos dados acima infere-se que esses nódulos estavam mais ativos. Conclui-se que o Cd não afetou a atividade dos rizóbios desta espécie.

O índice de produção relativa para a concentração de 25 μmol L^{-1} foi de 98,53% e para a maior concentração foi de 74,93%. O Cd afetou pouco a produção de matéria seca das plantas de feijão-de-porco, provocando uma inbição de 27,05% na concentração de 100 μmol L^{-1}. Como a massa verde produzida por essa espécie é bem

alta, mesmo com a redução observada pode-se concluir que não houve um grande impacto do Cd no desenvolvimento das plantas, com vistas ao uso do feijão-de-porco na fitoextração.

Os teores de Cd nas raízes das plantas de feijão-de-porco aumentaram em função do aumento na concentração de Cd na solução, enquanto que na parte aérea, as duas concentrações aplicadas apresentaram iguais teores de Cd (Figura 17 A, B).

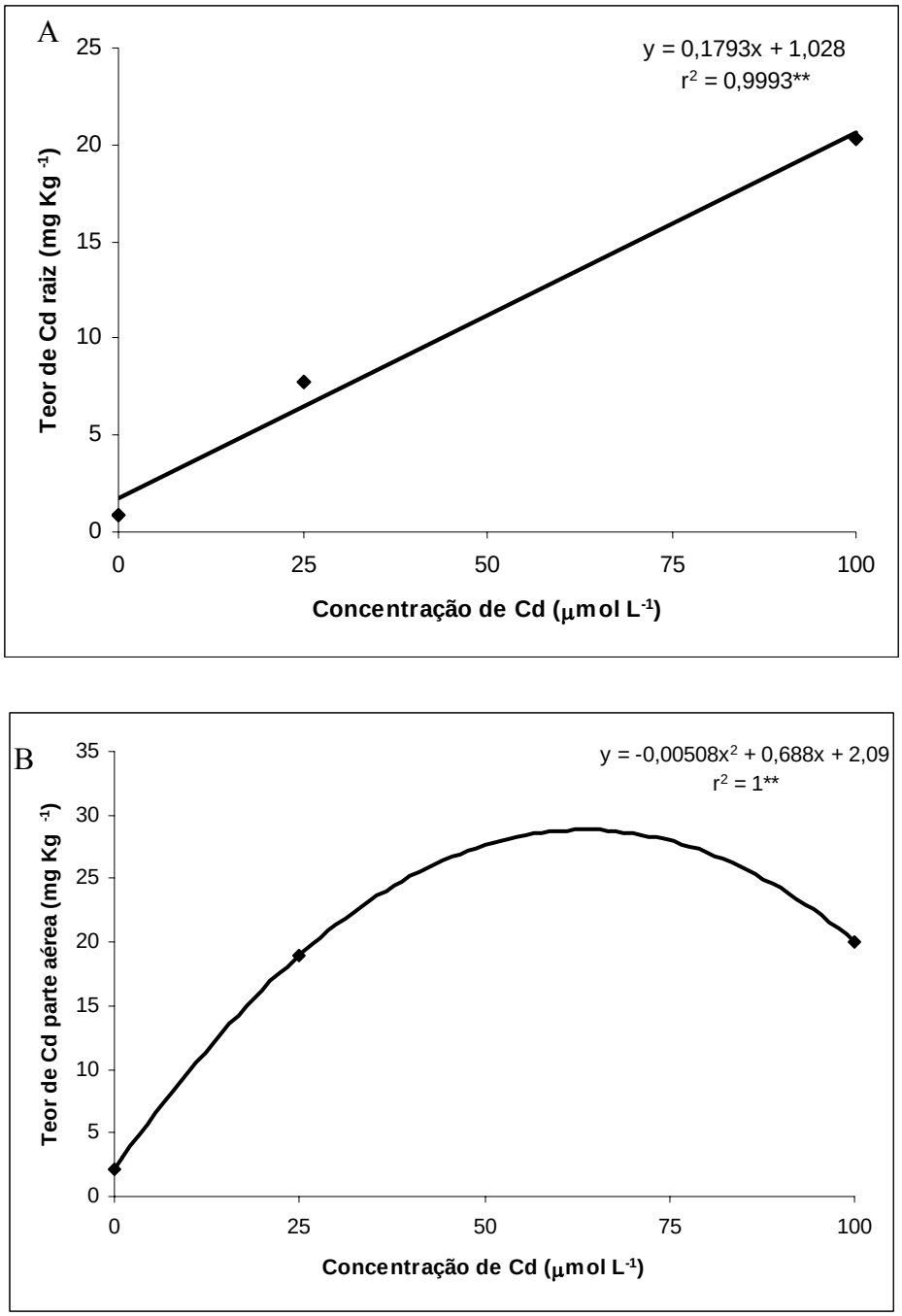


Figura 17 – Teor de cádmio nas raízes (A) e parte aérea (B) de plantas de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

O acúmulo de Cd na parte aérea também aumentou com o aumento na concentração de Cd (Figura 18).

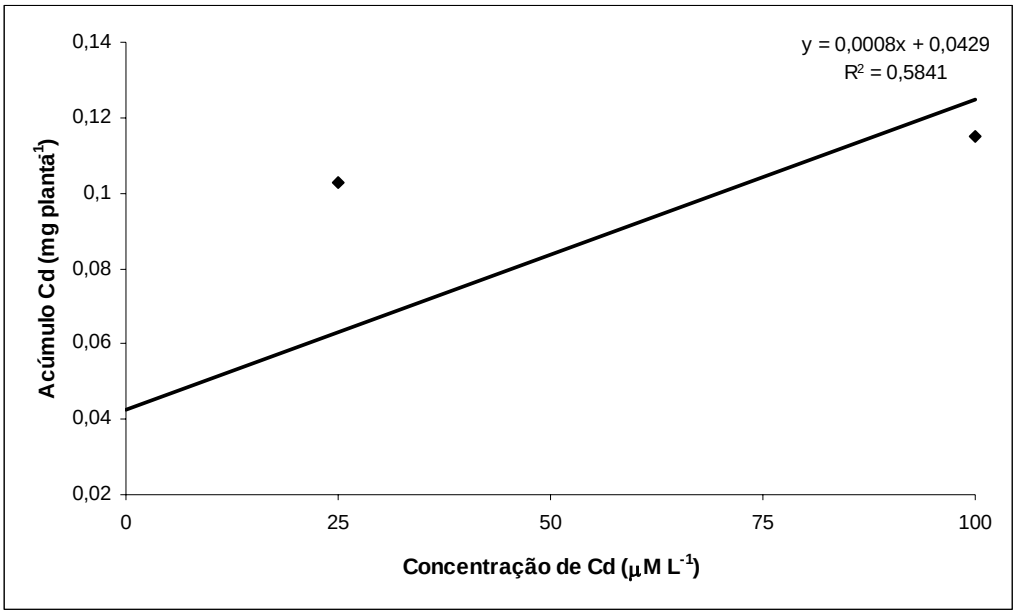


Figura 18 – Acúmulo de cádmio por planta de *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

O índice de translocação (IT) do Cd para o feijão-de-porco foi de 68,9% para a concentração de 25 μmol L^{-1} e de 48,0% para a concentração de 100 μmol L^{-1}. Isso demonstra que na menor concentração, o Cd se move mais facilmente para a parte aérea do que na maior concentração.

Prasad (1995) sugeriu que o Cd é facilmente absorvido pelo sistema radicular das plantas e translocado, via xilema, para a parte aérea, pela transpiração. Chen et al. (2003) verificaram em plantas de cenoura e rabanete, que a maioria do Cd foi absorvido pela raiz e não translocado para a parte aérea em maiores concentrações.

A espécie *Canavalia ensiformis* (D.C.) L. apresentou, nestas condições experimentais, características de plantas com potencial fitoextrator. As plantas acumularam grande parte do Cd aplicado na parte aérea e apresentaram alta biomassa. No entanto, estes resultados devem ser confirmados em experimentação em solos contaminados, com imposição de condições reais, com vistas à fitoextração de MP.

4.2 Crotalária

No primeiro experimento, verificou-se uma menor emergência das sementes de crotalária na maior concentração de Cd aplicada (100 μmol L^{-1}), a qual atingiu um máximo de 70%, enquanto que na menor concentração e na ausência de Cd a germinação foi praticamente 100% (Figura 19). Segundo Peralta et al. (2001), plantas de alfafa sofreram redução na porcentagem de germinação decorrente da adição de Cd nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 ppm, concentrações estas maiores que as aplicadas neste trabalho.

.

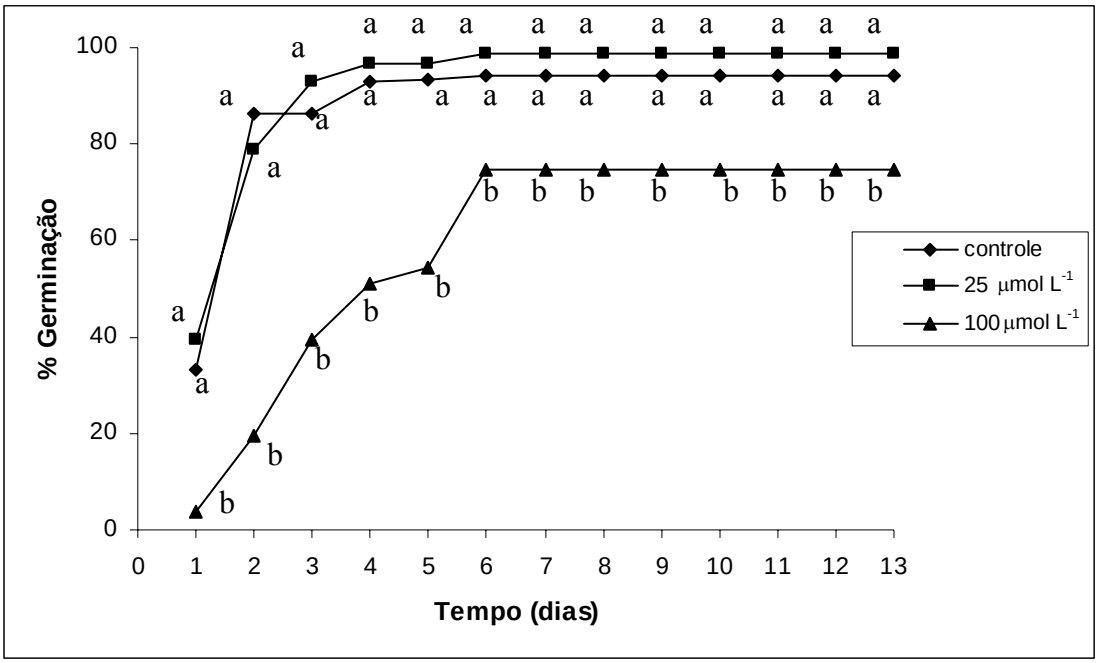
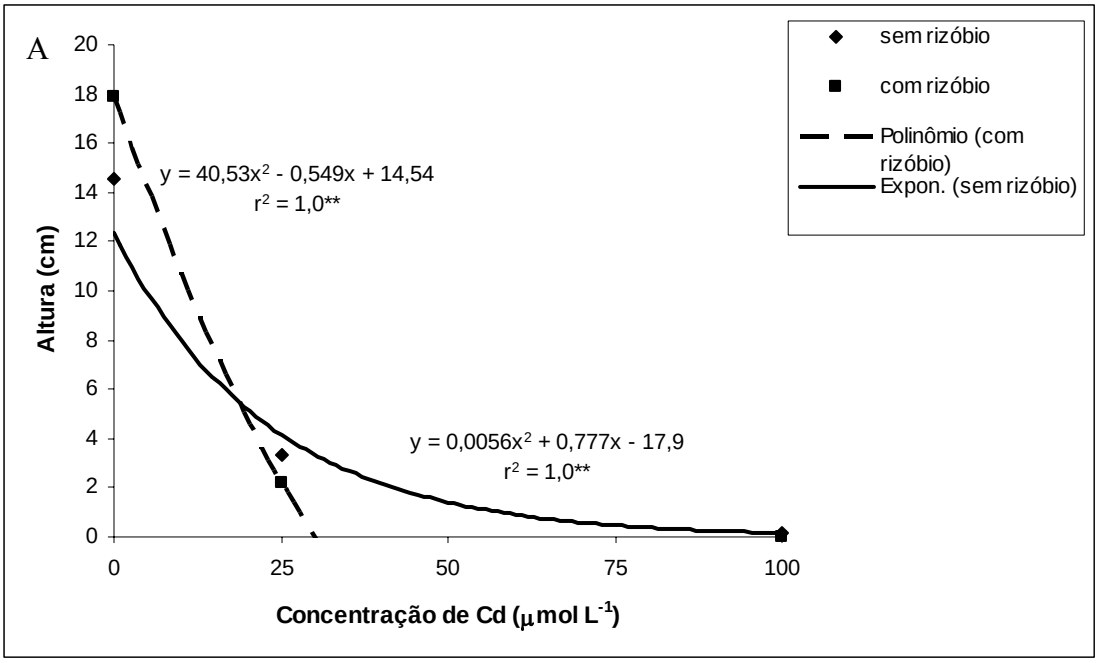


Figura 19 - Porcentagem de emergência de sementes de *Crotalaria juncea* L. em função do tempo após plantio, submetidas a diferentes concentrações de cádmio, sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% Dados transformados arco seno √x.

Tanto para as plantas com rizóbio como para as sem rizóbio, houve diminuição na altura, número de folhas, na área foliar e nas matérias secas de raiz, caule e folhas em função do aumento nas concentrações de Cd na solução (Figuras 20 A, B; 21, 22 e 23 A, B). Outros autores também afirmaram que o Cd afeta o crescimento das raízes e da parte

aérea de várias espécies vegetais: rabanete (VITÓRIA et al., 2001), soja (FERREIRA et al., 2002) e milho (WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005).



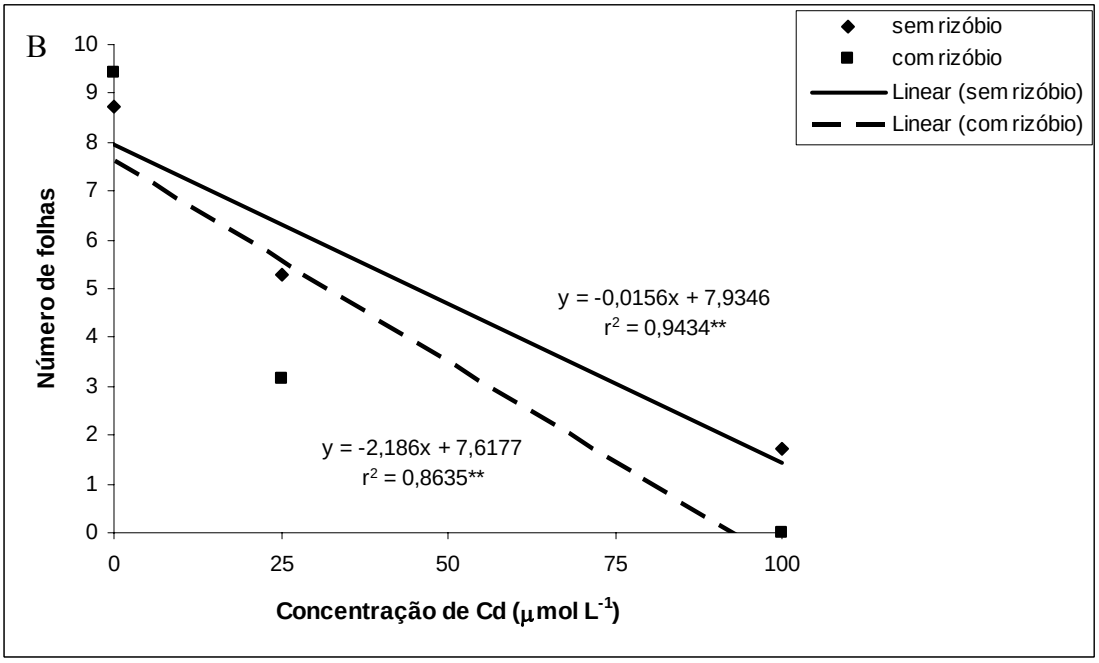


Figura 20 – Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

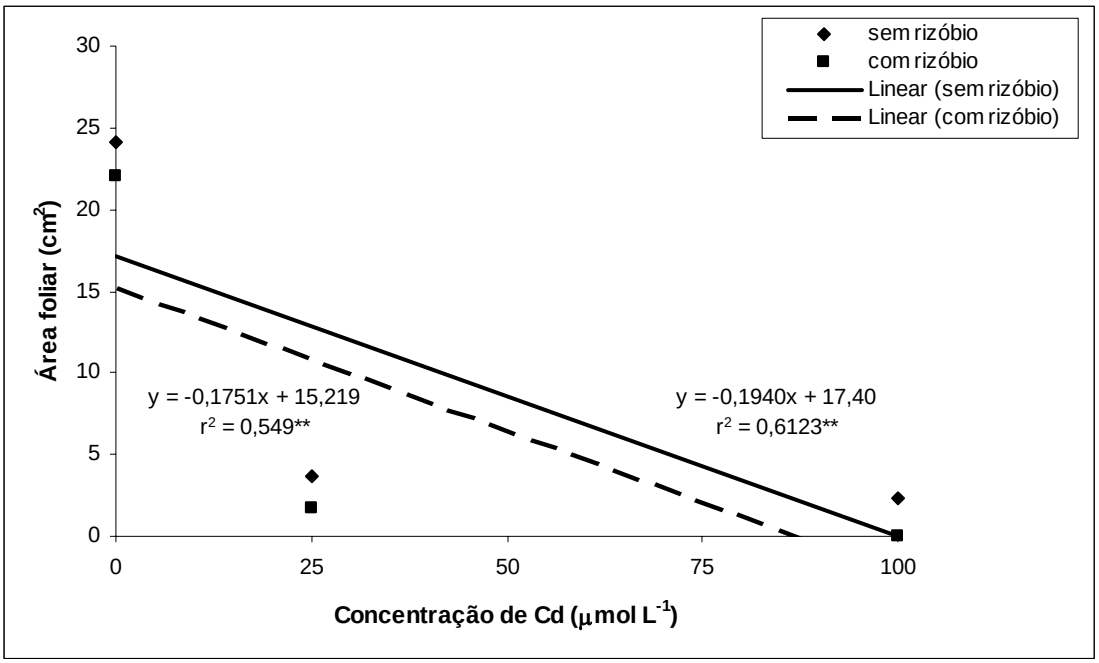


Figura 21 – Área foliar de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

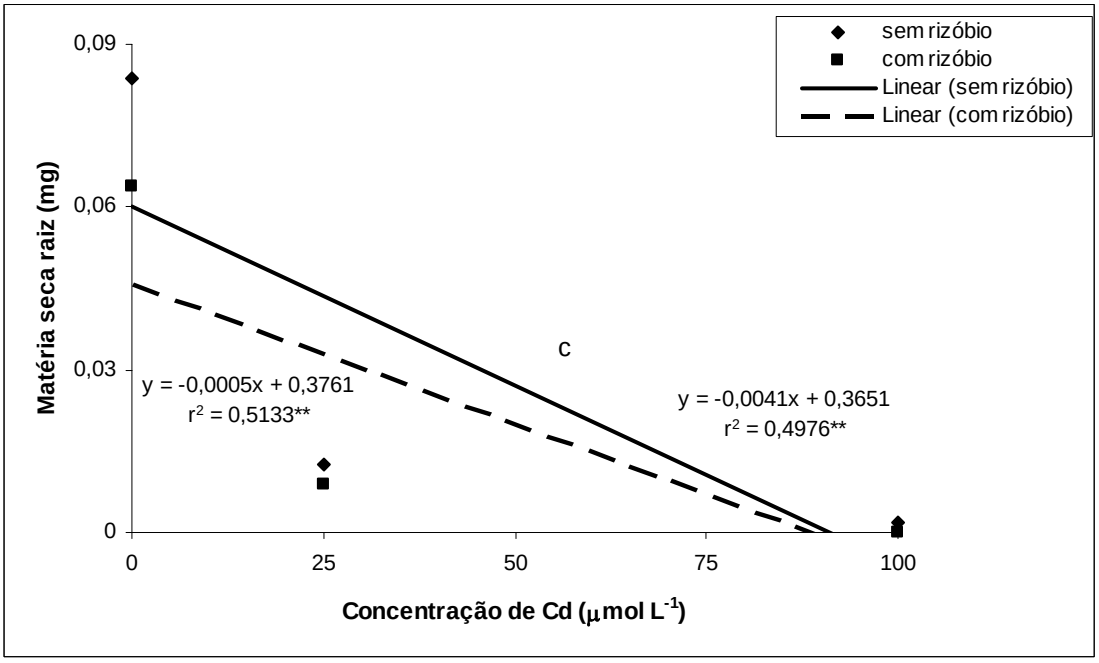


Figura 22 – Matéria seca das raízes de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

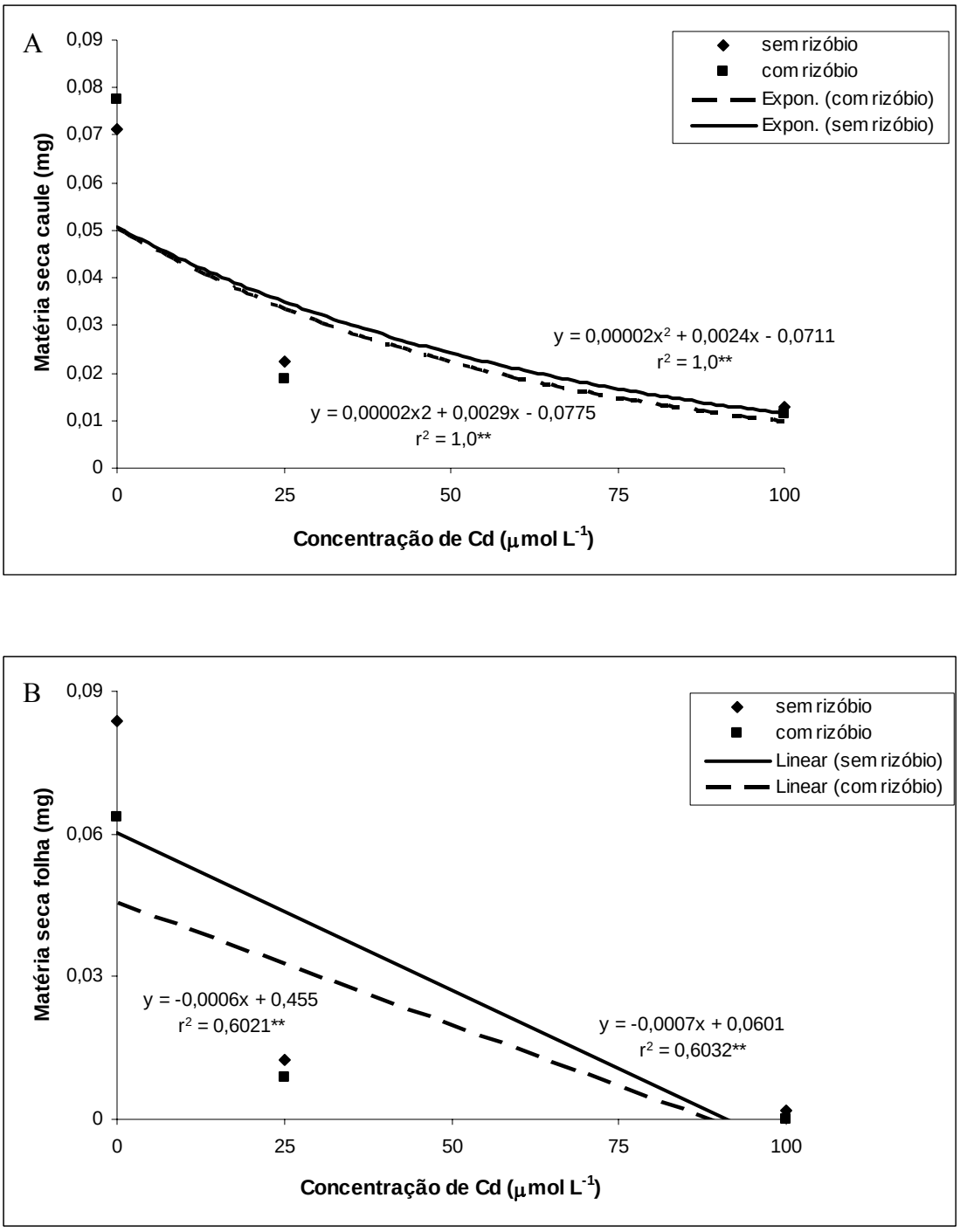


Figura 23 – Matéria seca dos caules (A) e folhas (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%

Para verificar se houve interações entre os tratamentos com e sem rizóbio e as diferentes concentrações de Cd, a Tabela 1 mostra a significância do teste F para as plantas de crotalária.

Tabela 1 – Teste F para diferentes variáveis obtidas em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio sob temperatura e condições fotoperiódicas naturais.

	Rizóbio (B)		Cd (A) (µmol L^{-1})			Interações					
Medidas	sem(B1)	com(B2)	0 (A1)	25 (A2)	100(A3)	AXB	BXA1	BXA2	BXA3	AXB1	AxB2
Altura	NS	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**	**
Número de folhas	NS	NS	**	**	**	**	*	**	**	**	**
Área foliar	NS	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**	**
Matéria seca raiz	NS	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**	**
Matéria seca caule	NS	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**	**
Matéria seca folha	NS	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**	**

* 5% probabilidade ** 1% de probabilidade NS não significativo

Para todas as variáveis determinadas houve interação entre a presença ou ausência de rizóbio e as concentrações de Cd, exceto para a massa da matéria seca dos cotilédones (dados não apresentados). Verifica-se ainda, pelas figuras 20, 21, 22, 23, que as plantas com rizóbio tiveram um desempenho em termo de crescimento menor que as sem rizóbio.

Para a matéria seca cotiledonar não houve diferença significativa para as plantas com e sem rizóbio e nem mesmo ajuste com relação às concentrações de Cd. As plantas crescidas na ausência de Cd (dose zero) sem rizóbio permaneceram com seus cotilédones e as com rizóbio utilizaram melhor suas reservas, visto que os cotilédones caíram. No tratamento sem rizóbio houve uma variação grande de resultados de matéria seca de cotilédones, o que pode ter levado a um alto coeficiente de variação e falta de resultados estatísticos significativos.

As raízes e as folhas foram os órgãos mais afetados pelas concentrações do MP nas plantas de crotalária. Por análises visuais, observou-se que as raízes apresentaram um tom escuro, como Soares et al. (2005) já haviam observado, e as folhas se mostraram em forma de roseta. Além disso, muitas folhas apresentaram aspecto clorótico que pode ser resultado da competição entre Cd e Fe, como já explicado anteriormente, ou então, pela própria deficiência de nutrientes causada pelo Cd (SIEDLECKA & KRUPA, 1999), já que este metal parece competir, por exemplo, com íons K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} (RIVETTA et al., 1997).

A maior concentração de Cd afetou principalmente as plantas dos tratamentos com inoculação de rizóbio, na altura e no número de folhas. Chen at al. (2003) demonstraram que conforme a concentração de Cd aumentava a altura e a área foliar diminuía e portanto, um efeito do estresse causado por este MP.

O desenvolvimento de trabalhos de revegetação com leguminosas em solos contaminados requer, entre outros fatores, a obtenção de rizóbios tolerantes aos níveis tóxicos de MPs. Neste trabalho, a nodulação foi extremamente inibida, demonstrando a falta de tolerância dessas bactérias ao Cd. Nenhuma planta que recebeu Cd nas concentrações de 25 e 100 μmol L^{-1} nodulou, sendo que a média do controle foi de 17 nódulos por planta (dados não apresentados). Segundo Andrade et al. (2004), o número e a matéria seca de nódulos diminuíram significativamente com as doses crescentes de chumbo no solo, em plantas de soja. Essa inibição da nodulação pode ser explicada pelo fato das bactérias do gênero *Rhizobium*, geralmente, diminuirem o pH do seu meio, aumentando assim a disponibilidade e toxicidade dos metais (MATSUDA et al., 2002). Ainda, segundo os mesmos autores, a menor tolerância das bactérias do gênero *Rhizobium* aos MPs em comparação às outras bactérias fixadoras de nitrogênio é a falta de uma cápsula polissacarídica ao redor das células, que retém os MPs impedindo-os de serem absorvidos.

Não houve nodulação, mas mesmo assim pode ter havido a infecção e a penetração do rizóbio e, portanto, aumento do estresse pela presença do rizóbio e o do Cd. Pela análise da Tabela 1, verificou-se uma diminuição evidente do crescimento das plantas com rizóbio na concentração de 25 μmol L^{-1} em comparação com as plantas não inoculadas, inferindo-se, assim, que pode ter havido a infecção destes microrganismos. Segundo Pereira (2001) o Cd na presença de microrganismos no solo pode transformar os metais, através da metilação, em compostos ainda mais tóxicos.

O cultivo de T*rifolium repens* L. na presença de Cd, observado por Mc Grath et al. (1988), resultou em baixos rendimentos da matéria seca, tanto da parte aérea como das raízes. Nesta condição, houve nodulação com ocorrência de numerosos nódulos pequenos e brancos, evidenciando a ineficiência da fixação de N_2.

No segundo experimento, apenas o teor de clorofila *a* e matéria seca dos caules e folhas não variaram significativamente com as concentrações de Cd aplicados (dados não apresentados). Todas as demais variáveis de crescimento (Figuras 24, 25 A, B e 26) e nodulação (Figura 27) diminuíram linearmente com o aumento na concentração de

Cd. Fornazier et al. (2002b) verificaram também esse efeito no crescimento de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse por Cd.

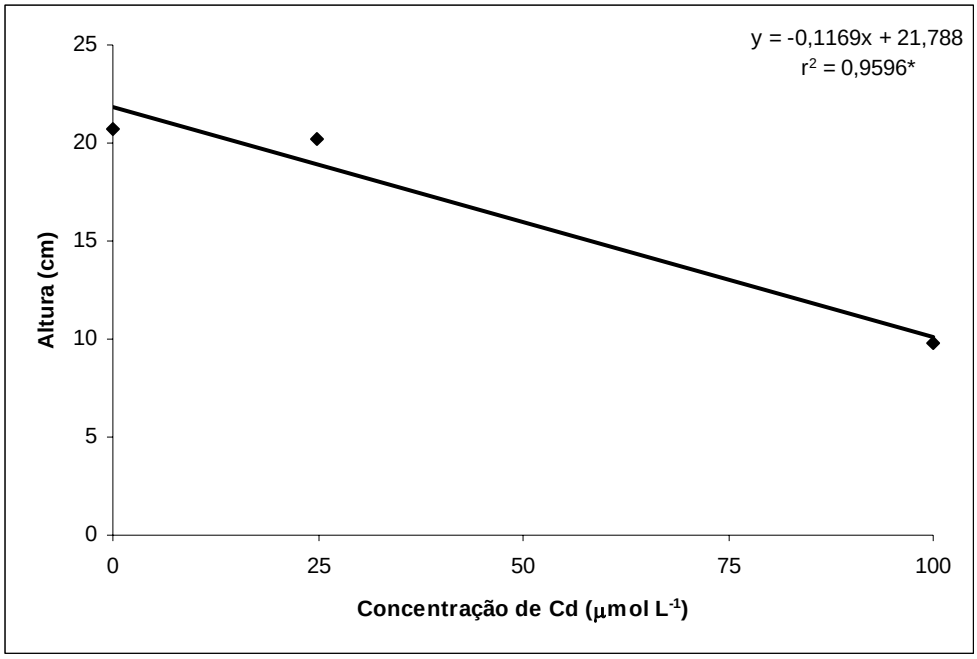
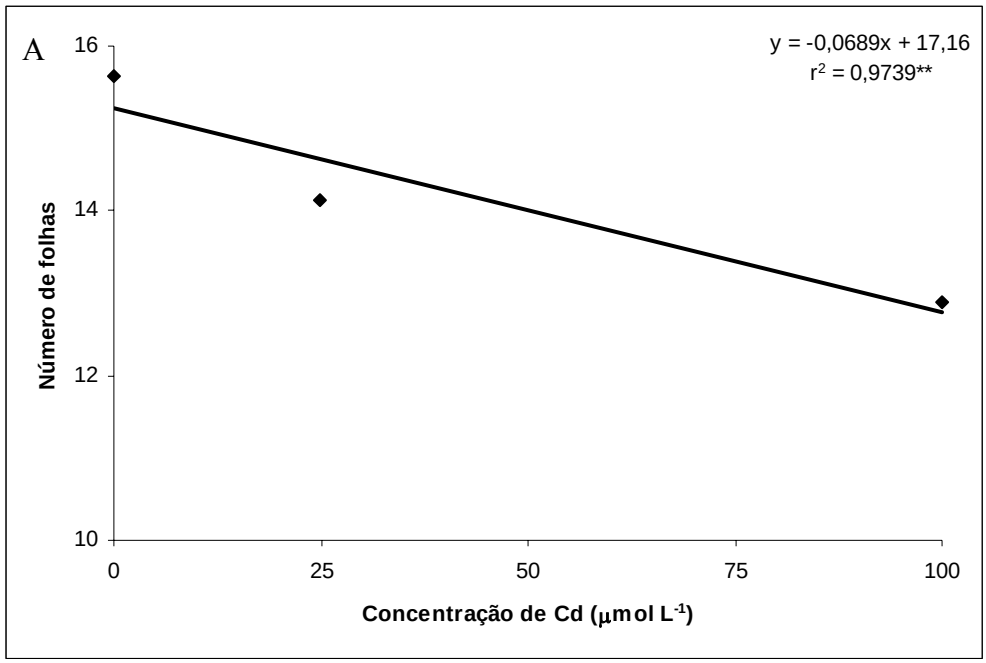


Figura 24 – Altura de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.



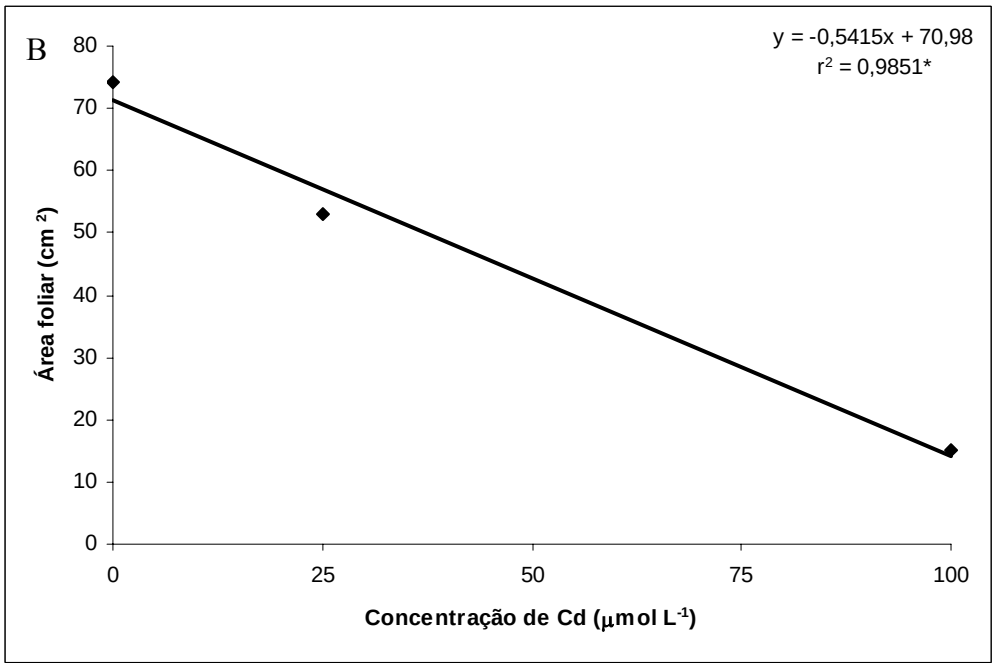


Figura 25 –Números de folhas (A) e área foliar (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5% ** Significativo a 1% Transformação √x para dados de número de folhas.

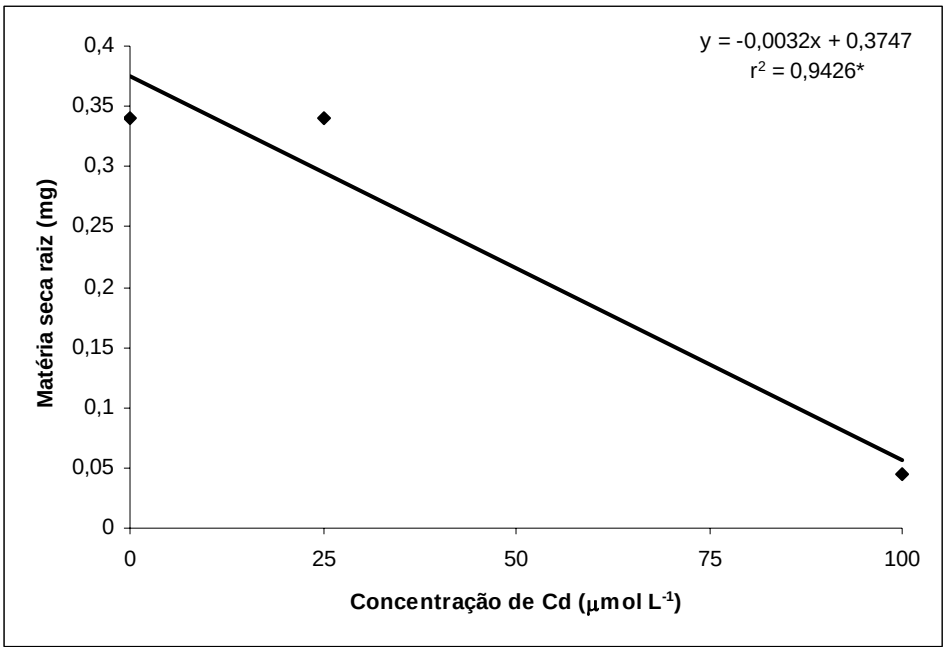


Figura 26 – Matéria seca das raízes de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5%.

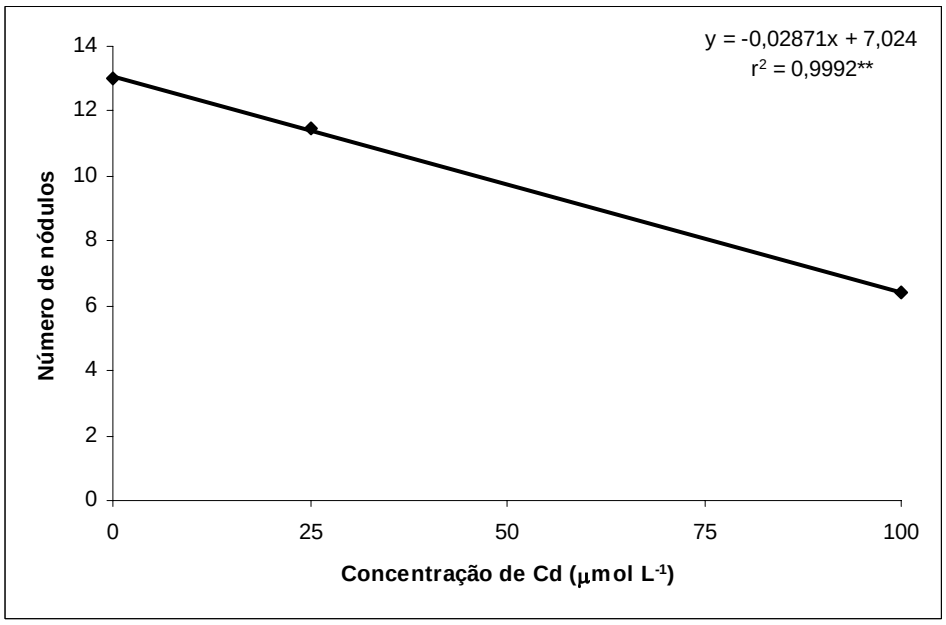
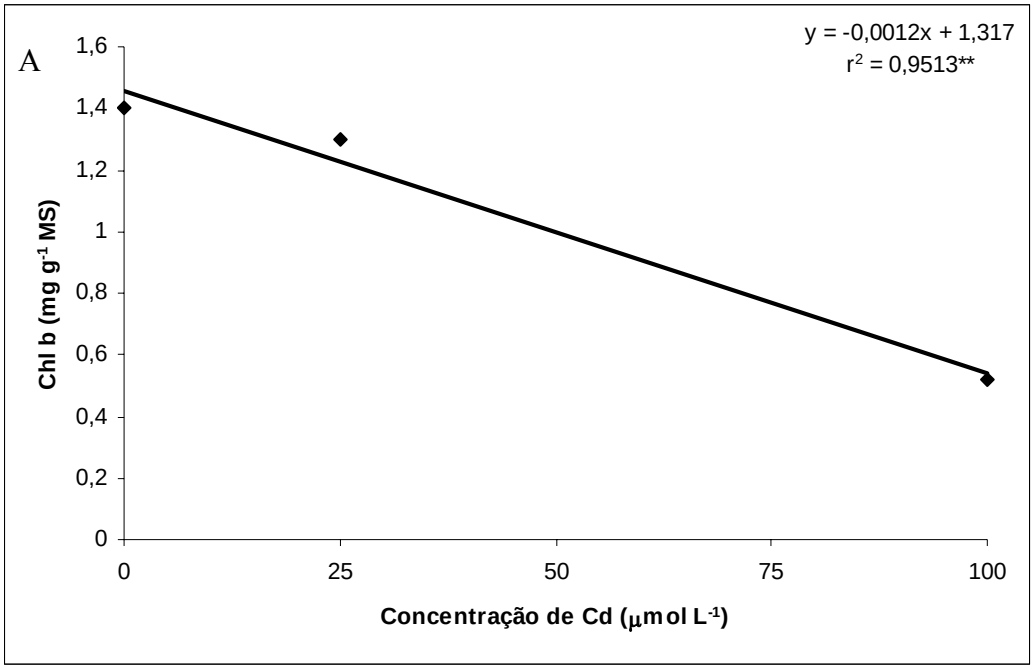


Figura 27 – Número de nódulos por plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1% Dados transformados √x.

Os teores de clorofila *b* e os de clorofila total diminuíram em função do aumento na concentração de Cd (Figura 28), enquanto os teores de clorofila *a* não variaram (dados não apresentados). Houve clorose nas plantas com menor conteúdo de clorofila.



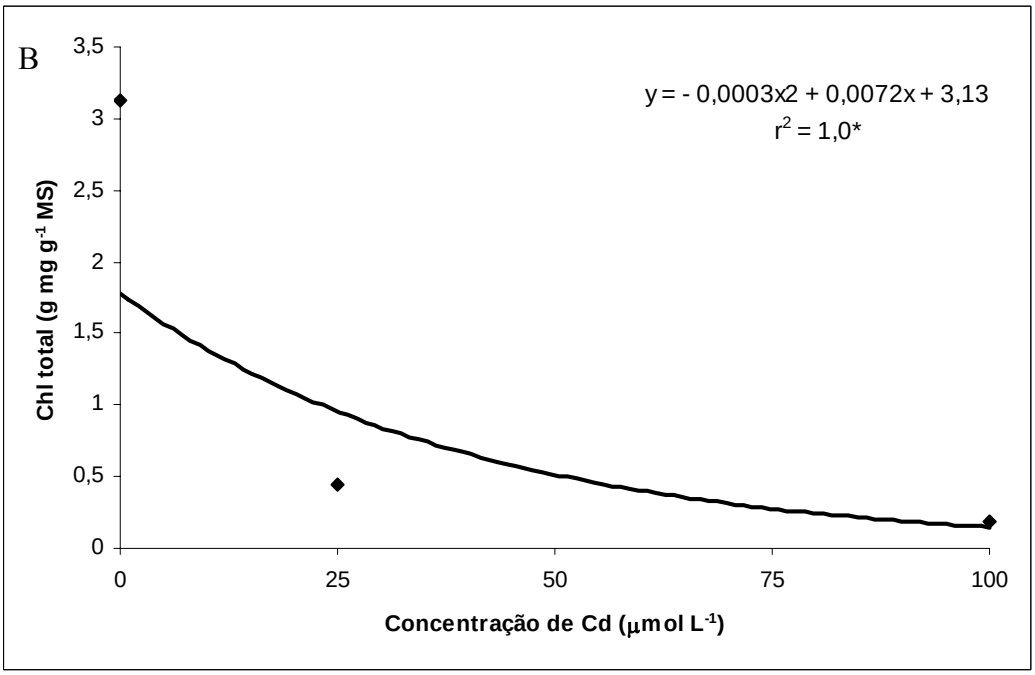


Figura 28 – Teor de clorofila *b* (A) e total (B) de plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. * Significativo a 5% ** Significativo a 1%.

Os teores e o acúmulo de N total das plantas não variaram significativamente (dados não apresentados) e a atividade da nitrogenase diminuiu com o aumento da concentração de Cd (Figura 29).

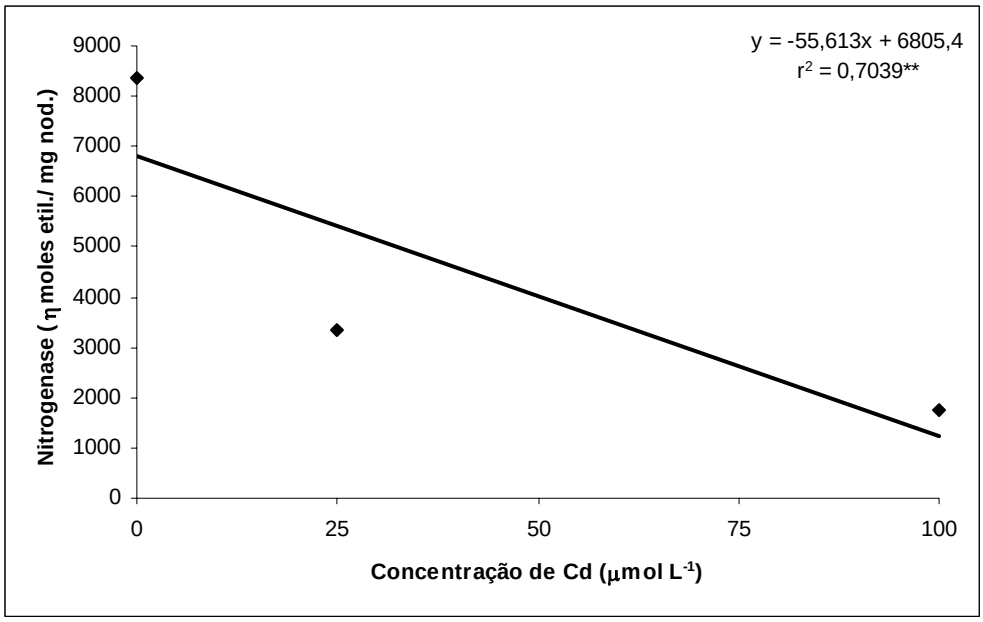


Figura 29 – Atividade da nitrogenase em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%.

Arduini et al. (2006) verificaram também que em plantas de *Miscanthus* submetidas a aplicações de Cd nas concentrações de 0,75, 1,5, 2,25 e 3 mg L^{-1} não houve alteração do teor de N total na planta inteira sendo que a média para a parte aérea foi de 25 g Kg^{-1}. Nas plantas de crotalária, a diminuição da atividade da enzima nitrogenase indicou que menos N proveniente da fixação simbiótica estava disponível para as plantas, o que refletiu no seu crescimento. O índice de produção para a planta toda para a concentração de 25 μmol L^{-1} foi de 86,62% e para a concentração de 100 μmol L^{-1} foi de 33,75%. Portanto, infere-se que a maior concentração de Cd afetou muito o crescimento das plantas (66,25% do crescimento foi inibido pelo Cd).

Não foi possível a realização do cálculo do índice de translocação para crotalária pela falta de material para quantificação de Cd, pois para se obter matéria seca suficiente foi necessário juntar raízes, caules e folhas em uma mesma amostra. Por isso, os resultados são apresentados para a planta toda (Figura 30), mostrando um aumento linear no teor de Cd na planta em função do aumento na concentração de Cd na solução. O acúmulo de Cd por planta não apresentou ajuste significativo em relação ao Cd.

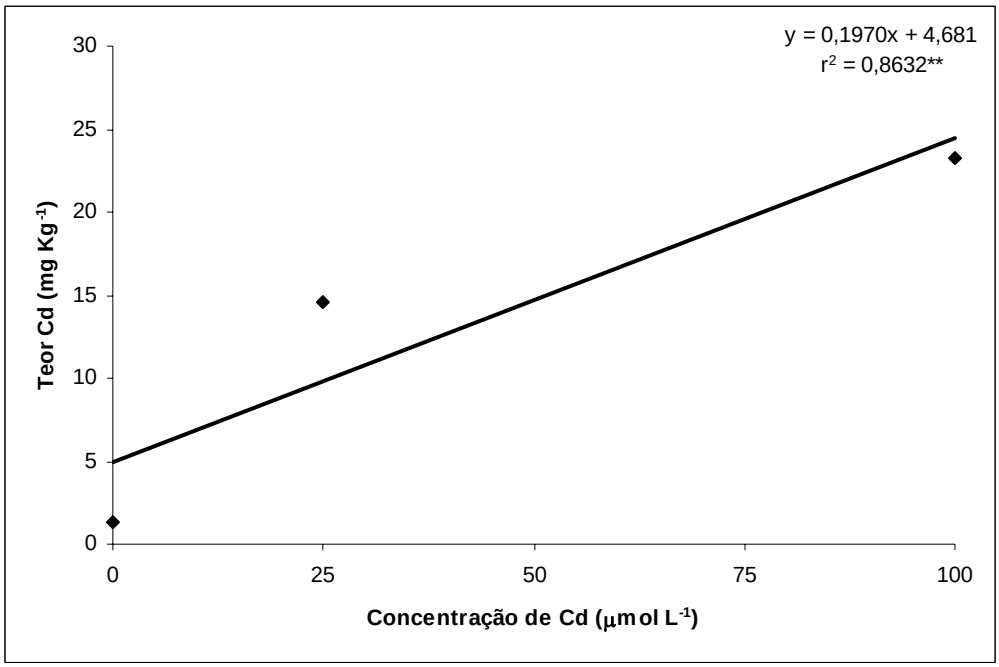


Figura 30 – Teor de cádmio em plantas de *Crotalaria juncea* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio. ** Significativo a 1%

A espécie *Crotalaria juncea* L. apresentou ser mais sensível à exposição ao Cd com comportamentos diferenciados nos dois experimentos, talvez pelas condições de cultivo ou mesmo das sementes, ou ainda, pela técnica de inoculação empregada.

As plantas desta espécie não apresentaram características de uma boa planta fitoextratora nestas condições experimentais. Apesar das plantas de crotalária possuírem alta biomassa aérea, o desenvolvimento delas foi altamente inibido na presença do Cd. Além disso, esta espécie, nestas condições de hidroponia, não apresentou características de acumuladora deste metal.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

a) A espécie *Canavalia ensiformes* (L.) D.C. (feijão-de-porco) possui potencial fitoextrator para o MP Cd.

b) O Cd não inibe a germinação de sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.

c) O Cd não interfere na fixação do N_2 pelos rizóbios em *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.

d) A espécie *Crotalaria juncea* L. (crotalária) não apresenta características de uma boa planta fitoextratora para o Cd.

e) A espécie *Crotalaria juncea* L. não é tolerante ao Cd para a germinação de suas sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, M. F. **Extração e determinação simultânea por emissão em plasma de nutrientes e elementos tóxicos em amostras de interesse agronômico.** 1997. 135 f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química, universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. **Tópicos em Ciências do Solo**, v. 1, p. 299-351, 2000.

AL-KEDHAIRY, A.A.; AL-ROKAYAR, S.A.; AL-MISUED, F.A.Cadmium toxicity on cells stress response. **Pakistan Journal Biology Sciences.**, v. 4, p. 1046-1049, 2001.

ALMÅS, Å.R.; BAKKEN, L.R.; MULDER, J. **Adaptation of soil microbial communities to Zn and Cd contamination in relation to microbial attachment in soil.** In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM

ANDRADE, S. A. L. **Interação de micorriza e chumbo no desenvolvimento da soja e seu efeito na atividade microbiana do solo**. 2001. 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; SILVEIRA, A.P.D. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and Rhizobium symbioses under soybeans plants. **Apllied Soil Ecology**, v. 26, p. 123-131, 2004.

ANDRADE, S.A.L. **Atenuação do estresse causado por Cd promovida pela associação micorrízica arbuscular em plantas potencialmente fitorremediadoras**. 2005. 118 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ARDUINI, I; ERCOLI, L.; MARIOTTI, M.; MASONI, A. Responses of miscanthus to toxic cadmium applications during the period of maximum growth. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 29-40, 2006.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

BARCELÓ, J.; VÁSQUES, M.D.; POSCHENRIEDER, C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **New Phytologist**, v. 108, n. 1, p. 37-49, 1988.

BARRIQUELO, M. F.; JULIATTI, M. A.; SILVA, M.S.; LENZI, E. Lead behavior in soil treated with contaminated swage sludge and cultivated with maize. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, Brazil, v. 46, n.4, p. 499-505, 2003.

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

BREMNER, J.M. Total nitrogen. *In*: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis. **Madison American Society of Agronomy**, p. 1149-1178, 1965.

BURNETT, P.; DAUGHNEY, C.; HEINRICH, H.; PEAK, D. **Cadmium adsorption onto *Anoxybacillus flavithermus***. In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM

CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F.; CASAGRANDE, J.C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B.; ABREU, C.A. Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal: Legis Summa, p. 89-124, 2001.

CARDOSO, P.F. **Resposta de linhagens de arroz à exposição ao cádmio**. 2000. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na área de Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CATALDO, D.A.; MCFADDEN, K.M.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Organic constituents and complexation of nickel, iron, cadmium and plutonium in soybean xylem exudates. **Plant Physiology**, v. 86, p. 734-739, 1988.

CHANEY, R.L.; BROWN, S.L.; LI, Y.M.; ANGLE, S.; STUCZYNSKI, T.I.; DANIELS, W.L.; HENRY, C.; SIEBIELEC, G.; MALIK, M.; RYAN, J.A.; COMPTON, H. **Progress in risk assessment for soil metals, and in-situ remediation and phytoextraction of metals from hazardous contaminated soils.** US-EPA's Conference "Phytoremediation: state of science conference", Boston, MA, 1-33, 2000.

CHEN, Y.X.; HE, Y.F.; YANG, Y.; YU, Y.L.; ZHENG, S.J.; TIAN, G.M.; LUO, Y.M.; WONG, M.H. Effect of cadmium on nodulation and N_2-fixation of soybean in contaminated soils. **Chemosfere**, v. 50, p. 781-787, 2003.

CITTERIO,S.; SANTAGOSTINHO, A.; FUMAGALLI, P.; PRATO, N.; RANALLI, P.; SGORBATI, S. Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. **Plant and Soil**, v. 256, p. 243-252, 2003.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, p. 475-486, 2001.
COBBET, C.S. Phytochelatins biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. **Current Opinion Plant Biology**, v. 3, p.211-216, 2000.

CUNNINGHAM, S.D.; ANDERSON, T.A.; SCHWAB, A.P. HSU, F.C. Pytoremediation of soils contaminated with organic polluents. **Advances Agronomy**., 56;55-114, 1996.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 3-11, 2000.

EL-SHINTINAWY, F. Glutathione counteracts the inhibitory effect induced by cadmium photosynthetic process in soybean. **Photosynthetica**, v. 36, n. 1-2, p. 171-179, 1999.

ERNEST, W.H.O. Bioavalability of heavy metals and descontamination of soils by plants. **Applied Geochemistry**, v. 11, p. 163-167, 1996.

FERREIRA, R.R; FORNAZIER, R.F.; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal Plant Nutrition**, v. 25, p. 327-342, 2002.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; PEREIRA, G.J.G; MOLINA, S.M.G; SMITH, J; LEA, P.J; AZEVEDO, R.A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 125-131, 2002a.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.;VITÓRIA, A.P.; MOLINA, S.M.G.; LEA, R.F.; AZEVEDO, R.A. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biology Plant.**, v. 41, p. 91-97, 2002b.

FRED, C.; S. WAKSMAN. 1928. **Yeast extract manitol agar**. Laboratory Manual of General Microbiology. McGraw Hill. New York . 145 p.

GADD, G. Metals and microorganisms: a problem of definition. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 197-204, 1992.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, v.77, p. 229 – 236, 2001.

GAULKE, L.S.; HENRY, C.L.; BROWN, S.L. Nitrogen fixation and growth response of *Alnus rubra* amended with low and high metal content biosolids. **Sciencia Agricola**, v. 63, n. 4, p. 351-360, 2006.

GHOSROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentration od cadmium. **The Plant Journal**, v. 13, p. 591-602, 1998.

GIBBS, P.A..; CHAMBERS, B.J.; CHAUDRE, A.M.; MCGRATH, S.P.; CARLTON-SMITH, C.H., GODLEY, A.R., BACON, J.R.; CAMPBELL, C.D.; AITKEN, M.N. **Long-Term sludge experiments: the effects of heavy metals on soil microbial activity and long-term soil fertility.** In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM

GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005.

GRILL, E.; WINNACKER, E-L.; ZENK, M.H. Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v. 230, p. 390-396, 1985.

GUO, T.; ZHANG , G.; ZHOU, M.; WU, F.; CHEN, J. Effects of aluminium e cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activies of two barley genotypes with different Al resistence. **Plant and Soil**, v. 258, p. 241-248, 2006.

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

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evalution. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HANSSON, D.; STOLT, P.; ASP, H.; MERKU, A. **Rye cromossome with Cd regulating genes im wheat**. In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM

HERNANDEZ, L.E.; COOKE, D.T. Modifications of roots and hyphae of a *Glomus mosseae/ Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amented with high and low concentrations of cadmium. **New phytology**, v. 135, p. 353-360, 1997.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extration of clorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. Journal Botany**, v. 57, p. 1332-1334, 1979.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method growing plants without soil. U. Calif. Agric. Exp. Sta., Califórnia, Circular 347, 1939.

HUNGRIA, M. & R. S. ARAÚJO. (Eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação. Brasília, D.F. 1994 542 p.

JAUERT, P.; SCHUMACHER, T.E.; BOE, A.; REESE, R.N. Rhizosphere acidification and cadmium uptake by strawberry clover. **Journal Environmental Quality**, v. 31, p. 627-633, 2002.

KÄRENLAMPI, S.; SCHAT, H.; VANGRONSVELD, J.; VERKLEIJ, J.A.C.; LELIE, D.; MERGEAY, M.; TERVAHAUTA, A.I. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 225-231, 2000.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES W.J.. Role plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v.41, p. 197-207, 2000.

KROTZ, R.M.; EVANGELOU, B.P.; WAGENER, G. J. Relationships between cadmium, zinc, Cd-biding peptide, and organic acid in tobbaco suspensions cells. **Plant Physiology**, v. 91, p. 780-787, 1989.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; MENCH, M.; VANGRONSVELD, J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 200, p. 241-250, 1998.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a rewiew of biological mechanisms. **J. Environmental Quality**, v. 31, p. 109-120, 2002.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. **Earth-Science Reviews**, v. 51, p. 1-31, 2000.

LEE, S.; LEUSTEK, T. The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. **Plant Science**, v. 141, p. 201-207, 1999.

LI, W.; KHAN, M.A.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Effects of heavy metals on seed germination early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 45-50, 2005.

LICHTENTHALER, H.K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes**. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P.; Kaplan, N.O., eds.), v. 148, New York, USA, Academic Press. Inc., p. 350-382, 1987.

LIN, C.C.; LIN, H.L. Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd^{+2}). **Journal of Hazardous Materials**, v. A 122, p. 7-15, 2005.

MARIE-PIERRE, I.; BARBARA, F.; GERALDINE, S.; JACQUES, B. **Mecanisms of Cd accumulation in the model plant *Arabidopsis thaliana***. In: 8th INTERNACIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS, Austrália, 2005. CD-ROM.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2ª ed. London: Academic Press, 2002. 889 p.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Tolerancia de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 343-355, 2002.

McBRIDE, M. **Environmental chemistry of soils.** New York: Oxford, 1994. 406 p.

McGRATH, S.P.; BROOKES, P.C.; GILLER, K.E. Effects of potencialy toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. **Soil biology and biochemistry**, v. 20, p. 415-424, 1988.

MEHLHORN, H. Ethilene-promoted ascorbate peroxdase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. **Plant Cell Environmental**, v. 13, p. 971-976, 1990.

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Archivies Environmental Contaminated. Toxicology**, v. 43, p. 203-213, 2002.

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

OLIVARES, E. The effect of lead on the phytochemistry of *Tithonia diversifolia* exposed o roadside automotive pollution or grown in pots of Pb- supplement soil. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 149-158, 2003.

OLIVEIRA. J.A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; JORDÃO, C.P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre crescimento relativo de plantas de aguapé e salvínia. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

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

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J.O.; MIRANDA, J.R.P.; FERNANDES, A.R. Absorção de nutrientes por mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) em solução nutritiva contaminada por cádmio. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 189-197, 2004.

PERALTA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; TIEMANN, K.J.; GOMEZ, E.; ARTEAGA, S.; RASCON, E.; PARSONS, J.G. Uptake and effects of five metals on seed germination and plant growth in alfafa (*Medicago sativa* L.). **Bulletin Environmental Contamination. Toxicology**, v. 66, p. 727-734, 2001.

PEREIRA, B.F.F. **Uso de plantas remediadoras de chumbo**. 2004. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical na área de Gestão de Recursos Agroambientais). Instituto Agronômico, Campinas, 2004.

PEREIRA, J.C. **Os microrganismos e os metais pesados do solo.** Documento 132, ago., 2001, EMBRAPA Seropédica, R.J.

PIERANGELI, M.A.P.; GUILHERME, L.R.G.; OLIVEIRA, L.R.; CURI, N.; SILVA, M. L.N. Efeito da força iônica da solução de equilíbrio sobre a adsorção/ dessorção de chumbo emol Latossolos brasileiros. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.36, n. 8, p. 1077-1084, 2001.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B; BARCELÓ, J. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistence and abscisic acid content in expanding bean leaves. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1365-1371, 1989.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental Experimental Botany**, v. 35, p. 525-545, 1995.

RIVETTA, A.; NEGRINI, N.; COCUCCI, M. Involvment of Ca^{+2} toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. **Plant Cell Environmental**, v. 20, p. 600-608, 1997.

ROBINSON, B.; FERNÁNDEZ, J.H.; MADEJÓN, P.; MARAÑÓN, T.; MURILLO, J.M.; GREEN, S.; CLOTHIER, B. Phytoextraction: a assessment of biogeochemical and economic viability. **Plant and Soil**, v.249, p. 117-125, 2003.

ROMEIRO, S. **Potencial fitoextrator de *Ricinus communis* L., *Helianthus annus* L. e *Canavalia ensiformes* L. para o chumbo, em solução nutritiva**. 2005. 69f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2005.

ROSSI, C.; PADILHA, P.M.; PADILHA, C.C.F. Absorção de cádmio e crescimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. CV carioca). **Sciencia Agricola**, v. 55, n. 2, maio/ago, 1998.

SALT, D. E. From meals to metals and back. Disponível em http://www.plantphys.net. Acesso em: 14 jan. 2005.

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

SHEN, Z.G.; LI, X.D.; WANG, C.C.; CHEN, H.M.; CHUA, H. Lead phytoextraction from contaminated soil with high-biomass plant species. **Journal Environmental Quality**, v. 31, p. 1893-1900, 2002.

SICHOROVÁ, K.; TLUSTOS, P.; SZÁKOVÁ, J.; BALÍK, J. **The spatial variability of Cd and Pb contents of grown in a contaminated soil**. In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM.

SIEDLECKA, A; KRUPA, Z. Cd/Fe interaction in higher plants- its consequences for the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica**, v. 36, n. 3, p. 321-331, 1999.

SINGH, B.R.; SOLEDAD, M. **Soil pH and Calcium effects on cadmium uptake and concentration in rhizosphere soil.** In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM.

SMITH, L.A.; MEANS, J.L.; CHEN, A.; ALLEMAN, B.; CHAPMAN, C.C.; TIXIER, J.S.; BRAUNING, S.E.; GAVASKAR, A.R.; ROYER, M.D. **Remedial options for metals-contaminated sites.** Boca Raton: CRC Press, 1995.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, p. 175-183, 2005.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**. John Wiley & Sons, Inc. 380 p., 1986.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; MCCUTCHEON, S.C. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v. 18, p. 647-658, 2002).

TAN, K.H. **Environmental soil science**. 2.ed. New York: Marcel DekkerInc., 452 p., 2000.

VINCENT, J.M. **A manual for practical study of the root-nodule bacteria**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970. 164p.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2001.

VITÓRIA, A.P.; RODRIGUEZ, A.P.M.; CUNHA, M.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 561-568, 2003.

VITÓRIA, A.P.; DA CUNHA, M.; AZEVEDO, R.A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 47-52, 2006.

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

WATANABE, M.E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 182A-186A, 1997.

WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. **Biology Plant**, v. 49, p. 237-245, 2005.

WU, S.C.; CHEUNG, K.C.; LUO, Y.M.; WONG, M.H. Effects of inoculation of plant growth – promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. **Environmental Pollution**, v. 40, p. 124-135, 2006.

YANAI, J.; NISHIYAMA, Y.; KOSAKI, T. **Phytoremediation of Cd-contaminated soils in Japan with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens***. In: 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOGEOCHEMISTRY OF TRACE ELEMENTS. Austrália, 2005. CD-ROM.

ZORNOZA, P.; VÁZQUEZ, S.; ESTABAN, E.; FERNANDEZ-PASCUAL, M.; CARPENA, R. Cadmium-stress in nodulated white-lupin: strategies to avoid toxicity. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 1003-1009, 2002.

7 ANEXO

7.1 Anexo I – Composição química da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1939) modificada.

Solução Estoque 1M		**Relação Solução Estoque Solução Básica**
Componentes	**Concentração**	
	$g.L^{-1}$	**$mL.L^{-1}$**
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236,16	4,0
KNO_3	101,10	6,0
$MgSO_4.7H_2O$	246,50	2,0
KH_2PO_4	5,28	1,0
KCl	71,70	6,0
$CaCl_2.2H_2O$	147,02	5,0
EDDHA Fe (6%)	83,30	0,5
H_3BO_3	2,86	1,0
$MnCl_2.4H_2O$	1,81	1,0
$ZnSO_4.7H_2O$	0,22	1,0
$CuSO_4.5H_2O$	0,08	1,0
$H_2MoO_4.H_2O$	0,02	1,0
$CdCl_2.2,5H_2O$	20,13	

7.2 Anexo II – Composição química da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1939) modificada sem adição de nitrogênio.

Solução Estoque 1M		**Relação Solução Estoque Solução Básica**
Componentes	**Concentração**	
	$g.L^{-1}$	**$mL.L^{-1}$**
$MgSO_4.7H_2O$	246,50	2,0
KH_2PO_4	5,28	1,0
KCl	71,70	6,0
$CaCl_2.2H_2O$	147,02	5,0
EDDHA Fe (6%)	83,30	0,5
H_3BO_3	2,86	1,0
$MnCl_2.4H_2O$	1,81	1,0
$ZnSO_4.7H_2O$	0,22	1,0
$CuSO_4.5H_2O$	0,08	1,0
$H_2MoO_4.H_2O$	0,02	1,0
$CdCl_2.2,5H_2O$	20,13	