

## Comissão 3.4 - Poluição, remediação do solo e recuperação de áreas degradadas

# TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE *Stizolobium aterrimum* ASSOCIADA AO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Glomus etunicatum* EM SOLO CONTAMINADO POR CHUMBO<sup>(1)</sup>

Lucas Anjos de Souza<sup>(2)</sup>, Sara Adrián López de Andrade<sup>(3)</sup>, Sarah Caroline Ribeiro de Souza<sup>(2)</sup> & Marlene Aparecida Schiavinato<sup>(4)</sup>

### RESUMO

A poluição do solo com metais pesados tem aumentado significativamente nos últimos anos, devido à ação antrópica. Diversas técnicas podem ser utilizadas para reverter ou minimizar a condição de contaminação do solo, porém muitas delas são prejudiciais ao solo. Uma alternativa é a utilização da fitorremediação, já que as plantas possuem a capacidade de absorver elementos do solo e, dessa maneira, promover sua descontaminação com teores excessivos de metais e outros elementos potencialmente tóxicos. A associação de plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode influenciar a absorção desses elementos. Com o objetivo de avaliar o potencial fitorremediador de plantas de *Stizolobium aterrimum* associadas ou não a FMAs em solos com concentrações crescentes de Pb, realizou-se um experimento sob condições de casa de vegetação, em esquema fatorial 4 x 2. Os tratamentos consistiram na adição de quatro doses de Pb (0, 250, 500 e 1.000 mg dm<sup>-3</sup>) e da inoculação ou não de FMA. Os resultados mostraram que a planta foi tolerante ao Pb nas doses utilizadas. A associação com FMA não influenciou a absorção de Pb pela planta. No entanto, a micorrização influenciou a fixação biológica de N<sub>2</sub>, observando-se maior atividade da enzima nitrogenase em plantas micorrizadas. Apesar dos bons resultados obtidos com relação à tolerância dessa planta ao Pb, mais estudos precisam ser realizados acerca da absorção desse elemento, principalmente em solo multicontaminado, que é a realidade encontrada em sistemas poluídos.

**Termos de indexação:** metais pesados, associação simbiótica, fitoestabilização.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor vinculado ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp. Recebido para publicação em 12 de maio de 2010 e aprovado em 6 de maio de 2011.

<sup>(2)</sup> Doutorando do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – Unicamp. E-mails: lucasanjos22@yahoo.com.br; sarahcarolbio@gmail.com

<sup>(3)</sup> Pesquisador colaborador do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – Unicamp. E-mail: sardrian@unicamp.br

<sup>(4)</sup> Professora do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia – Unicamp. E-mail: mschiavi@unicamp.br

**SUMMARY: TOLERANCE AND PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF *Stizolobium aterrimum* ASSOCIATED TO THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI *Glomus etunicatum* IN LEAD-CONTAMINATED SOIL**

*Heavy metal pollution of soils has increased significantly in the last years owing to anthropic action. Several techniques can be used to revert or to minimize soil contamination, although many of these techniques are harmful to the soil. An alternative is to use a new technique, called phytoremediation, based on the ability of plants to take up elements from soils with excessive high levels of metals or of other potentially toxic elements and thus contribute to soil decontamination. The inoculation of plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can influence the absorption of these elements. The phytoremediation potential of *Stizolobium aterrimum* plants with or without AMF in soils with increasing lead concentrations was evaluated in a greenhouse experiment, in a 4 x 2 factorial design. The treatments consisted of the addition of four Pb rates (0, 250, 500 and 1000 mg dm<sup>-3</sup>) to the soil where black velvet bean plants associated or not with *Glomus etunicatum* AMF were grown. The results showed that black velvet bean was Pb tolerant at the tested rates. The association with AMF did not influence the Pb plant uptake. However, the mycorrhiza influenced biological nitrogen fixation by increasing the activity of the enzyme nitrogenase in mycorrhizal plants. Despite the good results obtained in relation to Pb tolerance of black velvet bean, further studies on the uptake of this element are needed, above all in the case of multicontaminated soils, as actually observed in polluted systems.*

*Index terms: heavy metals, symbiotic association, phytostabilization.*

## INTRODUÇÃO

A poluição de solos por metais pesados (MPs) tem se tornado um problema global crescente com o desenvolvimento industrial, o aumento da mineração e o uso de lodo de esgoto em solos agriculturáveis (Chen et al., 2000). O Pb é um MP que se concentra preferencialmente nas camadas superficiais do solo, e sua disponibilidade depende sobretudo do pH do solo (Päivöke, 2002).

Em solos agriculturáveis, o Pb pode levar à diminuição do rendimento das culturas e alterar diretamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, ou indiretamente, por influenciar a atividade microbiana do solo (Andrade & Silveira, 2004). O Pb altera principalmente o crescimento das raízes e das plantas, e esse aspecto tem sido utilizado para avaliar a tolerância de diferentes espécies vegetais ao Pb (Di Salvatore et al., 2008).

Diversos métodos têm sido usados para remediar solos contaminados com MPs, porém muitos deles são agressivos ao ecossistema. A utilização de ácidos fortes, como ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido clorídrico, é eficiente, porém acarreta prejuízos ao solo (Tuin & Tels, 1990). Ácidos orgânicos também têm se mostrado efetivos na imobilização de Pb (Renella et al., 2004), e a utilização de agentes quelantes, como o EDTA, é eficiente no aumento da solubilidade de alguns MPs (Piechalak et al., 2003). Além dos métodos citados, a remoção de parte do solo contaminado

também é realizada, mas isso expõe os horizontes do solo, prejudicando-o.

A fitorremediação é uma técnica que emprega plantas como agentes de descontaminação, com o fim de remediar água e solos contaminados por poluentes de origem orgânica e inorgânica. A fitorremediação de solos contaminados com MPs tem como princípio a absorção e acúmulo desses elementos pelas plantas, as quais podem ser posteriormente armazenadas para tratamento subsequente (Oliveira et al., 2006). A fitorremediação abrange, entre outras técnicas, a fitoextração, a qual se baseia no acúmulo do contaminante na parte aérea (Lombi et al., 2001). No caso do Pb, considera-se uma planta fitoextratora quando ela acumula no mínimo 1.000 mg kg<sup>-1</sup>. A fitoestabilização baseia-se na imobilização do contaminante nas raízes e no solo, reduzindo dessa forma a sua disponibilidade para outros organismos e prevenindo a erosão do solo e a lixiviação do contaminante para áreas ainda não contaminadas (Santos et al., 2007). No contexto da fitoestabilização, a associação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é de grande importância, pois, além de conferir melhor absorção de P e auxiliar no crescimento vegetal (Rabie, 2005), também pode contribuir na redução da disponibilidade de MPs por meio da sua imobilização em estruturas simbióticas intra e extrarradiculares (Andrade et al., 2009). Como demonstrado por Andrade et al. (2004), plantas de soja micorrizadas translocaram menor quantidade de Pb à parte aérea.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum*, mucuna-preta, ao Pb sob a influência da sua associação com o FMA *Glomus etunicatum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (inoculação ou não de FMA e quatro doses de Pb: 0, 250, 500 e 1.000 mg dm<sup>-3</sup>), com sete repetições em cada tratamento.

### Preparo do solo

Foi utilizado um Latossolo Vermelho-Amarelo textura argilosa. A análise química do solo foi realizada no Laboratório de Análise de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A análise química do solo antes do experimento mostrou que os nutrientes P e K apresentaram teores abaixo do nível adequado para o cultivo de plantas anuais; com a finalidade de corrigir os teores desses nutrientes, foram utilizados 10 mL de solução de fosfato de potássio em uma dose de 45 g dm<sup>-3</sup> no solo de cada vaso, após o solo ter sido esterilizado por autoclavagem. O Pb foi adicionado ao solo de cada vaso na forma de solução aquosa de acetato de chumbo, nas doses estabelecidas para cada tratamento. O solo foi incubado por aproximadamente 15 dias e, posteriormente, foram retiradas amostras de solo de cada vaso, para análise da fertilidade e teor de Pb disponível (Quadro 1).

### Material biológico

As sementes de *Stizolobium aterrimum* foram esterilizadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 25 % por 10 min; a seguir, foram lavadas com água estéril e imersas em suspensão de rizóbios específicos para *S. aterrimum*, que foram cultivados durante seis dias em meio líquido YMB (Yeast Manitol Broth). Foram colocadas oito sementes por vaso. Foi utilizado inóculo misto de FMA, contendo areia-solo, esporos, hifas e raízes colonizadas de *Brachiararia brizantha*, com aproximadamente 2.700 esporos de

*Glomus etunicatum* (IAC-44) para cada vaso. A inoculação do FMA foi realizada por ocasião da semeadura, a 3 cm de profundidade. Após a emergência foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso.

### Germinação

A germinação das sementes foi acompanhada durante oito dias; a partir dos dados obtidos, foi estimada a porcentagem de germinação, considerando-se como tal a emergência do hipocótilo.

### Coleta do material vegetal

Após 90 dias de crescimento, três plantas de cada tratamento foram coletadas, lavadas, subdivididas em raízes e parte aérea e secas em estufa a 60 °C até atingirem massa constante. As outras quatro plantas de cada tratamento tiveram a quarta folha trifoliolada completamente expandida coletada em N líquido, armazenada a -40 °C, liofilizada e moída. As raízes dessas plantas foram lavadas e armazenadas em frascos com etanol 50 %, para posterior determinação da colonização micorrízica.

### Crescimento, nodulação e colonização micorrízica

Foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: altura, área foliar e massa da matéria seca de partes aéreas, raízes e nódulos. Contou-se o número de nódulos para estimar a nodulação. Após clareamento das raízes de acordo com o método proposto por Phillips & Hayman (1970), a colonização micorrízica foi estimada conforme Giovanetti & Mosse (1980), em microscópio óptico com aumento final de 400x, observando-se 10 campos para cada segmento de 1 cm de raiz.

### Determinações analíticas

A extração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi realizada utilizando-se quatro discos foliares de 0,6 cm de diâmetro da quinta folha trifoliolada completamente expandida em 3,5 mL de dimetilsulfóxido (Hiscox & Israelstam, 1978), e a quantificação desses pigmentos foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 646 e 663 nm, utilizando-se as equações propostas por Lichtenthaler (1987).

Quadro 1. Características químicas do solo após a adição das doses de Pb

| Dose de Pb          | pH  | V  | MO                 | P                   | K <sup>+</sup>                     | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | H + Al | B                   | Cu  | Fe | Mn   | Zn  | Pb   |
|---------------------|-----|----|--------------------|---------------------|------------------------------------|------------------|------------------|--------|---------------------|-----|----|------|-----|------|
| mg dm <sup>-3</sup> |     | %  | g dm <sup>-3</sup> | mg dm <sup>-3</sup> | mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> |                  |                  |        | mg dm <sup>-3</sup> |     |    |      |     |      |
| 0                   | 5,8 | 65 | 15                 | 25                  | 3,0                                | 30               | 5                | 20     | 0,16                | 3,4 | 7  | 11,9 | 0,9 | 0,61 |
| 250                 | 5,8 | 60 | 16                 | 21                  | 2,9                                | 26               | 5                | 22     | 0,18                | 3,8 | 9  | 6,7  | 0,6 | 126  |
| 500                 | 5,8 | 63 | 15                 | 21                  | 2,9                                | 26               | 5                | 20     | 0,17                | 3,6 | 8  | 6,0  | 0,7 | 268  |
| 1000                | 5,7 | 63 | 17                 | 23                  | 2,8                                | 26               | 5                | 20     | 0,16                | 3,8 | 8  | 9,2  | 0,7 | 520  |

Para extração de compostos nitrogenados foram utilizados 10 mg de tecido foliar liofilizado em 3 mL de solução de metanol:clorofórmio:água, na proporção de 12:5:3 (v/v/v), respectivamente, de acordo com Bielecki & Turner (1966). Após uma semana a 4 °C, foi acrescentada uma mistura de clorofórmio e água na proporção de 1:1,5 (v/v), deixando-se em repouso em geladeira por 24 h, para separação de fases. Posteriormente, coletaram-se os 3 mL da fração aquosa-metanólica, que foi seca em concentrador a vácuo e ressuspensa em 500 µL de água deionizada.

O nitrato foi determinado de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975), utilizando-se KNO<sub>3</sub> para a curva-padrão; a amônia foi determinada de acordo com o método descrito por McCullough (1967), utilizando-se (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para a curva-padrão; a concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada de acordo com o método proposto por Cocking & Yemm (1954), utilizando-se leucina para a curva-padrão; e a peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Calmak & Horst (1991).

O teor de P e Pb em raízes e parte aérea foi determinada por espectrometria de emissão em plasma induzida em argônio (ICP-OES), após digestão nítrico-perclórica (Abreu et al., 2000).

### Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e teste de Tukey a 5 %, para comparação de médias entre os tratamentos com e sem inoculação do FMA. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno  $(x/100)^{1/2}$ , e os referentes a contagens, em log (x+1), previamente à análise estatística.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação

A germinação das sementes é um ponto fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas em solos contaminados, além de constituir uma ferramenta para avaliar a tolerância da planta ao contaminante (Di Salvatore et al., 2008). Neste estudo, observou-se que a adição de 500 e 1.000 mg dm<sup>-3</sup> de Pb ao solo atrasou a germinação em três dias, em relação ao tratamento controle. No entanto, após o quarto dia não houve diferenças entre os tratamentos, e a porcentagem final de germinação das sementes nos solos com diferentes concentrações de Pb variou entre 60 e 75 % (Figura 1). A capacidade de germinação em solos com altas concentrações de Pb pode se atribuída ao fato de os tecidos circundantes ao embrião atuarem como uma barreira seletiva à entrada do metal, evitando possíveis danos no embrião (Li et al., 2005).

### Medidas de crescimento

O crescimento é uma das características mais utilizadas para avaliar a tolerância de plantas em ambientes contaminados com MPs (Peralta-Videa et al., 2004; Romeiro et al., 2007; Almeida et al., 2008; Andrade et al., 2008). Diversas características podem ser consideradas no que diz respeito ao crescimento, como altura, área foliar e biomassa do vegetal, as quais são geralmente alteradas pelos contaminantes do solo. O Pb pode alterar diretamente o crescimento dos vegetais, sobretudo das raízes, reduzindo seu comprimento (Di Salvatore et al., 2008) e sua massa (Gopal & Rizvi, 2008). Todos esses indicadores de crescimento, que geralmente são influenciados pela presença de MPs no solo, podem também ser influenciados pela associação das plantas com FMAs, onde eles podem atenuar os efeitos negativos de concentrações excessivas de metais no solo sobre o crescimento vegetal (Andrade et al., 2004, 2010). Os FMAs têm demonstrado aliviar o estresse causado por MPs em plantas (Hildebrandt et al., 2007). Os mecanismos pelos quais a micorriza arbuscular atenua o efeito do MP na planta hospedeira em solos contaminados compreendem a imobilização de MPs na parede celular das hifas intra ou extrarradicais, a melhoria no estado nutricional da planta e a quelação de MPs no solo por uma glicoproteína insolúvel chamada glomalina, que é excretada em grande quantidade no solo pelos FMAs, o que pode diminuir a disponibilidade do metal às plantas (González-Chávez et al., 2004).

Neste estudo, observou-se que a micorrização da mucuna-preta teve efeito positivo significativo no crescimento somente em plantas cultivadas em solos com adição de 500 mg dm<sup>-3</sup> de Pb, aumentando a área foliar e a produção de massa da matéria seca da parte aérea; no entanto, a altura e a massa seca de raízes não foram influenciadas pela associação micorrízica (Quadro 2).

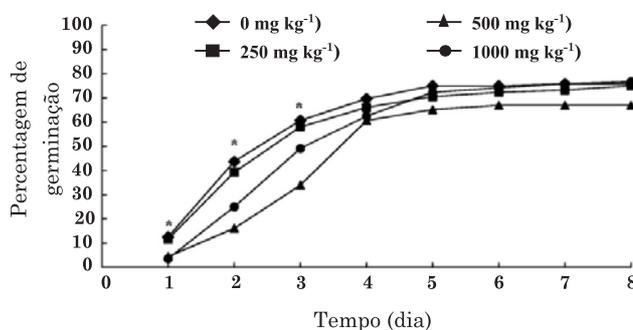


Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes de *Stizolobium aterrimum* em resposta ao aumento da dose de Pb no solo. (\*: diferença significativa entre tratamentos com diferentes doses de Pb).

**Quadro 2.** Altura, área foliar, massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M) ou não micorrizadas (NM) e cultivadas em solo com adição de doses crescentes de Pb

| Pb                  | Altura |        | Área foliar     |        | MSPA           |        | MSR    |        |
|---------------------|--------|--------|-----------------|--------|----------------|--------|--------|--------|
|                     | NM     | M      | NM              | M      | NM             | M      | NM     | M      |
| mg dm <sup>-3</sup> | m      |        | cm <sup>2</sup> |        | g              |        |        |        |
| 0                   | 2,11 a | 2,14 a | 1671 a          | 1670 a | 7,56 a         | 7,60 a | 1,43 a | 1,60 a |
| 250                 | 2,12 a | 1,92 a | 1298 a          | 1033 a | 5,80 a         | 4,83 a | 1,36 a | 1,00 a |
| 500                 | 1,90 a | 2,06 a | 823 b           | 1376 a | 3,93 a         | 6,63 a | 1,00 a | 1,16 a |
| 1000                | 2,06 a | 2,16 a | 1116 a          | 1177 a | 5,66 a         | 5,36 a | 1,36 a | 1,00 a |
| Regressão           | ns     | ns     | x <sup>2</sup>  | ns     | x <sup>2</sup> | ns     | ns     | ns     |
| Significância       | ns     | ns     | **              | ns     | **             | ns     | ns     | ns     |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Análise de regressão: não significativa (ns), linear (x) e quadrática (x<sup>2</sup>). Significância: \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

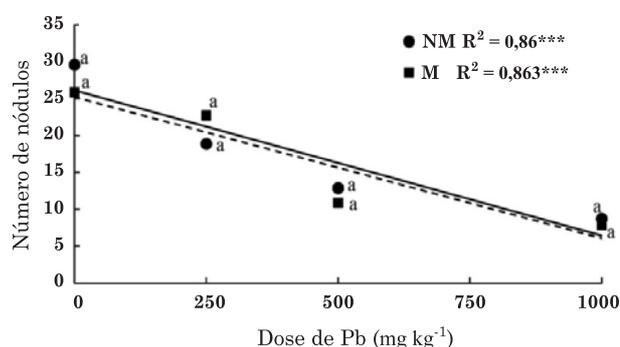
Embora esteja bem documentado que a micorrização melhora o estado nutricional das plantas hospedeiras (Rashid et al., 2008; Andrade et al., 2009), esse resultado benéfico depende das espécies do fungo e da planta envolvida na associação. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Jankong & Visoottiviseth (2008), que, utilizando três espécies de *Glomus*, observaram que a produção de matéria seca de plantas micorrizadas de *Tagetes erecta* cultivadas em solo contaminado com As não diferiu da matéria seca produzida por plantas não micorrizadas. Por outro lado, no mesmo experimento, plantas de *Melastoma malabathricum* apresentaram produção de biomassa muito maior quando micorrizadas. Esse tipo de observação é importante quando há interesse no uso de microrganismos simbióticos em programas de fitorremediação de áreas contaminadas; avaliar as espécies de FMA que trazem maiores benefícios quando associadas a uma determinada espécie de planta pode, conseqüentemente, aumentar a eficiência da fitorremediação.

### Associações simbióticas

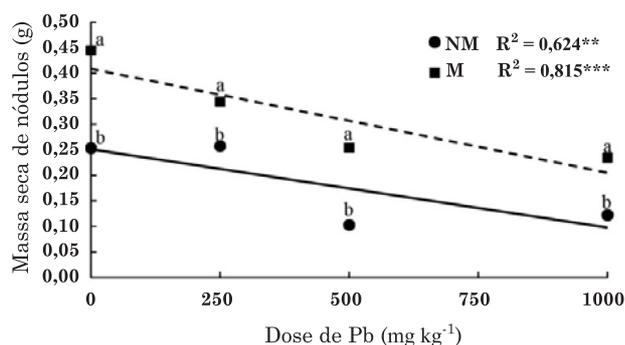
A simbiose com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foi reduzida drasticamente com o incremento do Pb no solo. Assim, em solos com adição da maior dose de Pb, a nodulação teve aproximadamente 70 % de redução em raízes de plantas micorrizadas ou não. Além disso, a produção de massa da matéria seca dos nódulos de plantas cultivadas no solo com 1.000 mg dm<sup>-3</sup> de Pb foi reduzida em aproximadamente 50 % em relação aos nódulos de plantas crescendo no solo controle, tanto em plantas micorrizadas como em não micorrizadas (Figuras 2 e 3). Wani et al. (2008), em experimento com solo contaminado com Cu, também observaram redução na nodulação em plantas de ervilha, a qual foi acompanhada pela redução da massa de nódulos, assim como Andrade et al. (2004), que também observaram redução da nodulação em soja cultivada em solo contaminado com Pb. A redução

da nodulação possivelmente deve-se ao efeito tóxico dos MPs diretamente sobre os microrganismos do solo, reduzindo o processo de infecção, como explicado por Giller et al. (1998). Já a redução da massa da matéria seca dos nódulos formados possivelmente esteja relacionada às alterações metabólicas, tanto nas células radiculares como nas bactérias, que acarretam prejuízos ao desenvolvimento da estrutura simbiótica.

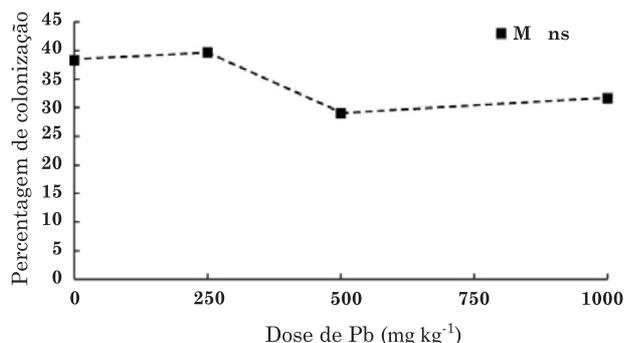
Embora existam relatos de que a presença de MPs no solo pode reduzir a colonização micorrízica, como reportado por Rabie (2005a) em plantas de trigo e feijão em solo contaminado com Zn, Cu, Pb e Cd, no presente estudo não foi observada redução significativa da colonização micorrízica (Figura 4). Esse resultado pode sugerir que o estabelecimento intrarradical de *G. etunicatum* foi relativamente tolerante à presença de altas concentrações de Pb no solo.



**Figura 2.** Formação de nódulos radiculares em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Significância: \*\*\* p < 0,001.



**Figura 3.** Massa de matéria seca de nódulos de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Significância: \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 4.** Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* em resposta ao incremento da dose de Pb no solo. (ns: regressão não significativa).

### Pigmentos fotossintéticos

O Pb pode alterar a síntese de clorofilas, já que esse metal pode interferir na absorção de Fe e Mg e,

assim, inibir a síntese dessas moléculas (Drazkiewicz, 1994). No entanto, o teor desses pigmentos não foi alterado pelo incremento do Pb no solo em *S. aterrimum* associada a FMAs ou não. Em outro estudo, conduzido com mudas de arroz utilizando Cd nas concentrações de 10, 100 e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , observou-se redução dos teores de clorofila *a* e *b* e da razão clorofila *a/b* (He et al., 2006), sugerindo que a síntese de clorofila *a* é mais sensível ao excesso de Cd do que a síntese de clorofila *b*.

Os carotenoides são pigmentos acessórios com diversas funções celulares e que atuam principalmente no processo de fotossíntese, onde auxiliam como: antioxidantes não enzimáticos, dissipadores do excesso de energia luminosa e coletores de energia luminosa que é canalizada ao fotossistema (McElroy & Kopsell, 2009). O conteúdo de carotenoides não foi influenciado pela adição de doses crescentes de Pb ao solo; de maneira geral, MacFarlane & Burchett (2001) também não observaram alterações no teor de carotenoides em folhas de *Avicennia marina* na presença de altos teores de Pb. Assim, demonstrou-se que a associação da mucuna-preta com o FMA *G. etunicatum* não influenciou significativamente o conteúdo de pigmentos fotossintéticos nas folhas (Quadro 3).

### Utilização de formas de nitrogênio

Diversas enzimas estão envolvidas no processo de assimilação de N pelas plantas, e as atividades dessas enzimas podem ser alteradas pela presença de MPs no solo (Wang et al., 2008). O acúmulo de nitrato nos tecidos pode ser um dos principais indícios de que um determinado MP, como já constatado para o Cd e o Cr, está reduzindo a atividade da enzima nitrato redutase (Rai et al., 2004; Wahid et al., 2007). Entretanto, no presente estudo, o Pb parece não ter alterado essa enzima em *S. aterrimum*, pois o teor de nitrato foliar não foi influenciado pela adição de doses crescentes de Pb no solo (Figura 5). A inoculação do FMA também não influenciou significativamente o

**Quadro 3.** Teor de clorofila *a*, *b*, razão clorofila *a/b* e carotenoides totais em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) crescendo em solo contaminado com Pb

| Dose de Pb          | Clorofila <i>a</i>              |        | Clorofila <i>b</i> |        | Razão Clr. <i>a/b</i> |        | Carotenóides |        |
|---------------------|---------------------------------|--------|--------------------|--------|-----------------------|--------|--------------|--------|
|                     | NM                              | M      | NM                 | M      | NM                    | M      | NM           | M      |
| mg dm <sup>-3</sup> | — $\mu\text{g mg}^{-1}$ de MF — |        |                    |        |                       |        |              |        |
| 0                   | 0,78 a                          | 0,92 a | 0,26 a             | 0,28 a | 3,00 a                | 3,28 a | 0,35 a       | 0,39 a |
| 250                 | 0,78 a                          | 0,76 a | 0,24 a             | 0,23 a | 3,25 a                | 3,30 a | 0,33 a       | 0,33 a |
| 500                 | 0,72 b                          | 0,87 a | 0,23 a             | 0,27 a | 3,13 a                | 3,22 a | 0,31 a       | 0,38 a |
| 1000                | 0,89 a                          | 0,87 a | 0,25 a             | 0,24 a | 3,56 a                | 3,62 a | 0,37 a       | 0,37 a |
| Regressão           | ns                              | ns     | ns                 | ns     | ns                    | ns     | ns           | ns     |
| Significância       | ns                              | ns     | ns                 | ns     | ns                    | ns     | ns           | ns     |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. (ns: regressão não significativa).

teor de nitrato foliar, já que não foram observadas diferenças entre plantas não micorrizadas e micorrizadas (Figura 5).

A fixação biológica de N foi avaliada por meio da determinação da atividade da nitrogenase. Observou-se que a atividade dessa enzima em plantas micorrizadas foi estimulada até a dose de 500 mg dm<sup>-3</sup> e diminuiu na dose de 1.000 mg dm<sup>-3</sup> Pb, seguindo um ajuste quadrático. A atividade nitrogenase de nódulos de plantas crescendo nas doses de 500 e 1.000 mg dm<sup>-3</sup> Pb foi maior em plantas micorrizadas que em não micorrizadas (Figura 6). Semelhantemente ao observado por Balestrasse et al. (2003) em plantas de soja sob estresse por Cd, aquelas não micorrizadas apresentaram pequena redução na atividade da

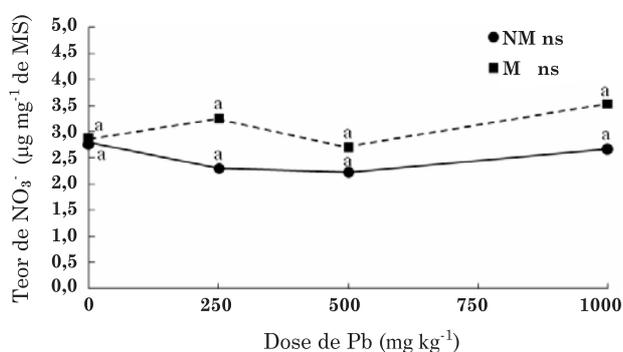


Figura 5. Teor de nitrato em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. ns: regressão não significativa.

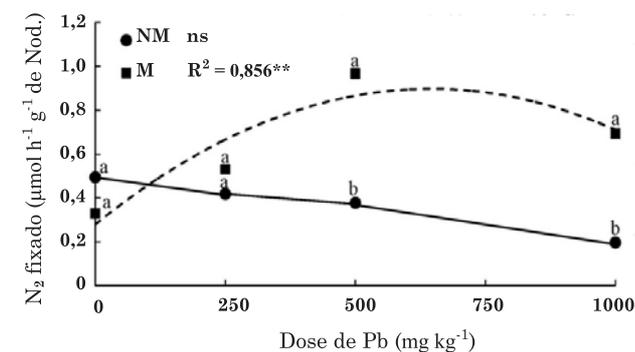


Figura 6. Atividade da nitrogenase em nódulos de raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. ns: regressão não significativa.

nitrogenase, evidenciando que diferentes MPs podem causar efeito negativo sobre a fixação biológica de N. Como demonstrado por Rabie (2005b) em plantas de *Vigna radiata* sob condições de estresse salino e por Frason et al. (1991) em plantas de soja sob estresse hídrico, a micorrização estimulou a atividade da nitrogenase nessas plantas. Frason et al. (1991) sugerem que plantas micorrizadas sob condições de estresse abiótico podem apresentar melhor desempenho na fixação de N<sub>2</sub> em função, possivelmente, do maior suprimento de P fornecido aos nódulos pela associação com FMAs, uma vez que o processo de fixação de N<sub>2</sub> tem alta demanda de energia.

O produto direto, utilizável pela planta, da atividade da enzima nitrogenase a amônia (NH<sub>3</sub>), a qual é assimilado pela via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase) nos aminoácidos (Coruzzi, 2008). A concentração de amônia nas folhas de mucuna-preta aumentou até a dose de 500 mg dm<sup>-3</sup>, e na dose de 1.000 mg dm<sup>-3</sup> a sua concentração reduziu, seguindo um ajuste quadrático (Figura 7). Pode-se sugerir que, possivelmente, o acúmulo de NH<sub>3</sub> tenha ocorrido devido ao estímulo da fixação de N<sub>2</sub> e a uma eventual redução da atividade das enzimas da via GS/GOGAT, embora o aumento dos teores de amônia também possa estar relacionado ao aumento da atividade de proteases, induzindo a degradação de proteínas (Chiraz et al., 2003).

### Peroxidação de lipídeos

A presença de teores excessivos de MPs pode aumentar a geração de espécies reativas de O<sub>2</sub>, induzindo a peroxidação dos lipídeos das membranas. Uma maneira comum de avaliar esse tipo de estresse é pela determinação da concentração de malondialdeído

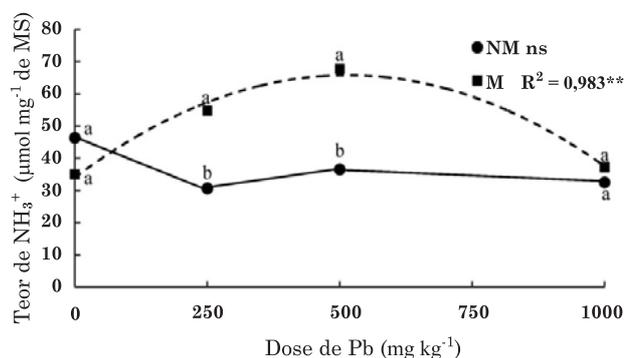


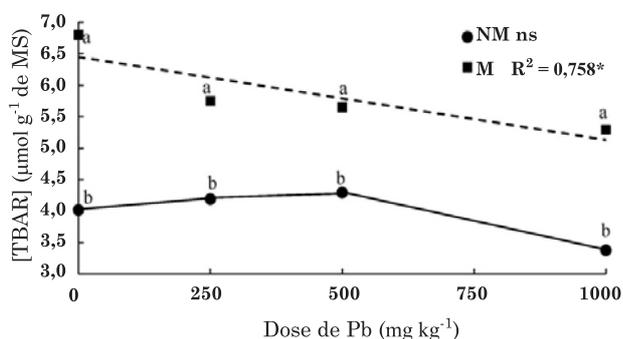
Figura 7. Teor de amônia em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. \*\* p < 0,001; ns: regressão não significativa.

(MDA) formado como produto da peroxidação lipídica das membranas. Embora o Pb não seja um metal oxidorredutor, a indução de estresse oxidativo parece ocorrer de maneira indireta, aumentando a produção de formas reativas de  $O_2$  (Sharma & Dubey, 2005). Neste experimento, constatou-se que, de modo geral, folhas de plantas micorrizadas apresentaram maiores teores de MDA que as de plantas não micorrizadas e que em plantas micorrizadas houve decréscimo muito leve, mas significativo, no teor de MDA foliar em função do incremento de Pb no solo (Figura 8).

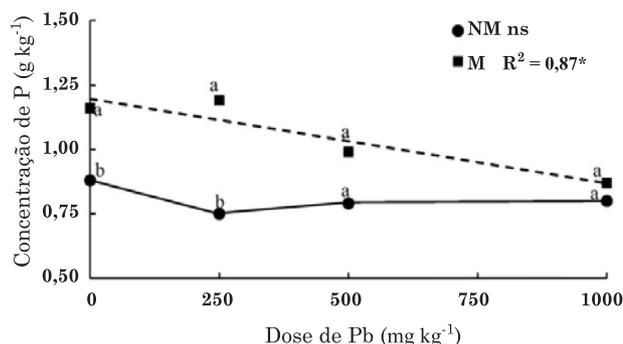
Esses resultados diferem dos encontrados por Dey et al. (2007), que observaram aumento gradativo de MDA tanto em raízes como em folhas de plantas de trigo submetidas a doses crescentes de Pb. O excesso de Pb nos tecidos vegetais pode gerar estresse oxidativo e induzir a atividade das enzimas do sistema antioxidante (Gratão et al., 2005), como a superóxido dismutase, guaiacol peroxidases, ascorbato peroxidase, glutatona redutase, ou inibir a atividade de catalase (Sharma & Dubey, 2005). A redução dos níveis de MDA em plantas micorrizadas pode ter ocorrido devido à indução da atividade de tais enzimas, que atuam no controle de espécies reativas de  $O_2$ .

### Absorção de fósforo

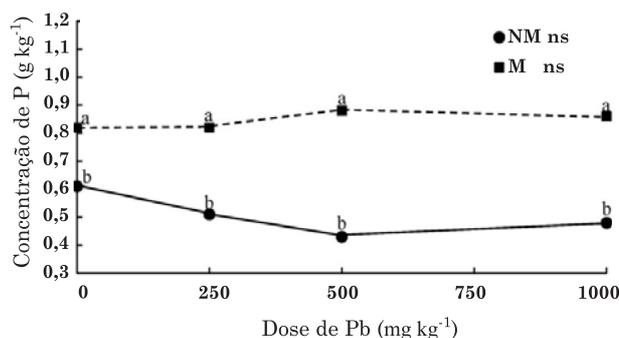
A micorrização favoreceu a absorção de P por *S. atterimum* no tratamento controle e com adição de  $250 \text{ mg dm}^{-3}$  de Pb, com menores teores de P em parte aérea e raízes de plantas não micorrizadas (Figuras 9 e 10). O incremento de Pb no solo alterou o teor de P na parte aérea das plantas micorrizadas. Em plantas que cresceram no solo com adição de  $1.000 \text{ mg dm}^{-3}$  de Pb houve redução de 25 % no teor de P, e a análise da regressão seguiu ajuste linear (Figura 9). No



**Figura 8.** Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em folhas de plantas de *Stizolobium atterimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. \*  $p < 0,05$ ; ns: regressão não significativa.



**Figura 9.** Teor de P em parte aérea de plantas de *Stizolobium atterimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. \*  $p < 0,05$ ; ns: regressão não significativa.



**Figura 10.** Teor de P em raízes de plantas de *Stizolobium atterimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. \*  $p < 0,05$ ; ns: regressão não significativa.

entanto, o teor de P nas raízes não foi influenciada significativamente pelo incremento de Pb no solo.

A associação com FMAs oferece benefícios consideráveis em termos de crescimento e absorção de nutrientes (Gosling et al., 2006). O presente estudo mostrou que plantas de mucuna-preta micorrizadas absorveram maior quantidade de P do que as não micorrizadas, mesmo quando cultivadas em solos com altos teores de Pb. Outros trabalhos corroboram os resultados observados por Andrade et al. (2004) em soja crescendo em solo contaminado com Pb. A redução do teor de P em parte aérea de plantas micorrizadas possivelmente pode ocorrer em função da redução da eficiência da micorrização, como reportado por Andrade et al. (2003), que obtiveram resposta semelhante à descrita no presente trabalho.

### Acúmulo de chumbo

As plantas responderam ao aumento das doses de Pb incrementando linearmente o teor desse elemento tanto em parte aérea como em raízes (Figuras 11 e 12).

Apesar de as plantas terem aumentado a absorção de Pb em resposta ao aumento das doses deste no solo, as concentrações desse MP na parte aérea não alcançaram valores considerados típicos de plantas hiperacumuladoras: 1.000 mg kg<sup>-1</sup> de matéria seca (Lombi et al., 2001). Entretanto, as plantas de *S. aterrimum* mostraram-se boas candidatas para sua utilização em técnicas de fitoestabilização, já que na maior dose de Pb adicionada ao solo elas acumularam

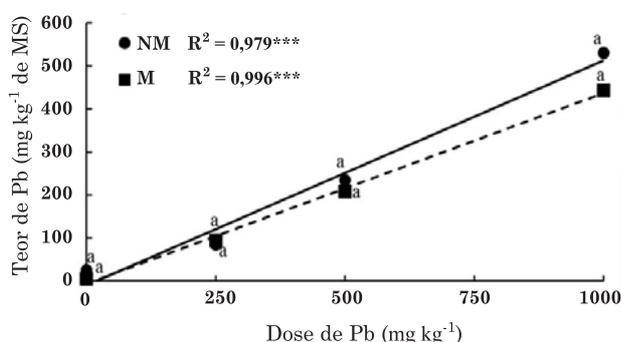


Figura 11. Teor de Pb em parte aérea de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *Glomus etunicatum* em resposta ao incremento da dose de Pb no solo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – massa de matéria seca. \*\*\* p < 0,001).

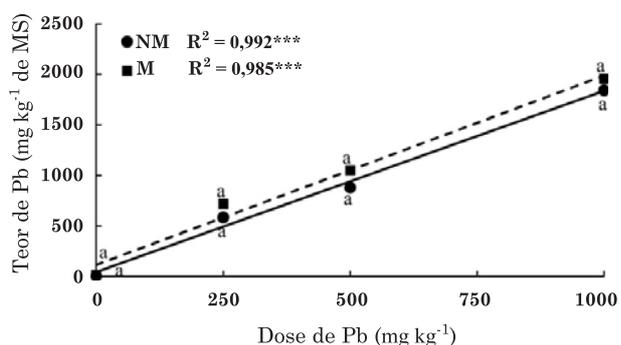


Figura 12. Teor de Pb em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *Glomus etunicatum* em resposta ao incremento da dose de Pb no solo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – massa de matéria seca. \*\*\* p < 0,001).

aproximadamente 2.000 mg kg<sup>-1</sup> de Pb na matéria seca da raiz.

Sabe-se que a associação micorrízica, além de sua influência sobre a nutrição mineral da planta, pode produzir substâncias estimuladoras do crescimento vegetal, aumentando a produção de matéria seca, o que pode ser uma característica favorável em programas de fitorremediação (Khan et al., 2000). Contudo, nas condições do presente trabalho, a colonização micorrízica não influenciou significativamente nem o crescimento nem a absorção de Pb por *S. aterrimum*. Alguns estudos mostram que a associação com FMA pode aumentar a absorção de MPs (Joner & Leyval, 1997; Khan et al., 2000), mas redução na absorção de MPs também tem sido relatada (Heggo et al., 1990). Esses resultados podem ser decorrentes das diferenças nas espécies de microssimbiontes e hospedeiros envolvidos na associação simbiótica, pois sabe-se que ecótipos de FMAs procedentes de áreas contaminadas têm maior tolerância a altos teores de metais e podem ser mais eficientes na contribuição da tolerância da planta (Galli et al., 1994). O Pb acumulou-se principalmente nas raízes, porém em plantas não micorrizadas no solo controle houve maior presença de Pb na parte aérea, ao passo que em plantas micorrizadas o transporte de Pb à parte aérea foi reduzido (Figura 13).

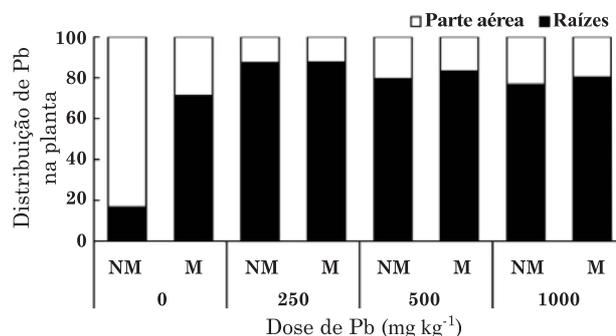


Figura 13. Distribuição de Pb nas raízes e órgãos aéreos de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M)

## CONCLUSÃO

*Stizolobium aterrimum* possui boa tolerância ao Pb e pode ser indicada como fitoestabilizadora de solos contaminados com este elemento.

## LITERATURA CITADA

ABREU, M.F.; ABREU, C.A.; BATAGLIA, O.C. & MARQUES, J.C. Protocolo analítico para caracterização química de substrato para plantas. Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em solos e recursos ambientais - Instituto Agronômico de Campinas, 2000.

- ALMEIDA, E.L.D.; MARCOS, F.C.C.; SCHIAVINATO, M.A.; LAGÔA, A.M.M.A. & ABREU, M.F. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia*, 67:569-576, 2008.
- ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F. & SILVEIRA, A.P.D. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:945-954, 2003.
- ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; DE ABREU, M.F. & SILVEIRA, A.P.D. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.*, 26:123-131, 2004.
- ANDRADE, S.A.L.; DA SILVEIRA, A.P.D.; JORGE, R.A. & DE ABREU, M.F. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *Inter. J. Phytoremediat.*, 10:1-13, 2008.
- ANDRADE, S.A.L.; GRATÃO, P.L.; AZEVEDO, R.A.; SILVEIRA, A.P.D.; SCHIAVINATO, M.A. & MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ. Exper. Bot.*, 68:18-207, 2010.
- ANDRADE, S.A.L.; GRATAO, P.L.; SCHIAVINATO, M.A.; SILVEIRA, A.P.D.; AZEVEDO, R.A. & MAZZAFERA, P. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere*, 75:1363-1370, 2009.
- ANDRADE, S.A.L.D. & SILVEIRA, A.P.D.D. Biomassa e atividade microbiana do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39:1191-1198, 2004.
- BALESTRASSE, K.B.; BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M. & TOMARO, M.L. Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Funct. Plant Biol.*, 30:57-64, 2003.
- BIELESKI, R.L. & TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.*, 17:278-293, 1966.
- CALMAK, I. & HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 83:463-468, 1991.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRANDER, L.E. & YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 6:71-80, 1975.
- CHEN, H.M.; ZHENG, C.R.; TU, C. & SHEN, Z.G. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 41:229-234, 2000.
- CHIRAZ, C.; HOUDA, G. & HABIB, G.M. Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. *J. Plant Nutr.*, 26:1617-1634, 2003.
- COCKING, E.C. & YEMM, E.W. Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochem. J.*, 58:12-12, 1954.
- CORUZZI, G.M. Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book - Am. Soc. Plant Biol.*:1-17, 2008.
- DEY, S.K.; DEY, J.; PATRA, S. & POTHAL, D. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19:53-60, 2007.
- DI SALVATORE, M.; CARAFA, A.M. & GARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere.*, 73:1461-1464., 2008.
- DRAZKIEWICZ, M. Chlorophyll-ocurrence, functions, mechanisms of action and external factors. *Photosynthetica*, 30:321-331, 1994.
- FRASON, R.L.; BROWN, M.S. & BETHLENFALVAY, G.J. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium symbiosis*. XI. Nodule gas exchange and efficiency as a function of soil and root water status in mycorrhizal soybeans. *Physiol. Plant.*, 83:476-482, 1991.
- GALLI, U.; SCHUEPP, H. & BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.*, 92:364-368, 1994.
- GILLER, K.E.; WITTER, E. & MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1389-1414, 1998.
- GIOVANETTI, M. E. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:482-500., 1980.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S.F. & NICHOLS, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.*, 130: 317-323, 2004.
- GOPAL, R. & RIZVI, A.H. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere*, 70:1539-1544, 2008.
- GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G. & BENDING, G.D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 113:17-35, 2006.
- GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.T.; LEA, P.J. & AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17:53-64, 2005.
- HE, H.; ZHITING, X.; MINJING, L.; SHUANGLIAN, X.; SHENGLAN, L. & MBA, F.O. Effect of cadmium and herbicides on the growth, chlorophyll and soluble sugar content in rice seedlings. *Wuh. Univers. J. Nat. Sci.*, 11:742-748, 2006.
- HEGGO, A.; ANGLE, J.S. & CHANEY, R.L. Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on heavy-metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.*, 22:865-869, 1990.

- HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M. & BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68:139-146, 2007.
- HISCOX, J.D. & ISRAELSTAM, F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, 57:1332-1334, 1978.
- JANKONG, P. & VISOOTTIVISETH, P. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere*, 72:1092-1097, 2008.
- JONER, E.J. & LEYVAL, C. Uptake of Cd-109 by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytol.*, 135:353-360, 1997.
- KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S. & HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41:197-207, 2000.
- LI, W.; KHAN, M.A.; YAMAGUCHI, S. & KAMIYA, Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.*, 46:45-50, 2005.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.*, 148:350-382, 1987.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; DUNHAM, S.J. & MCGRATH, S.P. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation *versus* chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.*, 30: 1919-1926., 2001.
- MACFARLANE, G.R. & BURCHETT, M.D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar. Pollut. Bull.*, 42:233-240, 2001.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 17:297-304, 1967.
- MCELROY, J.S. & KOPSELL, D.A. Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.*, 37:327-333, 2009.
- OLIVEIRA, D.M.; CARA, D.V.C.; XAVIER, P.G.; SOBRAL, L.G.S.; LIMA, R.B. & ALMEIDA, A.L. Fitorremediação: O estado da arte. Rio de Janeiro, CETEM/MCT, 2006. (Série Tecnologia Ambiental, 34)
- PÄIVÖKE, A.E.A. Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*. *Environ. Exper. Bot.*, 48:61-73, 2002.
- PERALTA-VIDEA, J.R.; DE LA ROSA, G.; GONZALEZ, J.H. & GARDEA-TORRESDEY, J.L. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Adv. Environ. Res.*, 8:679-685, 2004.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. British. Mycol. Soc.*, 55:158-161, 1970.
- PIECHALAK, A.; TOMASZEWSKA, B. & BARALKIEWICZ, D. Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry*, 64:1239-1251, 2003.
- RABIE, G.H. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African J. Biotechnol.*, 4:332-345, 2005a.
- RABIE, G.H. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. *Mycorrhiza*, 15:225-230, 2005b.
- RAI, V.; VAJPAYEE, P.; SINGH, S.N. & MEHROTRA, S. Effects of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Sci.*, 167:1159-1169, 2004.
- RASHID, A.; AYUB, N.; AHMAD, T.; GUL, J. & KHAN, A.G. Phytoaccumulation prospects of cadmium and zinc by mycorrhizal plant species growing in industrially polluted soils. *Environ. Geochem. Health*, 31:91-98, 2008.
- RENELLA, G.; LANDI, L. & NANNIPIENI, P. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122:311-315, 2004.
- ROMEIRO, S.; LAGÔA, A.M.M.A.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A.D. & PEREIRA, B.F.F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, 66:327-334, 2007.
- SANTOS, F.S.D.; MAGALHÃES, M.O.L.; MAZUR, N. & SOBRINHO, N.M.B.A. Correção química e fito-estabilização de um resíduo industrial contaminado com Zn e Cd. *Sci. Agric.*, 64:506-512, 2007.
- SHARMA, P. & DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17:35-52, 2005.
- TUIN, B.J.W. & TELS, M. Removing heavy metals from contaminated clay soils by extraction with hydrochloric acid, edta or hypochlorite solutions. *Environ. Technol.*, 11:1039-1052, 1990.
- WAHID, A.; GHANI, A.; ALI, I. & ASHRAF, M.Y. Effects of cadmium on carbon and nitrogen assimilation in shoots of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seedlings. *J. Agron. Crop Sci.*, 193:357-365, 2007.
- WANG, L.; ZHOU, Q.X.; DING, L.L. & SUN, Y.B. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *J. Hazard. Mater.*, 154:818-825, 2008.
- WANI, P.A.; KHAN, M.S. & ZAIDI, A. Effects of heavy metal toxicity on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake in pea grown in metal amended soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 81:152-158, 2008.

