

JOSÉ PAULO QUEIROZ PRADO JUNIOR

**Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar IAC87-3396:
crescimento em ambiente com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb
“*in situ*” e “*in vitro*”**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Enedi Boaretto

**Piracicaba
2012**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Prado Junior, José Paulo Queiroz

Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar: crescimento em ambiente com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb “*in situ*” e “*in vitro*” / José Paulo Queiroz Prado Junior, orientador Antonio Enedi Boaretto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

63 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Fitorremediação 2 Fixação de nitrogênio 3. Metal pesado do solo
4. Microbiologia agrícola 5. Poluição do solo 6. Relação solo-plantas I. Título

CDU 633.61 : 631.461.5

A minha família

José Paulo, Vaima e Erick

DEDICO

A Lee Tseng Sheng Gerald
e Raffaella Rossetto

OFEREÇO

“Estamos testemunhando o fim da era da ferra dos recursos naturais”

Kamyar Enshayan

AGRADECIMENTOS

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos funcionários da Pós-Graduação do CENA-USP, do APTA Centro Sul-Piracicaba, Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFSCar-Araras, Laboratório de Biotecnologia CATI-Tiete, Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas CENA e Laboratório de Biologia Molecular e Celular CENA;

Aos técnicos: Vitória S. Severo, Henriqueta Maria Gimenes Fernandes e Benedito Mota;

A bibliotecária chefe do CENA-USP Marília Ribeiro Garcia Henyei pela formatação da tese;

Aos mestres: Prof. Dr. Cássio Hamilton Abreu Junior e Dr. Vitor Araújo;

Aos amigos Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald que me acompanhou em toda minha carreira acadêmica e me incentivou a trabalhar com BFN em cana-de-açúcar e Dra. Raffaella Rossetto um verdadeiro anjo que apareceu em minha vida;

Ao meu verdadeiro companheiro Biudo que esteve sempre ao meu lado nos desafios de ser tornar um agricultor;

As pessoas mais importantes de minha vida: José Paulo Queiroz Prado, Vaima Maria Alberto Queiroz Prado e Erick Alberto Queiroz Prado;

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar IAC87-3396: crescimento em ambiente com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb “in situ” e “in vitro”.** 2012. 63 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a concentração de Cd, Pb, Cr e Ni nos tecidos da cana-de-açúcar, constatar a presença de bactérias endofíticas na variedade IAC87-3396 cultivada em ambiente com altas concentrações de metais, analisar a extração de metais pela planta e avaliar a tolerância das bactérias a metais pesados “in situ” e “in vitro”. A cana-de-açúcar IAC87-3396 foi cultivada em área com altos teores de metais. Antes do plantio foram aplicados 5 mitigadores de metais pesados. Para detecção e quantificação de níquel, chumbo, cromo e cádmio foram realizadas análises em ICP-MS em amostras de tecidos da cana-de-açúcar (folha +1, raízes e tolete pré-germinado) obtidos na colheita da cana planta e cana soca. A quantificação das bactérias foram realizadas em amostras da parte aérea e das raízes, da cana-planta (colheita) e da cana-soca (6 meses e colheita), utilizando a metodologia do tolete pré-germinado. O ensaio “in vitro” consistiu em acrescentar ao meio de cultura 4 concentrações de Pb, Cd, Ni e Cr inseridos isoladamente e em combinações e proceder a inoculação em placa de petri de 4 bactérias (*Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*). O comportamento nas diferentes concentrações foi avaliado atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento. Para os metais, a maior concentração foi encontrada nas raízes e a menor foi encontrado na folha +1. No campo os valores da folha +1 aumentaram da cana planta para a cana soca e os valores das raízes diminuíram. Comparando campo e tolete pré-germinado, na cana planta a concentração nas raízes foi menor do que o encontrado no campo e na parte aérea o tolete teve uma concentração maior para o Ni e Cd. Na cana soca o campo possui as maiores concentrações tanto para parte aérea como para raízes. A extração média de metais somando Ni, Pb, Cr e Cd presentes nas folhas e colmos da cana foi de 1439,4 g ha⁻¹. Na quantificação das bactérias, a comparação entre os períodos mostrou que a quantificação no geral é maior na cana planta e na colheita da cana soca existe uma distribuição mais uniforme das bactérias no interior da planta. No ensaio “in vitro” a concentração máxima de metais tolerada foi a máxima estudada para Pb, Cd e Ni. O Cr e a associação entre 2, 3 e 4 metais proporcionaram o não crescimento das bactérias. Para a maior parte das bactérias houve associação significativa entre os padrões de crescimento e as concentrações de metais no meio de cultura. Na variedade IAC87-3396 foram encontrados os 4 gêneros de BFN, mesmo nas raízes onde os teores de Pb, Ni, Cr e Cd foram maiores. A tolerância das BFN aos metais “in situ” diferiu da “in vitro”. O cromo e a associação entre os metais limitaram o crescimento “in vitro” de todas as bactérias. A metodologia do tolete pré-germinado não refletiu as condições de concentração de metais em materiais coletados no campo. A cana não tem potencial para ser uma cultura fitoextratora de Pb, Ni, Cr e Cd.

Palavras-chave: Tolerância a metais. Metais pesados. Bactérias Diazotróficas. Fitoextração.

ABSTRACT

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Endophytic bacteria in sugarcane IAC87-3396:** grown in an environment with high concentration of Cd, Cr, Ni and Pb "*in situ*" and "*in vitro*". 2012. 63 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The objectives of this study were to evaluate the concentration of Cd, Pb, Cr and Ni in the tissues of sugarcane, noting the presence of the endophytic bacteria in IAC87-3396 variety grown in contaminated environment, analyze the extraction of metal by plants and evaluate the BFN tolerance to heavy metals "*in situ*" and "*in vitro*". Sugarcane variety IAC87-3396 was grown in an soil contaminated by metals. Before planting, five mitigators of heavy metals were applied. Analysis were performed to detect nickel, lead, chromium and cadmium in tissues of sugarcane, including leaf +1, roots and pre-germinated sett (shoot and root) at harvest of the plant cane and ratoon cane. To quantify the nitrogen-fixing bacteria, three tests were performed comprising the shoots and roots, one in the plant cane (at harvest) and two in ratoon cane (6 months and harvesting) using the methodology of pre-germinated sett. The test "*in vitro*" consisted of adding to the culture medium Pb, Cd, Ni, Cr, mixed metals and inoculated in a petri dish of 4 bacteria (*Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense* and *Burkholderia tropica*). The behavior in different concentrations was evaluated by assigning values to different growth patterns. For all metals, the highest concentration was found in the roots and the lowest values were found in leaf +1. This values in leaf +1 increased from plant cane to ratoon cane while in root it decreased. In relation to the pre-germinated sett, metal concentration in root of plant cane was lower than that found in the field while the leaf had a higher concentration only for Ni and Cd. The field ratoon cane has the highest concentrations for both the aerial and root part. For the quantification of bacteria, the comparison between the measurement periods showed that in general it is greater in the plant cane and at harvest of the ratoon crop a more uniform distribution of bacteria was found inside the plant. The average extraction of metals in the leaves and stems in the sugarcane adding Ni, Pb, Cr and Cd was 1439,4 g ha⁻¹. In the "*in vitro*" essay the maximum concentration studied was the maximum tolerated for Pb, Cd and Ni. The association between Cr and 2, 3 and 4 metals provided no growth of bacteria. For most of the bacteria a significant association was found between growth patterns and concentrations of metals in the culture medium. All the four kinds of NFB were found in IAC87-3396 even in roots where the levels of Pb, Ni, Cr and Cd were high. The tolerance of the NFB to these metals "*in situ*" is different from that "*in vitro*". The chromium and its association with other metals have limited growth "*in vitro*" of all bacteria. The methodology of pre-germinated sett did not reflect the conditions of metal concentration in material collected in the field. Sugarcane hasn't the potential to be a culture of phytoextraction of Pb, Ni, Cr and Cd.

Key-words: Tolerance to metals. Heavy metals. Diazotrophs bacteria. Phytoextraction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração (mg kg^{-1}) de níquel e cromo após a aplicação na cana-de-açúcar (JAIN et al., 2004).....	22
Tabela 2 -	Valores de intervenção e teor total de metais no solo e nos mitigadores..	27
Tabela 3 -	Produtividade da cana planta nos diversos tratamentos mitigadores.....	33
Tabela 4 -	Teores (mg kg^{-1}) de níquel e chumbo determinados na folha +1 e raízes da cana coletadas no campo em duas épocas.....	34
Tabela 5 -	Teores (mg kg^{-1}) de cromo e cádmio determinados na folha +1 e raízes da cana coletadas no campo em duas épocas.....	35
Tabela 6 -	Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre cana planta e cana soca provenientes de materiais coletados no campo.....	35
Tabela 7 -	Teores (mg kg^{-1}) de níquel e chumbo na parte aérea e raízes dos toletes pré-germinados em duas épocas.....	36
Tabela 8 -	Teores (mg kg^{-1}) de cromo e cádmio na parte aérea e raízes dos toletes pré-germinados em duas épocas.....	37
Tabela 9 -	Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre cana planta e cana soca provenientes do tolete pré-germinado.....	37
Tabela 10 -	Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre campo e tolete pré-germinado provenientes de materiais coletados na cana planta.....	38
Tabela 11 -	Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre campo e tolete pré-germinado provenientes de materiais coletados na cana soca.....	38
Tabela 12 -	Produção de folhas (kg ha^{-1}) e extração de metais (g ha^{-1}) na cana planta.....	39
Tabela 13 -	Produção de colmos (kg ha^{-1}) e extração de metais (g ha^{-1}) na cana planta.....	40
Tabela 14 -	Extração de metais (g ha^{-1}) em folhas (F) e colmos (C) da cana-de-açúcar.....	40
Tabela 15 -	Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 16 meses da cana planta...	41
Tabela 16 -	Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 6 meses da cana soca.....	41
Tabela 17 -	Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 12 meses da cana soca.....	42

Tabela 18 -	Comparação das bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) nos períodos entre cana planta, 6 meses cana soca e cana soca.....	43
Tabela 19 -	Comparação das médias das bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) nas 3 épocas de coleta utilizando o “Start” como controle.....	43
Tabela 20 -	Padrões de crescimento ¹ de bactérias em 4 concentrações de chumbo (mg L ⁻¹) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições.....	45
Tabela 21 -	Padrões de crescimento ¹ de bactérias em 4 concentrações de níquel (mg L ⁻¹) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições.....	46
Tabela 22 -	Padrões de crescimento ¹ de bactérias em 4 concentrações de cromo (mg L ⁻¹) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições.....	47
Tabela 23 -	Padrões de crescimento ¹ de bactérias em 4 concentrações de cádmio (mg L ⁻¹) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições.....	47
Tabela 24 -	Padrões de crescimento ¹ determinados para os 4 gêneros de bactérias nas diferentes associações entre dois metais em meio de cultura. Média de 5 repetições.....	48
Tabela 25 -	Padrões de crescimento ¹ determinados para os 4 gêneros de bactérias nas diferentes associações entre três e quatro metais em meio de cultura. Média de 5 repetições.....	49
Tabela 26 -	Soma dos padrões de crescimento para cada bactéria.....	49
Tabela 27 -	Resultados das análises na amostra certificada SRM NIST 1515.....	62
Tabela 28 -	Condições operacionais do ICP-MS empregada nas análises.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bactérias Endofíticas - Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar	15
2.2 Quantificação das bactérias endofíticas	17
2.3 Metais Pesados	18
2.4 Metais e a cana-de-açúcar.....	20
2.5 Metais e as bactérias.....	23
3 HIPÓTESES	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Caracterização da área contaminada	26
4.2 Instalação do experimento	27
4.3 Produtividade.....	28
4.4 Análise de Metais Pesados	29
4.5 Quantificação das Bactérias Endofíticas	30
4.6 Ensaio “<i>in vitro</i>”	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Produtividade.....	33
5.2 Metais Pesados	33
5.3 Quantificação das Bactérias Endofíticas	40
5.4 Ensaio “<i>in vitro</i>”	44
5.4.1 Chumbo	44
5.4.2 Níquel.....	45
5.4.3 Cromo	46
5.4.4 Cádmiio.....	47
5.4.5 Associação entre Metais	48
REFERÊNCIAS	52
ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

Metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico maior que 5 g/cm³ ou número atômico maior do que 20. Entretanto, o termo “metais pesados” é utilizado para elementos químicos que contaminam o meio ambiente, provocando diferentes danos à biota, podendo ser metais, semi-metais e mesmo não metais como o selênio. Os principais elementos químicos enquadrados neste conceito são: alumínio, antimônio, arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cobalto, cromo, ferro, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, selênio e zinco. Entre os metais, o arsênio, o cobalto, o cromo, o cobre, o selênio e o zinco são essenciais para os organismos vivos (TSUTIYA, 1999).

Os metais presentes na maior parte das contaminações são o cádmio, cromo, cobre, mercúrio, chumbo e zinco (YADAV et al., 2010). Estes elementos podem ocorrer nos solos por via geoquímica ou antrópica. No caso da via geoquímica são quase sempre constituintes de minerais primários de rochas ígneas e são incorporados na rede cristalina pelo processo de substituição isomórfica de elementos maiores (Al, Fe), no momento de cristalização. As rochas sedimentares e argilitos podem concentrar grande quantidade de metais, enquanto que nos arenitos o teor é baixo.

A necessidade de aumento constante na produtividade agrícola para alimentar a população mundial e o consumo desenfreado de bens tem gerado aumento da contaminação do solo por metais em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. A aplicação de lodo de esgoto, de fertilizantes, de pesticidas e atividades industriais são as principais causas de contaminação de solos por metais. Estes tendem a persistir no ambiente e acumularem na cadeia trófica. Na planta, o excesso de metais pode causar sintoma de stress, como distúrbios na fotossíntese e na respiração, tendo como consequência uma menor produção de biomassa (YADAV et al., 2010).

De acordo com a CETESB (2010), uma área contaminada pode ser definida como um local onde há comprovadamente contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos de forma planejada, acidental ou até mesmo natural. Nesta área, os poluentes ou contaminantes podem concentrar-se em subsuperfície ou nos diferentes compartimentos do ambiente como no solo, nos sedimentos e nas águas subterrâneas. Para se ter uma real dimensão da contaminação por metais no estado de São Paulo, em 2010 foram 3675 registros de áreas contaminadas e reabilitadas, sendo que das 753 áreas contaminadas por atividades diversas, 49% estava classificada como contaminada, 29% contaminada sob

investigação, 16% em processo de monitoramento para reabilitação e 6 % reabilitada. A China possui cerca de 16% de suas terras cultiváveis contaminada com metais (LONE et al., 2008) e na Europa 250 mil áreas necessitavam de remediação em 2007 (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2007).

Ao longo do tempo varias técnicas foram desenvolvidas para remover metais de solos contaminados, mas muitos locais permaneceram contaminados por causa dos custos econômicos e ambientais elevados. Ensley (2000) estimou os custos para a remediação de um local contaminado com Pb utilizando para a remediação a técnica convencional de escavação e destinação em aterro sanitário, técnica mais utilizada nos EUA, que ficou por volta de US\$ 150-350/tonelada. Diante dos custos elevados das metodologias tradicionais a metodologia de restauração de áreas contaminadas através do uso de plantas tem atraído a atenção de vários pesquisadores nas ultimas duas décadas. Neste contexto, a fitorremediação tem um custo ambiental e econômico bem menor, ficando em torno de US\$ 20-80/tonelada.

As tecnologias que fazem parte da fitorremediação são a fitoextração, fitoestabilização e fitovolatilização. Todas as tecnologias utilizam plantas, mas com focos diferentes: a fitoextração tem por objetivo remover o metal do solo e concentrar na biomassa, a fitoestabilização tem por objetivo minimizar a mobilidade dos metais através da acumulação nas raízes ou precipitação próxima a rizosfera e fitovolatilização que converte poluentes absorvidos pelas raízes em formas voláteis não tóxicas.

O ciclo biogeoquímico do nitrogênio (N) compreende as transformações que ocorrem com esse elemento nos diferentes compartimentos do ecossistema solo - água - seres vivos - atmosfera. As fontes naturais de N que devem ser consideradas no manejo do agroecossistema são a atmosfera, solo, restos animais e vegetais. Apenas a atmosfera possibilita processos aditivos de N ao solo, quer seja através da fixação química industrial, quer através da fixação biológica de N gasoso. A atmosfera é uma fonte praticamente inesgotável de N, onde este elemento representa 80% do total de gases. Cerca de 50% do N adicionado na forma de fertilizantes é perdido por lixiviação e/ou na forma de gases, que retornam a atmosfera. Assim, dada a elevada extensão territorial brasileira ainda agriculturável, a incapacidade atual das indústrias de atender a demanda em adubo nitrogenado e o problema da geração de gases de efeito estufa, é fundamental que se analise a contribuição atual e potencial da fixação biológica de nitrogênio (FBN) como um processo estratégico de suprimento de N para o desenvolvimento sustentável e para a competitividade comercial da produção agrícola (LOPES, 2007).

A fixação natural de nitrogênio (atmosférica mais biológica) se dá a uma taxa de 190×10^{12} gramas de nitrogênio ao ano. Desse total, a emissão de relâmpagos é responsável por 8%. Um adicional de 2% do nitrogênio fixado naturalmente deriva da reação fotoquímica entre o óxido nítrico gasoso e o ozônio resultando em ácido nítrico. Os 90% restantes resultam da fixação biológica de nitrogênio, em que certas bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em amônio. A maioria desses procariontos que fixam nitrogênio são de vida livre do solo. Alguns deles, entretanto, formam associações simbióticas com plantas superiores em que o procarionto supre a planta com o nitrogênio fixado em troca de outros nutrientes e carboidratos. As bactérias endofíticas fixadoras de N_2 ocupam os espaços intercelulares ricos em açúcares da cana-de-açúcar e podem fornecer uma boa porção da exigência de nitrogênio desta espécie, sob condição de deficiência de nitrogênio (EPSTEIN; BLOOM, 2006). Podem também, em alguns casos, conferir à planta alta tolerância a metais (RYAN et al., 2008).

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do Brasil, pois é uma das atividades que mais emprega no setor agropecuário, é geradora de investimentos e de renda no campo, auxilia a balança comercial pela exportação de produtos como açúcar e álcool e fornece biocombustível para o mercado interno. Para se ter uma idéia da dimensão do agronegócio sucro-alcooleiro a produção da safra 2009-2010 foi de 642 milhões de toneladas de cana que foi transformada em 36,6 milhões de toneladas de açúcar e 28,1 bilhões de litros de etanol. A região sudeste foi responsável por 66% da safra e 63% da área colhida (AGRAFNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2011). A cultura tem recebido a atenção de vários cientistas por causa da sua potencial capacidade de acumular contaminantes. É uma planta vigorosa tropical, com alta eficiência fotossintética comparada a plantas C_4 e com crescimento superior a maioria das outras culturas. Alguns pesquisadores relatam que a cana possui a habilidade de acumular Cu, Cd, Se e Mn em sua biomassa (YAN; XIA, 2010).

Os primeiros programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil tinham por base solos de baixa fertilidade com baixa aplicação de nitrogênio, selecionando materiais adaptados a essas condições. A baixa aplicação de nitrogênio selecionou variedades que se associam naturalmente a bactérias diazotróficas endofíticas podendo obter parte de seu nitrogênio através da fixação biológica.

As pesquisas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio em plantas não leguminosas tiveram início na década de 50 com a equipe da Dra. Johanna Dobereiner na Embrapa Agrobiologia, localizada em Seropédica-RJ. Mais de 60 anos de pesquisas tornou o Brasil referência mundial neste assunto e possibilitou que a Embrapa montasse uma rede

privada de experimentação para testes de validação agrônômica de um inoculante para cana-de-açúcar. Este inoculante é uma mistura de 5 bactérias (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) que se apresentam em meio líquido e turfoso.

Diante da importância da cana-de-açúcar e da necessidade de se utilizar com maior eficiência a potencialidade dos microrganismos endofíticos dentre eles os fixadores de N, compreender o comportamento destes em ambiente com altas concentrações de metais é de suma importância para o estabelecimento do manejo adequado da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a concentração de Cd, Pb, Cr e Ni nos tecidos da cana-de-açúcar, constatar a presença de bactérias endofíticas na variedade IAC87-3396 cultivada em ambiente com altas concentrações de metais, analisar a extração de metais pela planta e avaliar a tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio a metais pesados “*in situ*” e “*in vitro*”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias Endofíticas - Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar

Atualmente são conhecidas mais de 140 espécies de bactérias diazotróficas, incluindo cianobactérias e actinomicetos (YOUNG, 1992). Neste universo, apenas quatro espécies são consideradas fitopatogênicas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Pantoea herbicola*.

Os diazotróficos endofíticos têm uma vantagem sobre os diazotróficos associativos de raízes, uma vez que ocupa espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro com maior acesso às fontes de carbono (DOBBELAERE et al., 2003).

A promoção do crescimento das plantas por bactérias endofíticas pode ser resultante de ações indiretas como a supressão de doenças ou de ações diretas como a produção de fitohormônios, fixação do nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (TAN; ZOU, 2001).

A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar envolve diversos gêneros bacterianos e mecanismos singulares ainda pouco compreendidos (JAMES, 2000). Entre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Burkholderia* spp. e *Azospirillum* spp.

Gluconacetobacter diazotrophicus pertence ao grupo das bactérias do ácido acético e foi isolada de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar por Cavalcante e Döbereiner (1988). É uma bactéria microaeróbia, cresce em condições de meio de cultura com pH baixo (5,0 ou menos), produz ácido acético a partir de etanol e tolera altas concentrações de sacarose (TEIXEIRA, 1997). É encontrada em plantas como cana-de-açúcar, abacaxi (TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000), café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), batata (PAULA et al., 1991), entre outros.

O gênero *Herbaspirillum* possui duas estirpes importantes relacionadas com a fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar: *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Herbaspirillum seropedicae* foi isolada de diversas plantas como sorgo,

milho, dendê, banana, arroz e em cana-de-açúcar foi isolada de raízes e colmos (BODDEY et al., 2003). *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi derivada da reclassificação de *Pseudomonas rubrisubalbicans*, considerada um agente fitopatogênico causador da doença conhecida como estria mosqueada em algumas variedades susceptíveis de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil (PIMENTEL et al., 1991). Foi encontrada também em arroz e palmeira (BALDANI et al., 1997).

As espécies de *Azospirillum* são microrganismos heterotróficos que fixam N₂ sobre condições microaeróbicas (ROPER; LADHA, 1995). Crescem extensivamente na rizosfera de gramíneas e podem penetrar nas raízes e se desenvolver endofiticamente nos espaços intercelulares (SUMNER, 1990). Em cana-de-açúcar, *Azospirillum brasiliense* e *Azospirillum lipoferum* são encontradas em raízes, colmos e folhas e a *Azospirillum amazonense* é encontrada nas raízes e colmos (REIS et al., 2000).

O gênero *Burkholderia* compreende 29 espécies, dentre elas a *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia kururiensis*, *Burkholderia tuberum* e *Burkholderia phynatum*, bactérias estas que possuem a capacidade de fixar N₂ (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). *Burkholderia brasiliensis* é encontrada no interior de raízes, colmos e folhas de cana, sendo que a *Burkholderia tropica* é encontrada em raízes e colmos (REIS et al., 2000). Alguns gêneros são encontrados também na cultura do arroz (GILLIS et al., 1995).

Estes microrganismos endofíticos possuem a habilidade de colonizar os espaços intercelulares e o interior das células epidérmicas das raízes. Uma vez no interior da planta, se locomovem sistematicamente e alcançam os tecidos aéreos através do xilema. Os espaços do tecido aerenquimático garantem um fluxo de nitrogênio atmosférico para a bactéria e estão geralmente em grupos de 3 ou 4 bactérias (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998).

A quantificação das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus* mostrou não haver diferença entre os genótipos de cana estudados (REIS JUNIOR et al., 2000b). Fisiologia e mudanças metabólicas podem modificar o estabelecimento e a permanência de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, promovendo o crescimento da planta quando houver interação entre a variedade e a bactéria (MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003).

A eficiência fotossintética, as exigências nutricionais e a resistência às condições adversas são características ligadas ao genótipo da planta que podem apresentar influência na eficiência da fixação de N₂ pelas bactérias (REIS JUNIOR et al., 2000b).

Até o momento não existem trabalhos sobre a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio na variedade IAC87-3396.

2.2 Quantificação das bactérias endofíticas

Existem diversos trabalhos na literatura que quantificam as bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar, a maior parte deles relacionados com adubações nitrogenadas, manejo varietal e regiões de estudo.

Reis Junior et al. (2000a), trabalhando com as variedades SP79-2312, SP70-1143 e adubação nitrogenada, constataram maiores valores (log. do n° de células/g de matéria fresca) na parte aérea e os valores obtidos de *Herbaspirillum* spp. foram maiores do que para *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Os valores médios obtidos para *Herbaspirillum* spp. na parte aérea foi 3,73 e na raiz foi de 1,98 e para *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi de 2,26 na parte aérea e 1,88 na raiz. Muthukumarasamy et al. (1999), trabalhando com adubação nitrogenada e variedades de cana indiana, obtiveram também valores médios maiores para a quantificação na parte aérea, mas os valores foram maiores para *Gluconacetobacter diazotrophicus* em comparação com *Herbaspirillum seropedicae*.

Reis Junior et al. (2000b), estudando as variedades CB 45-3, SP70-1143 e Krakatau, obtiveram valores de *Herbaspirillum* spp. de 4,67 e de *Gluconacetobacter diazotrophicus* de 3,86. Na parte aérea foram constatados valores de 3,62 e na raiz foi de 4,91. Gomes et al. (2005), trabalhando com as variedades SP70-1143, SP79-2312 e Krakatau, obtiveram valores na quantificação para *Herbaspirillum* spp. de 3,08, maiores do que para *Gluconacetobacter diazotrophicus* que foi de 2,81 sendo que os valores encontrados foram maiores nas raízes. Em relação à flutuação populacional, nas raízes houve pouca variação ao longo do tempo para a *Herbaspirillum* spp.

Assis et al. (2000), estudando a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, obtiveram 5,65 log. de células/g de matéria fresca de colmos de cana cultivada no Japão.

Para a *Azospirillum amazonense*, Reis Junior et al. (2000b) obtiveram como valor médio 3,33 log. do n° células/g de matéria fresca em cana-de-açúcar. Em *Brachiaria* spp. foram encontrados valores que variaram de 3 a 7 nas raízes (REIS JUNIOR et al., 2004). Péres e Casas (2005) encontraram como valor médio 4 em raízes de cana cultivada em Cuba.

Das variedades de cana provenientes do programa de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) a única variedade em que houve a quantificação das bactérias foi a IAC93-6006, obtendo na parte aérea 6,67 para *Gluconacetobacter diazotrophicus* e para *Herbaspirillum* spp. 6,46 log. do n° de células/g de matéria fresca (PRADO JUNIOR, 2008).

2.3 Metais Pesados

O chumbo (Pb) é um dos principais poluentes do meio ambiente sendo muito tóxico ao ser humano. A concentração em solos agriculturáveis varia de 2 a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo (MENGEL; KIRKBY, 2001). As fontes de contaminação são áreas de mineração, indústrias de processamento de metais e de baterias, lodo de esgoto e combustível fóssil. O principal sintoma de fitotoxicidade na planta é redução do crescimento, o metal simula o metabolismo do cálcio inibindo muitos sistemas enzimáticos e não possui papel essencial no metabolismo da planta. As formas orgânicas como tetraetil, trietil e dietil são mais rapidamente absorvidos pelas plantas do que a forma inorgânica (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

A maioria dos solos contém pequenas quantidades de níquel (Ni), usualmente menor que 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo e na planta a concentração no material vegetal varia de 0,1 a 5 mg kg^{-1} de matéria seca (MENGEL; KIRKBY, 2001). Em solos ácidos e redutores o Ni encontra-se ligado ao sulfato e em solos com pH até 8 encontra-se na forma de carbonatos e complexos orgânicos. O pH do solo exerce grande influência na retenção do elemento, que facilmente se precipita na superfície de óxidos. Geralmente a faixa tóxica para a maioria das espécies varia de 10 a 100 mg kg^{-1} de matéria seca (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

O níquel é móvel no floema e presente no xilema na forma de Ni^{+2} e na forma de quelatos com citrato. Após a absorção de grandes quantidades pela planta o metal pode ser transferido para as sementes e para os frutos (MENGEL; KIRKBY, 2001). As enzimas que contém níquel são a Ni-hidrogenase, urease e CO desidrogenase. A absorção pelas plantas é governada provavelmente pelo gradiente quimiosmótico (NIES, 1999). As principais fontes de contaminação são as indústrias processadoras de metais e resíduos de mineração. Os sintomas mais comuns de fitotoxicidade de Ni são clorose nas folhas, alguns processos são prejudicados como a absorção de nutrientes, metabolismo e desenvolvimento de raízes. Pode inibir a fotossíntese e também a respiração (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Para a maioria dos solos a concentração de cromo (Cr) varia de 15 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo (MENGEL; KIRKBY, 2001). Para este metal existe uma variabilidade de formas oxidativas (+2 a +6) formando complexos aniônicos ou catiônicos ($\text{Cr}(\text{OH})^{+2}$, CrO_4^{-2} , CrO_3^{-3}) sendo que a ocorrência natural tem como principais valências +3 e +6. A forma hexavalente de Cr pode ser encontrado nos bio-sólidos, devido a reações de oxidação e redução que ocorrem nestes materiais. No solo, o Cr^{+6} na presença de matéria orgânica é facilmente reduzido à forma Cr^{+3}

onde forma complexos com ligantes orgânicos, ou é adsorvido a óxidos hidratados (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

As reações de redução/oxidação entre os dois estados Cr^{+3} e Cr^{+6} são termodinamicamente possíveis sob condições fisiológicas. Em microrganismos não foram encontradas influências benéficas do cromo. Na maioria dos microrganismos a entrada do cromato na célula se dá pelo mecanismo de absorção do sulfato. A resistência ao Cr é provavelmente baseada na interação entre redução e efluxo do cromato (NIES, 1999). As principais fontes de contaminação de Cr são resíduos industriais e lodo de esgoto. O excesso de Cr provoca a desorganização da estrutura e da membrana do cloroplasto, clorose em folhas novas e avermelhamento das folhas. Geralmente a quantidade de Cr encontrada em material vegetal é de 0,1 a 0,5 mg kg^{-1} de matéria seca sendo o mecanismo de absorção e translocação similar ao ferro. Não existe evidencia de que o Cr seja essencial para o metabolismo da planta (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

A concentração de cádmio (Cd) em solos não contaminados é geralmente menor que $1\mu\text{g g}^{-1}$ de solo sendo facilmente translocável das raízes para a parte aérea (MENGEL; KIRKBY, 2001) onde a translocação é similar a do Zn (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007). No solo, o cádmio pode formar compostos como o CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO^{-3} , CdSO_4 e complexos orgânicos. Também, pode precipitar-se com carbonatos e fosfatos. A competição por sítios de adsorção de óxidos e matéria orgânica ocorre com o cálcio, cromo, níquel e chumbo. As principais fontes de contaminação dos solos com Cd são as indústrias de processamento de metais, de fertilizantes e lodo de esgoto. É considerado um elemento não essencial para o processo metabólico da planta sendo absorvido pelas raízes e folhas e também é altamente acumulado pelos microrganismos do solo (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

O Cd é considerado tóxico aos vegetais, pois altera a permeabilidade de membranas e interfere nos processos fotossintéticos e enzimáticos. Os sintomas de fitotoxicidade em plantas são: crescimento lento e injúrias nas raízes, clorose nas folhas, interferência no metabolismo de alguns micronutrientes, inibição da fotossíntese, desnaturação de proteínas, interação com os metabolismos de Ca e Zn, alteração na permeabilidade das membranas celulares e distúrbios na transpiração e fixação de CO_2 (NIES, 1999). A detecção de Cd na solução de solos contaminados, assim como seu teor no tecido vegetal, é dificultada pelas baixas concentrações do elemento, quase sempre abaixo dos limites de detecção do método utilizado. Também, os extratores utilizados nem sempre se mostram eficazes e o mais indicado para

extração do Cd seria o CaCl_2 , em virtude da grande afinidade do cádmio pelo cloro, que formam complexos de alta estabilidade (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

2.4 Metais e a cana-de-açúcar

A fitoextração de metais em solos contaminados tem como finalidade o uso de plantas para extrair e translocar os metais para suas partes colhidas. O objetivo da fitoextração é reduzir a concentração dos metais nos solos contaminados para níveis regulamentares dentro de prazos razoáveis. Esse processo depende da habilidade das plantas selecionadas para crescer e acumular metais em climas e solos específicos, tendo duas abordagens: o uso de plantas com excepcional e natural capacidade de acumular metais – as chamadas hiperacumuladoras – e a utilização de plantas com alta produção de biomassa passíveis de colheita como milho, arroz, cevada, ervilha, aveia e mostarda indiana (LOMBI et al., 2001; CHEN et al., 2004).

A capacidade de hiperacumular metais é um fenômeno relativamente raro, ocorrendo em aproximadamente 400 espécies de plantas vasculares (REEVES; BAKER, 2000) sendo que a grande maioria destas espécies são hiperacumuladoras de níquel. Plantas capazes de acumular Cd, Pb, Zn, Cr e Co são poucas (MCGRATH et al., 2001). As principais famílias de plantas hiperacumuladoras são *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Ciperaceae*, *Cunouniaceae*, *Fabaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Violaceae* e *Euphorbiaceae* (PRASSAD; FREITAS, 2003). Estas plantas usualmente possuem baixa produção de biomassa pois a planta usa a maior parte da energia nos mecanismos necessários para se adaptar a alta concentração de metais em seus tecidos (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007). Uma planta é considerada hiperacumuladora de metais quando é capaz de acumular e extrair em seus tecidos mais de 100 mg kg^{-1} de Cd e mais de 1000 mg kg^{-1} de Pb e Ni (RASKIN et al., 1994).

A seleção das plantas é uma etapa crítica no processo de fitoextração. Gramíneas são excelentes candidatas por causa de seu extenso sistema radicular que proporciona um grande contato com o solo além da grande produção de biomassa. Alguns critérios para seleção das plantas são: tolerância a alta salinidade e pH, alto crescimento e produção de biomassa, tolerância a condições ambientais extremas, adaptação a diferentes habitats, tolerância aos

níveis do metal presente na área e níveis adequados de acumulação, absorção e translocação dos metais (SARMA, 2011).

Tamura et al. (2005) descobriu que uma espécie de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) que pode acumular naturalmente até 4200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Pb nas raízes. É o primeiro hiperacumulador de Pb conhecido com alta produção de biomassa. *Heliantus annuus* tem mostrado a acumulação de Pb em suas folhas e colmos, indicando que pode ser uma planta hiperacumuladora a ser usada em minas e fabricas abandonadas com elevados níveis de Pb no solo (BOONYAPOOKANA et al., 2005). Nesta mesma linha, *Hemidesmus indicus* também tem a capacidade de acumular Pb nas raízes e caule (CHANDRA et al., 2005).

Solanum nigrum e *Conyza canadensis* além de acumular altas concentrações de Cd tolera também a combinação de Cd, Pb e Zn (WEI et al., 2004). *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. também tem a capacidade de acumular Cd (SCHWARTZ et al., 2003), o mesmo ocorrendo com *Arabis gemmifera* (KUBOTA; TAKANAKA, 2003).

Na Austrália, 12 variedades de cana nacionais foram estudadas para observar a mobilidade dos metais Cd, Pb, Hg, Cu e Zn na planta, avaliando a diferença genética, distribuição e absorção pela planta. A concentração interna de Cd e Zn foram mais influenciadas pela concentração no solo do que pela variedade. Do total encontrado na planta, no colmo foram encontrados 77% do Cd e 56% do Zn. Não houve correlação entre a concentração dos metais no solo e a concentração correspondente na planta. Para cada 100 toneladas de cana madura fresca, 0,2g de Cd e 110g de Zn foram realocados para a superfície do solo por causa da palha (RAYMENT et al., 2002).

Em casa de vegetação, Xia e Chi (2009) aplicaram 4 doses de Pb (mg kg^{-1}) utilizando o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 0, 100, 250, 500 e 1000. Os resultados mostraram que com exceção do tratamento de 1000 mg kg^{-1} a planta não mostrou toxicidade. Na concentração de 250 mg kg^{-1} o diâmetro e biomassa foram os maiores obtidos, sendo o crescimento da planta estimulado por baixas concentrações e inibido com altas concentrações. Esta inibição pode ter sido causada pela fonte nitrogenada adicionada juntamente com o chumbo. As concentrações na folha variaram de 13,5 a 46,56 mg kg^{-1} , 5,92 a 26,98 mg kg^{-1} nos colmos e 21,23 a 1336,86 mg kg^{-1} nas raízes.

Também em casa de vegetação, Xia et al. (2009) aplicaram 4 doses (mg kg^{-1}) de Cd utilizando o $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$: 0, 100, 250, 500 e 1000. Os resultados mostram que com o aumento da concentração de Cd houve diminuição do diâmetro do colmo e diminuição da biomassa. As concentrações na folha variaram de 0,55 a 63,32 mg kg^{-1} , 0,37 a 486,26 mg kg^{-1} nos colmos e 2,26 a 2776,22 mg kg^{-1} nas raízes. Barzegar et al. (2005) estudaram 4 variedades

de cana (Half-tapeh, Karoon, Shoeibich e Ghazali) em áreas cultivadas por 1, 2, 20 e 36 anos verificando a concentração de Cd e Ni nos internódios, bagasso, melado e açúcar branco. Para o internódio, obteve 11,1 mg kg⁻¹ para o Cd e 33,4 mg kg⁻¹ para o Ni. No bagasso obteve 0,6 mg kg⁻¹ para Cd e 1,4 mg kg⁻¹ para o Ni. No açúcar branco não se detectou os metais e no melado não detectou Cd e 1,4 mg kg⁻¹ para Ni.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos por Jain et al. (2004) que determinaram a concentração de Ni e de Cr em folhas e raízes da cana-de-açúcar, em decorrência da aplicação de 3 doses de metais. Encontraram as maiores concentrações nas raízes, sendo que houve aumento na concentração na planta conforme o aumento da dose.

Tabela 1 - Concentração (mg kg⁻¹) de níquel e cromo após a aplicação na cana-de-açúcar (JAIN et al., 2004)

Partes da planta	Ni			Cr		
	0	10	100	0	2	80
Raízes	10,4	35	573	nd	0,52	0,66
Folhas	1,39	1,75	9,58	3,73	9,69	35,6

Oliveira et al. (2003) aplicaram 3 doses de lodo de esgoto na cana planta e soca, obtendo concentrações no colmo e na folha +1 de Cd, Cr, Ni e Pb abaixo dos limites de determinação do método analítico (espectrometria de absorção atômica convencional com chama ar/acetileno), mas, no caldo a presença de Cd, Cr e Ni estiveram abaixo de 0,02 mg kg⁻¹. No trabalho de Ribeiro-Granja (2009) as concentrações dos metais Cr, Ni, Cd e Pb no caldo da cana não foram alterados pela aplicação do lodo de esgoto.

Camilotti et al. (2007) trabalharam com aplicações de lodo de esgoto e vinhaça em cana e analisaram folha, palmito e colmo. Os autores não detectaram Cd, para Cr encontraram valores de 1,68 mg kg⁻¹ no colmo e 1,77 mg kg⁻¹ no palmito, para Ni 3,81 mg kg⁻¹ no palmito, 1,9 mg kg⁻¹ na folha e para Pb 1,64 mg kg⁻¹ no colmo, 14,47 mg kg⁻¹ no palmito e 19,34 mg kg⁻¹ na folha.

Vários autores trabalhando com doses de lodo de esgoto em cana-de-açúcar não detectaram Ni, Cd, Cr e Pb nas folhas na variedade RB855536 (CHIBA et al., 2008) e SP81-3220 (MILLIOLI; SILVA, 2001). Sobral et al. (2011) trabalhando com doses de escória de siderurgia também não detectaram Ni, Cd e Pb em folha da variedade RB92579.

Li et al. (2007) observaram os teores de Cd e Pb na cana-de-açúcar cultivada próxima a uma mina de manganês na província de Guangxi, sul da China. Os valores (mg kg⁻¹) obtidos

para o Cd foram de 0,19 na folha e 0,57 para as raízes e para o Pb foi de 1,3 na folha e 1,8 nas raízes.

Collin e Doelsch (2010) analisaram a presença de Cr, Ni, Cd e Pb em caldo e bagasso de cana-de-açúcar plantada na Ilha Francesa Réunion. As concentrações (mg kg^{-1}) no caldo foram de 0,016 para o Cd, 0,36 para o Cr, 0,91 para o Ni e 0,24 para o Pb. No bagasso as concentrações (mg kg^{-1}) encontradas foram maiores que as do caldo: 0,017 para o Cd, 0,45 para o Cr, 1,5 para o Ni e 0,34 para o Pb. A pesquisa mostrou que as concentrações de Pb, Cd, Ni e Cr no bagasso e no caldo não foram proporcionais ao encontrado no solo.

Os teores de metais comumente encontrados em tecidos foliares maduros de varias espécies são: para o Cd de 0,01 a 0,2 mg kg^{-1} , Pb de 5 a 10 mg kg^{-1} , Cr de 0,1 a 0,5 mg kg^{-1} e Ni de 0,1 a 5 mg kg^{-1} . As faixas de valores tóxicos variam de: 5 a 30 mg kg^{-1} para Cd e Cr, 30 a 300 mg kg^{-1} para Pb e 10 a 100 mg kg^{-1} para Ni (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Os trabalhos de metais pesados na cana-de-açúcar compreendem a utilização e o manejo de produtos provenientes das atividades de saneamento e industriais (vinhaça, lodo de esgoto e escórias de siderurgia) e estudos em casa de vegetação testando doses de metais, não existindo trabalhos baseados em áreas contaminadas antropicamente com metais.

2.5 Metais e as bactérias

Os efeitos dos metais pesados sobre as bactérias têm sido investigado através da adição de sais de metais em concentrações crescentes aos meios nutritivos (KINKLE et al., 1987; ANGLE et al., 1993), sendo as avaliações feitas por meio de contagem em placa ou pela estimativa da tolerância, através de valores atribuídos aos padrões de crescimento (MARTENSSON, 1992).

Microrganismos desenvolvem rapidamente mecanismos de tolerância ao excesso de metais pesados. Fungos são usualmente mais resistentes que as bactérias e os líquens possuem uma alta tolerância a metais (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Hayat et al. (2002) encontraram populações de bactérias fixadoras de nitrogênio assimbióticas tolerantes a 400 mg L^{-1} de Ni, Cd, Pb e Cu em meio de cultura, isoladas de solo contaminado com resíduos de refinaria de petróleo. Lorenz et al. (1992) e Dahlin et al. (1997)

encontraram redução na atividade da nitrogenase em populações de BFN assimbióticas (cianobactérias e bactérias aeróbicas heterotróficas), crescidas em solo tratado com lodo de esgoto e contaminado com metais. Os autores obtiveram correlação negativa entre atividade da nitrogenase e concentração no solo de Zn, Cd e Cu.

No trabalho de Moreira et al. (2008), *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum amazonense* exibiram tolerância a $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{+2}$ e $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{+2}$ em meio de cultura. Quando houve a associação de Zn e Cd em meio de cultura, conforme foi aumentando a concentração dos dois metais foi reduzindo o número de estirpes selecionadas. Na concentração de $54,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e 500 mg L^{-1} de Zn não houve crescimento bacteriano.

Kamnev et al. (2007) estudou o efeito de $0,2 \text{ mM}$ de Co, Cu e Zn em duas estirpes de *Azospirillum brasiliense* - Sp7 e Sp245. Avaliaram a produção de PHB (poly-3-hydroxybutyrate) - produto intracelular com propriedades específicas como termoplasticidade e biodegradação. A estirpe Sp7 cresceu e acumulou PHB na presença dos metais e a estirpe Sp245 cresceu na presença dos metais, mas não houve incremento na produção de PHB.

Em estudos de tolerância de rizóbios a metais pesados, Angle et al. (1993) encontraram estirpes de regiões temperadas tolerantes a $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{+2}$ e $500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{+2}$ em meio de cultura. Ampliando estes resultados, Matsuda et al. (2002) obtiveram 60 isolados tolerantes a $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{+2}$ e $800 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{+2}$ em meio de cultura.

Ansari e Malik (2010) estudaram as variações sazonais de microrganismos em águas residuárias e no solo obtendo em todas as variações sazonais a inibição do desenvolvimento de bactérias fixadoras de N_2 assimbióticas e de actinomicetos na concentração de 200 mg L^{-1} de Ni. Kamika e Momba (2011) também isolaram de águas residuárias isolados bacterianos tolerantes de 52 a 84 mg L^{-1} de Ni. A bactéria *Bacillus licheniformis* tolerou 84 mg L^{-1} .

Dar e Shakari (1999) isolaram de efluentes industriais varias estirpes de leveduras tolerantes a $3 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Cr}^{+6}$ e Haq e Shakoori (1998) isolaram de efluentes de curtume estirpes de bactérias tolerantes a $25 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Cr}^{+6}$. Sundar et al. (2010) também isolaram de sedimentos e efluentes de curtume bactérias tolerantes ao cromo na concentração de 100 a 400 mg L^{-1} .

Na literatura faltam informações sobre as bactérias endofíticas associadas à cana-de-açúcar submetidas “*in vitro*” e “*in vivo*” a metais pesados. A maior parte dos trabalhos citam bactérias fixadoras de nitrogênio assimbióticas, rizóbios e leveduras, obtendo uma grande variação de tolerância a concentração de metais dependendo da espécie estudada.

3 HIPÓTESES

As hipóteses desta pesquisa foram:

1. A variedade IAC87-3396 é colonizada por bactérias endofíticas;
2. A cana-de-açúcar IAC87-3396 absorve os metais presentes no solo e os distribuirá para as folhas e raízes;
3. A cana-de-açúcar pode ser uma cultura fitoextratora de metais do solo;
4. As concentrações de metais na cana-de-açúcar coletada no campo são de mesma magnitude às encontradas no tolete pré-germinado;
5. A tolerância das bactérias presentes na variedade IAC87-3396 aos metais pesados “*in situ*” é semelhante á “*in vitro*”;
6. As concentrações de metais pesados (Cd, Cr, Ni e Pb) no meio de cultura, estudados isoladamente e em associação não influenciam o desenvolvimento das bactérias fixadoras de nitrogênio na variedade IAC87-3396;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área contaminada

Foi proposta a realização de um experimento em uma área acidentalmente contaminada por grande quantidade de resíduos do transporte de sucata, ferro velho e resíduos de siderurgia. Esta área em questão possui cerca de 3 hectares e está localizada às margens da estrada que liga Piracicaba à Charqueada. O terreno, onde anteriormente se plantava cana-de-açúcar, foi interditado pela CETESB, e posteriormente foi permitido o uso para atividades de pesquisa científica com a finalidade de contribuir para o conhecimento das medidas efetivas para a mitigação dos contaminantes e remediação do solo.

No transporte do ferro velho e sucata é utilizada areia, normalmente colocada no piso da carroceria de caminhões transportadores, na tentativa de conter o caldo que escorre do material carregado. Além disso, o resíduo continha muitas pequenas partículas de ferro velho, pedaços de metais, pilhas e fios elétricos. O proprietário da área aplicou-a com o suposto objetivo de aumentar a produtividade na área, por acreditar que se tratava de terra rica em matéria orgânica, supostamente trazendo benefícios à fertilidade do solo.

Algumas medidas foram tomadas pelo produtor como parte das exigências feitas pela CETESB, entre elas cercar a propriedade com sansão do campo e com cerca de arame, fazer três curvas de nível bem acentuadas para conter o arraste de material, construção de três poços em diferentes pontos visando monitorar a contaminação do lençol freático, análises periódicas de solo e água e por fim, foi realizada uma calagem pesada e incorporação com gradeação na área inteira a fim de aumentar o pH do solo e conseqüentemente diminuir a solubilidade dos metais.

A tabela 2 mostra a concentração de cromo, chumbo, níquel e cádmio no solo, nos materiais utilizados como mitigadores e valores de intervenção.

Tabela 2 – Valores de intervenção e teor total de metais no solo e nos mitigadores

Material	Cd	Pb	Cr	Ni	MO ¹ g dm ⁻³	pH
Solo 0-20 cm	2,1	3.418	82	54	25	7,2
Solo 20-40 cm	1,8	389	95	26	16	6,5
Torta	---	2,4	16,3	---	---	---
Turfa	---	18,6	38,1	4,1	---	---
Vermiculita	---	4,5	---	153,0	---	---
Fosfato	14,2	2,0	170,0	7,5	---	---
Silicato	1,8	0,2	96,0	132,0	---	---
Valores de Intervenção						
CETESB (2005)	3	180	150	70	----	----
CONAMA (2009)	3	180	150	70	----	----

¹ Matéria Orgânica

Os valores de intervenção são dados por concentrações de determinada substância no solo acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição Agrícola - Área de Proteção Máxima – APM_{ax}. A área é classificada como “Área Contaminada” sob Investigação quando houver constatação da presença de contaminantes acima destes valores (CETESB, 2005). Considerando os valores de CETESB (2005) e CONAMA (2009) constata-se que a área está contaminada por chumbo na camada de 0-40 cm.

4.2 Instalação do experimento

O estudo das bactérias endofíticas em cana-de-açúcar na área contaminada estava inserido dentro de um amplo projeto que englobou vários estudos realizados com a cultura, dentre elas o uso de mitigadores de metais pesados para remediação do solo contaminado.

A variedade plantada foi a IAC87-3396, escolhida pelo bom desempenho agrícola na região de Piracicaba-SP, rusticidade, precocidade, adaptabilidade a vários ambientes e disponibilidade de mudas. Antes do plantio foram aplicados 5 mitigadores de metais pesados: torta de filtro, turfa, vermiculita, fosfato natural e silicato mais a testemunha. Os tratamentos foram dispostos em esquema de blocos ao acaso, com 4 repetições perfazendo um total de 24 parcelas.

As parcelas possuíam 84m², dispostas em 6 linhas de 10 metros de comprimento, espaçadas por 1,4 metros. A área útil da parcela para coleta de materiais foi constituída pelas 4 linhas centrais, as quais descontaram-se bordaduras de 1 metro em cada extremidade. No sulco foi feita uma adubação básica para cana planta que consistiu em 20 kg ha⁻¹ de N, 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100 kg ha⁻¹ de K₂O. A dose de fosfato de rocha Djebel Onk utilizado foi de 150 kg P₂O₅ ha⁻¹ aplicado em área total e incorporado. O silicato também foi aplicado em área total e incorporado na dose de 5 t ha⁻¹. As fontes de matéria orgânica (turfa e torta de filtro) e a vermiculita foram adicionadas em área total perfazendo uma dose de 60 t ha⁻¹ cada, aplicadas na superfície e incorporadas. O experimento foi colhido sem queima aos 16 meses.

Para a cana soca foram aplicados e incorporados 45 dias após o corte da cana planta 300 kg ha⁻¹ da fórmula 10-10-10 (N-P₂O₅-K₂O) e a colheita foi feita com 12 meses de idade.

4.3 Produtividade

Para o cálculo da produtividade, contaram-se todos os colmos nas 4 linhas centrais da parcela. Em seguida, foram colhidos, contados e pesados os colmos em 2 metros de cada parcela. A partir daí, obteve-se o valor da produtividade (TCH = toneladas de cana por hectare) proporcionalmente pela equação (1):

$$(1) \text{ TCH} = \frac{\text{n}^\circ \text{ colmos}^1 * \text{peso/colmo}^2 * 10^3}{\text{área amostrada}^4}$$

¹ contagem nas 4 linhas centrais de cada parcela

² contagem e pesagem em 2 metros de sulco de cada parcela

³ fator de conversão para 1 ha e de kg para toneladas

⁴ 56 m² = 1,4m de espaçamento entre linhas * 4 linhas * 10 m de comprimento

Para os resultados da produtividade foi aplicada a análise de variância e se significativo aplicou o teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

4.4 Análise de Metais Pesados

Foram realizadas análises para detecção de níquel, chumbo, cromo e cádmio em tecidos da cana-de-açúcar, compreendendo folha + 1, raízes e tolete pré-germinado (parte aérea e raízes). A folha +1 foi identificada com base no sistema de ordenação de Kuijper (CLEMENTS, 1980) coletando 15 folhas aleatoriamente dentro da área útil da parcela. Para as raízes, foram realizadas trincheiras de 30 cm de profundidade ao lado dos sulcos coletando 500g ao longo do perfil do solo. O tolete pré-germinado consistiu em coletar antes da colheita da cana planta e da soca 15 colmos de cada tratamento, separar em toletes de uma gema perfazendo no total 70 toletes e plantar em bandejas contendo areia lavada e aos trinta dias após o plantio coletar parte aérea e as raízes. Foram coletadas toda a parte aérea e raízes, homogeneizados e coletados 500g de cada material.

A parte aérea e raízes foram lavadas com água destilada, solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e água deionizada, sendo que para as folhas selecionou-se o terço médio retirando a nervura central. Os materiais vegetais foram secos em estufa a 60°C com circulação forçada de ar, moídas e submetidas à digestão nítrico-perclórica (MALAVOLTA et al., 1997) (Anexo A). As amostras (250 mg) dos materiais vegetais secos foram digeridos em sistema fechado nítrico-perclórico com o uso de reagentes ultrapuros HNO_3 e HClO_4 na concentração de 5:1, levados ao bloco digestor e por fim o volume do balão volumétrico é completado com água ultrapura.

Na análise química inorgânica quantificou-se os teores de Cd, Cr, Ni e Pb através do espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente com sistema octopolo de reação (ICP-MS Agilent 7500ce), no Laboratório de Análise e Referência em Amostras Ambientais e Fertilizantes – LARAFER, do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (CENA/USP) e FINEP/MCT. Empregou-se controles de qualidade com base no método oficial da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) com base no método 6020A do Manual SW-846.

O ácido HNO_3 , de grau analítico Merck, usado na digestão foi purificado por destilação no equipamento SubPUR/DuoPUR-Milestone. A água ultrapura, com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega^{\text{cm}}$, utilizada em todas as operações das análises foi obtida em um sistema de purificação Milli-Q (Gradiente, modelo A10). Para preparo das amostras e quantificação por ICP-MS, foram usadas soluções multielementares (tune, padrões de calibração, padrões de verificação de calibração e padrões internos, com certificados de análises, Agilent), ácidos

(dupla subdestilação), gases sendo eles argônio com 99,999% de pureza e para reação e colisão hidrogênio e hélio com 99,9999% de grau analítico ICP-MS de alta pureza. A exatidão das análises foi garantida utilizando material de referência certificado de folhas de maçã SRM NIST-1515 (National Institute of Standards and Technology), processada juntamente com as amostras sendo que os resultados estão no Anexo B. Para a introdução das amostras no ICP-MS foi empregado um nebulizador concêntrico com vazão de 1 mL min⁻¹. As condições operacionais do ICP-MS encontram-se no Anexo C.

Para os resultados da concentração de metais foi aplicada a análise de variância e se significativo aplicou o teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

4.5 Quantificação das Bactérias Endofíticas

Foram realizadas 3 análises sendo uma na cana planta (colheita) e duas na cana soca (6 meses de cultivo e colheita), compreendendo em cada análise parte aérea e raízes. Foi realizada também uma quantificação prévia das bactérias presentes nos colmos utilizados para a instalação do experimento, análise que foi chamada de “Start”. Esta análise proporcionou uma idéia do potencial bacteriano da variedade IAC87-3396 antes de ser introduzida em seu novo ambiente onde continha altas concentrações de metais.

Para a quantificação das bactérias utilizou-se a metodologia do tolete pré-germinado que consistiu em coletar 15 colmos de cada tratamento, separar em toletes de uma gema perfazendo no total 70 toletes e plantar em bandejas contendo areia lavada e aos trinta dias após o plantio coletar parte aérea e as raízes (REIS et al., 1999). Foram coletadas toda a parte aérea e raízes, homogeneizados e coletados 500g de cada material. O material coletado foi lavado em água corrente, seco em papel toalha e esterilizado superficialmente através do uso de algodão embebido em álcool. Dez gramas da parte aérea e de raízes, em separados, foram trituradas em liquidificador com 90ml de solução salina (ANEXO D) por dois minutos. Em seguida, foram feitas as diluições seriadas das amostras em solução salina (10^{-1} a 10^{-7}) (REIS et al., 1999). Para o isolamento das bactérias endofíticas foram utilizados os seguintes meios de cultura seletivos para bactérias fixadoras de nitrogênio: JNFb (Anexo E), LGI-P (Anexo F), LGI (Anexo G) e JMV (Anexo H). Foram utilizados frascos de penicilina de 10 ml sendo

inoculado 0,1 ml da solução seriada em cada frasco. (DÖBEREINER et al., 1995; DÖBEREINER et al., 1999).

Foram realizadas três repetições de cada diluição, sendo o método usado para quantificação foi o “Número Mais Provável” (NMP), que é baseado na presença ou ausência de película formada no meio semi-sólido, conforme apresentado na Tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995).

Os resultados foram transformados em logaritmo do número de células por grama de matéria fresca. Após a transformação, foi aplicada a análise de variância. Caso significativo, aplicou o teste de comparação entre médias de Tukey ao nível de 5% de significância e também aplicou o teste de Dunnett utilizando o “Start” como controle fixando o nível de significância em 5%.

4.6 Ensaio “*in vitro*”

O ensaio “*in vitro*” consistiu em acrescentar ao meio de cultura batata (Anexo I) (DOBEREINER et al., 1995) chumbo, cádmio, níquel, cromo e proceder a inoculação em placa de petri de 4 espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. As fontes e concentrações do metal (mg L^{-1}) utilizadas foram: $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (0; 2; 4; 8) K_2CrO_4 (0; 17; 34; 68); $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0; 10; 20; 40); PbCl_2 (0; 62; 124; 248), tendo como base as concentrações encontradas no sistema radicular da cana planta (tabelas 4 e 5). Houve também a mistura de dois, três e quatro metais no mesmo meio de cultura, utilizando para cada metal também as concentrações encontradas no sistema radicular da cana. As estirpes bacterianas utilizadas foram a BR 11145 - *Azospirillum amazonense*, BR 11366 - *Burkholderia tropica*, BR 11281 - *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BR 11335 - *Herbaspirillum seropedicae*, obtidas na Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Araras, SP.

Foram 5 repetições para cada tratamento sendo que cada placa de petri continha 15 ml de meio de cultura e foi inoculado 0,1 ml da suspensão de bactérias onde possuía cerca de 10^6 células viáveis. As placas foram incubadas a 28°C por 18 dias.

O comportamento das bactérias nas diferentes concentrações de metais foi avaliado atribuindo-se valores aos diferentes padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual;

1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação. A concentração máxima tolerada (CMT) corresponderá a maior concentração de metal que apresentou $PC \geq 1$ (MOREIRA et al., 2008).

A ordem de toxicidade dos metais para cada bactéria foi obtida através da soma dos padrões de crescimento de cada metal, sendo que as menores somas foram os elementos mais tóxicos. A ordem de tolerância foi obtida somando-se todos os padrões de crescimento de cada bactéria. As bactérias com maiores somas foram as mais tolerantes.

Os padrões de crescimento obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Spearman ao nível de 5% de significância utilizando o programa Statistica 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produtividade

A tabela 3 apresenta a produtividade da cana planta obtida para os diversos tratamentos. Verifica-se que a vermiculita, a torta de filtro e a turfa aumentaram a produtividade em relação à testemunha, enquanto que o silicato não promoveu alteração na produtividade. A torta de filtro é um material muito rico em fósforo e nitrogênio, a turfa é rica em nitrogênio e a vermiculita é rica em potássio, elemento requerido em alta quantidade pela cana-de-açúcar. É possível que a adição desses nutrientes tenha sido responsável pelo aumento da produtividade. Em decorrência de problemas técnicos não foi possível obter a produtividade da cana soca.

Tabela 3 – Produtividade da cana planta nos diversos tratamentos mitigadores

Tratamento	Colmos (t ha⁻¹)
Testemunha	57,48c
Torta de filtro	68,72b
Turfa	68,11b
Vermiculita	68,13b
Fosfato	79,2a
Silicato	64,5bc
Média	67,69

5.2 Metais Pesados

Os resultados obtidos para os teores dos quatro metais não diferiram entre os tratamentos ao nível de 5% de significância. As tabelas 4 e 5 mostram que para todos os metais, a maior concentração foi encontrada nas raízes e os menores valores foram encontrados na folha +1. Resultados similares foram obtidos por Jain et al. (2004), Li et al.

(2007), Xia e Chi (2009) e Xia et al. (2009) que obtiveram concentrações de Ni, Cr, Cd e Pb maiores nas raízes em comparação com as folhas. Kabata-Pendias e Mukherjee (2007) relatam que existe uma maior concentração de Cr, Cd e Pb nas raízes do que na parte aérea das plantas. Tanto para os materiais coletados no campo (folha +1 tabelas 4 e 5) como para os provenientes dos toletes pré-germinados (parte aérea tabelas 7 e 8) os valores de Pb estão abaixo do teor normal, Ni e Cd estão dentro da faixa considerada normal e o Cr está acima do teor normal mas não entrando na faixa de valores tóxicos.

Tabela 4 - Teores (mg kg^{-1}) de níquel e chumbo determinados na folha +1 e raízes da cana coletadas no campo em duas épocas

Tratamento	Níquel				Chumbo			
	Cana-Planta		Cana-Soca		Cana-Planta		Cana-Soca	
	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz
Testemunha	0,62	21,7	2,14	14,20	0,47	88,0	1,02	45,0
Turfa	0,38	10,4	1,62	7,65	0,33	30,2	1,00	21,0
Torta de Filtro	0,95	15,9	1,59	7,15	0,72	60,9	0,85	22,3
Vermiculita	0,54	14,8	1,65	8,43	0,44	62,9	0,93	51,3
Fosfato	0,58	14,7	1,48	8,13	0,43	55,6	1,01	25,6
Silicato	0,67	22,0	1,52	11,21	0,43	77,3	0,94	43,8
Média	0,62	16,6	1,67	9,46	0,47	62,5	0,96	34,8
F	2,5 ^{ns}	0,74 ^{ns}	2,55 ^{ns}	1,35 ^{ns}	1,77 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,86 ^{ns}
DMS	0,7	13,1	0,84	9,76	0,51	64,3	0,23	32,8
CV (%)	38	62	17	49	42	78	23	82
Teor normal ¹	0,1-5	----	0,1-5	----	5-10	----	5-10	----

^{ns} Não significativo a 5%, ¹(KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007)

A diferença entre parte aérea e raízes pode ser explicada pois as plantas podem usar duas estratégias para lidar com altas concentrações de metais próximas as raízes sendo a primeira o mecanismo de exclusão na qual a absorção e/ou o transporte das raízes para a parte aérea são dificultadas e mecanismos internos de tolerância, compartimentalização ou detoxificação de metais no simplasto (RAUSER, 1995).

Xia et al. (2009) estudando a cana-de-açúcar obtiveram nas folhas valores de Cd que variaram de 0,55 a 63,32 mg kg^{-1} e nas raízes 2,26 a 2776,22 mg kg^{-1} , valores estes maiores do que encontrados neste trabalho (tabela 5), o mesmo ocorrendo com Xia e Chi (2009) que obtiveram valores maiores para Pb tanto para folhas (13,58 a 46,56 mg kg^{-1}) como para raízes (21,23 a 1336,86 mg kg^{-1}). Estes trabalhos foram em casa e vegetação testando varias doses, podendo ser a explicação para os valores superiores encontrados nestes trabalhos. Já Li et al. (2007) obtiveram em cana-de-açúcar cultivada em local próximo a uma mina abandonada de

manganês chumbo e cádmio concentrações foliares (Cd 0,19 mg kg⁻¹; Pb 1,3 mg kg⁻¹) maiores e de raízes (Cd 0,57 mg kg⁻¹ e Pb 1,8 mg kg⁻¹) menores do que às encontradas neste trabalho.

Tabela 5 - Teores (mg kg⁻¹) de cromo e cádmio determinados na folha +1 e raízes da cana coletadas no campo em duas épocas

Tratamento	Cromo				Cádmio			
	Cana-Planta		Cana-Soca		Cana-Planta		Cana-Soca	
	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz	Folha +1	Raiz
Testemunha	1,05	12,87	3,20	7,15	0,032	2,94	0,032	1,47
Turfa	0,67	10,22	2,45	7,17	0,032	1,44	0,047	1,05
Torta de Filtro	1,90	20,30	2,55	12,85	0,055	2,00	0,027	0,88
Vermiculita	0,97	13,85	2,97	7,82	0,030	1,75	0,040	0,90
Fosfato	1,00	18,17	2,42	8,72	0,030	2,05	0,057	1,00
Silicato	1,15	27,00	2,30	8,32	0,045	2,57	0,042	2,28
Média	1,12	17,07	2,65	8,67	0,037	2,12	0,041	1,26
F	1,47 ^{ns}	0,52 ^{ns}	2,66 ^{ns}	0,77 ^{ns}	1,66 ^{ns}	2,13 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,92 ^{ns}
DMS	1,42	25,4	1,2	5,84	0,03	1,8	0,04	1,75
CV (%)	60	98	18	55	43	35	68	61
Teor normal ¹	0,1-0,5	----	0,1-0,5	----	0,01-0,2	----	0,01-0,2	----

^{ns} Não significativo a 5%, ¹(KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007)

A tabela 6 mostra que nos materiais coletados do campo houve diferença significativa entre cana planta e cana soca tanto na folha +1 como na raiz. O único metal onde não houve diferença foi o Cd na folha +1. Os valores da folha +1 aumentaram da cana planta para a cana soca e os valores das raízes diminuíram revelando que a planta diminui a concentração destes metais nas raízes e aumenta na folha mostrando que possivelmente após o corte da cana planta o metal que estava localizado nas raízes é translocado para as folhas. Estes resultados mostram que os metais em estudo possuem mobilidade dentro da planta.

Tabela 6 - Comparação da concentração de metais (mg kg⁻¹) entre cana planta e cana soca provenientes de materiais coletados no campo

Tratamento	Folha+1				Raiz			
	Ni	Pb	Cd	Cr	Ni	Pb	Cd	Cr
Cana planta	0,62a	0,47a	0,037	1,12a	16,6a	62,5a	2,12a	17,0a
Cana soca	1,67b	0,96b	0,041	2,65b	9,46b	34,8b	1,26b	8,67b
Média	1,14	0,71	0,039	1,88	13,03	48,65	1,69	12,83
F	66	41	0,2 ^{ns}	43	42	23	22	14
DMS	0,23	0,13	0,014	0,42	2,02	10,61	0,34	4,11
CV (%)	19	18	34	21	15	20	19	30

Médias seguidas de letra diferente nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ^{ns} Não significativo

Diversos trabalhos estudaram o teor de metais pesados em cana adubada com lodo de esgoto (CHIBA et al., 2008; MILLIOLI; SILVA, 2001) e escoria de siderurgia (SOBRAL et al., 2011) não detectando metais na planta. Já outros conseguiram detectar metais pesados em cana como 1,9 mg kg⁻¹ de Ni e 19,34 mg kg⁻¹ de Pb na folha (CAMILOTTI et al., 2007). Algumas pesquisas encontraram baixas concentrações não proporcionais aos teores encontrados no solo (COLLIN; DOELSCH, 2010) e não detectaram os metais pois, estavam abaixo do método analítico empregado (OLIVEIRA; MATTIAZZO, 2001).

Nas tabelas 7 e 8 constata-se que no estudo dos teores de metais nos toletes pré-germinados não houve diferença entre os tratamentos para todos os metais ao nível de 5% de significância. Semelhante ao que ocorreu com amostras provenientes do campo, nos toletes pré-germinados os maiores teores também foram encontrados nas raízes.

Tabela 7 - Teores (mg kg⁻¹) de níquel e chumbo na parte aérea e raízes dos toletes pré-germinados em duas épocas

Tratamento	Níquel				Chumbo			
	Cana-Planta		Cana-Soca		Cana-Planta		Cana-Soca	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Testemunha	1,88	5,57	0,58	7,38	0,53	5,64	0,68	4,47
Turfa	1,65	4,92	0,55	5,19	0,57	5,57	0,65	4,56
Torta de Filtro	1,92	5,65	0,66	4,03	0,54	5,07	0,60	4,45
Vermiculita	1,88	4,84	0,54	3,81	0,58	4,74	0,58	3,85
Fosfato	2,02	4,92	0,71	4,15	0,67	5,84	0,64	5,43
Silicato	1,84	5,53	0,73	4,81	0,59	5,33	0,69	3,83
Média	1,86	5,27	0,63	4,90	0,58	5,36	0,64	4,43
F	0,23 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,54 ^{ns}
DMS	0,47	4,7	0,3	12,67	1,5	3,54	0,38	3,76
CV (%)	27	31	34	59	34	27	25	56
Teor normal ¹	0,1-5	----	0,1-5	----	5-10	----	5-10	----

^{ns} Não significativo a 5%, ¹(KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007)

Apesar de o solo estar contaminado com altas concentrações de chumbo sendo que os outros elementos não atingiram os valores orientadores, como visto na tabela 1, a planta concentrou os metais nas raízes. Os mecanismos envolvidos na tolerância das plantas a altas concentrações de metais no solo são vários podendo estar relacionados às diferenças na estrutura e no funcionamento das membranas celulares, na remoção de íons do metabolismo por armazenamento em formas fixas e/ou insolúveis em vários órgãos e organelas, alteração em padrões metabólicos. A formação de fitoquelatinas pode ser a principal razão para a tolerância de algumas espécies aos altos teores de Zn e Cd no solo (ZEITTOUNI et al, 2007).

O aumento da concentração de metais no citoplasma das plantas leva à ativação da síntese de fitoquelatinas, que seqüestram os íons metálicos evitando concentrações críticas nas células.

Tabela 8 - Teores (mg kg^{-1}) de cromo e cádmio na parte aérea e raízes dos toletes pré-germinados em duas épocas

Tratamento	Cromo				Cádmio			
	Cana-Planta		Cana-Soca		Cana-Planta		Cana-Soca	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Testemunha	1,78	6,80	1,04	12,83	0,12	0,18	0,14	0,33
Turfa	0,87	4,99	0,81	11,52	0,10	0,18	0,06	0,12
Torta de Filtro	1,81	6,17	1,28	9,49	0,09	0,17	0,07	0,10
Vermiculita	1,07	6,86	0,78	7,30	0,13	0,16	0,10	0,20
Fosfato	1,69	5,89	1,05	9,35	0,08	0,18	0,04	0,11
Silicato	1,23	7,20	1,28	11,90	0,12	0,52	0,05	0,12
Média	1,41	6,32	1,04	10,4	0,11	0,23	0,07	0,16
F	1,08 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,78 ^{ns}	1,02 ^{ns}	2,1 ^{ns}	2 ^{ns}	2,72 ^{ns}
DMS	0,97	14	0,57	32,16	0,4	1,3	0,9	0,65
CV (%)	54	37	48	44	36	87	94	65
Teor normal ¹	0,1-0,5	-----	0,1-0,5	-----	0,01-0,2	-----	0,01-0,2	-----

^{ns} Não significativo a 5%, ¹(KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007)

Houve diferença significativa entre a cana planta e cana soca para Ni e Cr na parte aérea e para Pb e Cr na raiz (tabela 9). Para os metais significativos na parte aérea houve a diminuição da concentração da cana planta para a soca, onde o fenômeno inverso foi observado no campo. Na raiz existe um decréscimo na concentração de Pb e um acréscimo na concentração de Cr.

Tabela 9 - Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre cana planta e cana soca provenientes do tolete pré-germinado

Período	Parte aérea				Raiz			
	Ni	Pb	Cd	Cr	Ni	Pb	Cd	Cr
Cana Planta	1,87a	0,58	0,11	1,41a	5,27	5,36a	0,23	6,32a
Cana Soca	0,63b	0,64	0,07	1,04b	4,9	4,43b	0,16	10,4b
Média	1,25	0,61	0,09	1,22	5,08	4,89	0,19	8,36
F	12,9	4,95 ^{ns}	6,13 ^{ns}	7,91	0,47 ^{ns}	34	0,83 ^{ns}	20,4
DMS	0,08	0,07	0,041	0,3	0,91	0,28	0,14	1,66
CV (%)	6	7	23	23	17	6	68	19

Médias seguidas de letra diferente nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ^{ns} Não significativo.

As tabelas 10 e 11 comparam na cana planta e cana soca, respectivamente, as concentrações de metais obtidas no campo e no tolete. Os resultados mostram que na cana planta a concentração de metais nas raízes do tolete pré-germinado é menor do que o encontrado no campo. Já para a parte aérea, na cana planta o tolete tem uma concentração maior para o Ni e Cd e para o Pb e Cr as concentrações não diferiram entre si. Na cana soca o campo possui as maiores concentrações tanto para parte aérea como para raízes, com exceção do Cd onde não houve diferença significativa.

Tabela 10 - Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre campo e tolete pré-germinado provenientes de materiais coletados na cana planta

	Folha+1/Parte aérea				Raiz			
	Ni	Pb	Cd	Cr	Ni	Pb	Cd	Cr
Campo	0,62a	0,47	0,037a	1,12	16,6a	62,5a	2,12a	17,0a
Tolete pré-germinado	1,87b	0,58	0,11b	1,41	5,27b	5,36b	0,23b	6,32b
Média	1,24	0,52	0,07	1,26	10,9	33,9	1,17	11,66
F	14	29 ^{ns}	50	4,15 ^{ns}	43	49	84	21
DMS	0,12	0,12	0,02	0,36	3,12	14,9	0,37	4,29
CV (%)	9	21	25	19	27	41	30	35

Médias seguidas de letra diferente nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ^{ns} Não significativo.

Tabela 11 - Comparação da concentração de metais (mg kg^{-1}) entre campo e tolete pré-germinado provenientes de materiais coletados na cana soca

	Folha+1/Parte aérea				Raiz			
	Ni	Pb	Cd	Cr	Ni	Pb	Cd	Cr
Campo	1,67a	0,96a	0,07	2,65a	9,46a	34,8a	1,26a	8,67
Tolete pré-germinado	0,63b	0,64b	0,041	1,04b	4,9b	4,43b	0,16b	10,4
Média	1,15	0,8	0,055	1,84	7,18	19,6	0,71	9,53
F	76	26	3,87 ^{ns}	66	40	29	24	1,54 ^{ns}
DMS	0,21	0,04	0,034	0,37	1,31	10,33	0,4	2,56
CV (%)	1,14	5	63	18	17	49	52	25

Médias seguidas de letra diferente nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ^{ns} Não significativo.

Segundo Reis et al. (1999), a metodologia do tolete pré-germinado é a que melhor expressa a quantificação de bactérias no interior da planta. Em relação à concentração de metais, observando os resultados obtidos nas tabelas acima é possível afirmar que independente do período de coleta a concentração de metais nas raízes do tolete é menor. Para a parte aérea, dependendo do período tem concentração maior ou menor do que a encontrada

em materiais coletados no campo. Isso mostra que os toletes não refletem as condições de metais encontradas nos materiais provenientes do campo.

Uma possível explicação para a concentração de metais na parte aérea do tolete pré-germinado na cana planta ser maior do que o encontrado no campo pode ser que no momento da germinação dos toletes os metais presentes no colmo são translocados para a parte aérea. Nas raízes, uma explicação para o fato de a concentração de metais serem menores pode ser que a concentração no tolete é diluída após a germinação, pois a raiz da planta passa a não ter mais contato com o metal. Não existem pesquisas desta metodologia em plantas provenientes de áreas contaminadas com metais. O desafio será encontrar uma metodologia em que os resultados expressem fielmente, em ambos os casos (metais e bactérias) as condições reais no campo.

As tabelas 12, 13 e 14 mostram a produção, teores e extração de metais nas folhas e colmos da cana-de-açúcar cultivada em ambiente contaminado.

De acordo com a definição de Raskin et al. (1994), a cana-de-açúcar variedade IAC87-3396 cultivada em ambiente contaminado não pode ser considerada uma planta hiperacumuladora de metais. A produção de biomassa (folhas e colmos) proporcionou na média a extração de 481,4 g ha⁻¹ de Ni, 406,4 g ha⁻¹ de Pb, 528,7 g ha⁻¹ de Cr e 22,86 g ha⁻¹ de Cd, como pode ser visualizado na tabela 14.

Tabela 12 – Produção de folhas (kg ha⁻¹) e extração de metais (g ha⁻¹) na cana planta

Tratamentos	Produção	Ni	Pb	Cr	Cd	Total
Testemunha	8860	5,49	4,16	9,30	0,28	19,24
Torta	7750	2,94	2,55	5,19	0,24	10,94
Turfa	6770	6,43	4,87	12,86	0,37	24,53
Vermiculita	7060	3,81	3,10	6,84	0,21	13,97
Fosfato	7090	4,11	3,04	7,09	0,21	14,46
Silicato	6420	4,30	2,76	7,38	0,28	14,73
Média	7320	4,51	3,41	8,11	0,26	16,31

Dos metais estudados, tanto na folha como no colmo o que menos foi extraído pela cana-de-açúcar foi o cádmio, como pode ser visualizado nas tabelas 12 e 13. O elemento mais extraído foi o Cr, sendo este o metal que estava acima dos teores considerados normais em tecidos foliares maduros de acordo com Kabata-Pendias e Mukherjee (2007).

Tabela 13 - Produção de colmos (kg ha⁻¹) e extração de metais (g ha⁻¹) na cana planta

Tratamentos	Produção	Ni	Pb	Cr	Cd	Total
Testemunha	57480	428,2	354,6	493,1	17,2	1293,1
Torta	68720	451,4	421,9	402,7	19,2	1295,2
Turfa	68100	515,5	382,0	543,4	17,7	1458,6
Vermiculita	68130	457,8	362,4	540,2	19,7	1380,1
Fosfato	79200	549,6	515,6	600,3	20,5	1685,4
Silicato	64500	475,3	381,8	543,7	41,2	1442,0
Média	67690	476,9	403,0	520,6	22,6	1423,1

Na tabela 14 podemos visualizar que a extração total média de metais somando Ni, Pb, Cr e Cd presentes nas folhas e colmos na cana planta foi de 1439,4 g ha⁻¹, sendo que apenas 2,26% da extração foi proveniente das folhas. Podemos considerar o colmo como a principal órgão da cana-de-açúcar a ser estudada para fins de extração de metais de solos contaminados.

Tabela 14– Extração de metais (g ha⁻¹) em folhas (F) e colmos (C) da cana-de-açúcar

Tratamento	Ni		Pb		Cr		Cd		Total		Total Geral
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	
Testemunha	5,49	428,2	4,16	354,6	9,30	493,1	0,28	17,2	19,24	1293,1	1312,3
Torta	2,94	451,4	2,55	421,9	5,19	402,7	0,24	19,2	10,94	1295,2	1306,1
Turfa	6,43	515,5	4,87	382,0	12,86	543,4	0,37	17,7	24,53	1458,6	1483,1
Vermiculita	3,81	457,8	3,10	362,4	6,84	540,2	0,21	19,7	13,97	1380,1	1394,0
Fosfato	4,11	549,6	3,04	515,6	7,09	600,3	0,21	20,5	14,46	1685,4	1699,8
Silicato	4,30	475,3	2,76	381,8	7,38	543,7	0,28	41,2	14,73	1442,0	1456,7
Média	4,51	476,9	3,41	403,0	8,11	520,6	0,26	22,6	16,31	1423,1	1439,4

5.3 Quantificação das Bactérias Endofíticas

Para as 3 épocas analisadas não houve diferença significativa entre os tratamentos (tabelas 15, 16 e 17). Na cana planta, os maiores valores encontrados foram para as bactérias isoladas nos meios de cultura JNFb e LGI na parte aérea, sendo que os menores foram para LGI e JMV nas raízes. Aos 6 meses da cana soca, os maiores valores foram para JNFb e JMV raiz e os menores foram para LGI e LGI-P na parte aérea. Na soca, os maiores valores encontrados foram para LGI-P na parte área e nas raízes e os menores valores foram para LGI e JMV nas raízes.

Tabela 15 - Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 16 meses da cana planta

Tratamento	LGI-P		JNFb		LGI		JMV	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Testemunha	5,40	6,88	8,41	6,66	7,52	6,73	5,74	8,43
Turfa	6,43	7,25	7,73	6,57	7,69	5,60	5,24	4,76
Torta de Filtro	6,63	5,87	8,43	6,50	9,02	6,49	5,86	5,19
Vermiculita	8,06	8,59	9,65	7,87	8,73	6,91	7,45	7,38
Fosfato	8,43	7,49	7,88	6,76	7,06	7,88	8,59	6,95
Silicato	7,22	7,97	7,91	7,03	8,73	7,53	8,43	6,96
Média	7,03	7,34	8,33	6,90	8,12	6,85	6,88	6,61
F	0,84 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,45 ^{ns}	1,46 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,86 ^{ns}	1,76 ^{ns}
DMS	8,92	9,29	3,57	3,51	2,66	4,21	14,88	6,53
CV (%)	34	33	18	22	16	24	45	31

^{ns} Não significativo a 5%. Os resultados são médias de 4 repetições.

Tabela 16 - Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 6 meses da cana soca

Tratamento	LGI-P		JNFb		LGI		JMV	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Testemunha	5,02	5,97	5,90	8,90	4,52	5,72	6,12	7,50
Turfa	5,42	6,45	5,70	8,47	4,42	5,70	6,80	6,50
Torta de Filtro	5,22	6,35	6,00	8,15	4,90	5,87	6,82	6,70
Vermiculita	4,92	6,67	5,70	8,40	4,80	5,85	7,00	7,12
Fosfato	4,87	6,55	5,50	8,45	4,90	5,47	6,65	6,67
Silicato	4,97	6,45	5,80	8,42	4,37	5,17	6,87	7,37
Média	5,07	6,40	5,76	8,46	4,65	5,63	6,71	6,97
F	2,9 ^{ns}	2,61 ^{ns}	1,92 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,76 ^{ns}	19,36 ^{ns}
DMS	0,69	1,12	1,3	2,13	4,93	5,67	6,08	2,74
CV (%)	5	5	4	14	39	34	30	1

^{ns} Não significativo a 5%. Os resultados são médias de 4 repetições.

Os valores encontrados neste trabalho estão bem acima de vários outros citados na literatura como Reis Junior et al. (2000a), Gomes et al. (2005), Péres e Casas (2005). Valores próximos foram encontrados por Assis et al. (2000) e Reis Junior et al. (2000b). Como existe uma ligação íntima entre as bactérias e o genótipo da planta esta pode ser uma das explicações para as diferenças entre os vários autores. Tem-se apenas um trabalho com variedades IAC em relação à quantificação, onde Prado Junior (2008) encontrou na variedade IAC93-6006 em média 6,56 e para a variedade RB72454 estudada no mesmo trabalho foi de 6,49. É necessário estudar outras variedades IACs para observar os valores de quantificação das bactérias.

Tabela 17 - Bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) na variedade IAC87-3396 aos 12 meses da cana soca

Tratamento	LGI-P		JNFb		LGI		JMV	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Testemunha	6,32	6,00	5,32	5,65	5,60	5,70	5,92	5,67
Turfa	6,40	6,50	5,62	5,95	5,40	5,15	5,92	5,57
Torta de Filtro	6,20	6,00	5,67	5,42	5,40	5,59	5,40	5,80
Vermiculita	5,65	6,20	6,25	5,25	5,47	5,30	5,15	5,25
Fosfato	5,50	5,82	5,50	6,05	5,72	5,50	5,17	5,22
Silicato	5,85	5,87	6,22	5,35	5,57	5,20	5,80	5,30
Média	5,98	6,06	5,76	5,61	5,53	5,4	5,56	5,47
F	1,62 ^{ns}	0,79 ^{ns}	1,81 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,42 ^{ns}	2,18 ^{ns}	0,59 ^{ns}
DMS	1,21	2,17	0,98	1,06	0,42	0,65	2,12	1,5
CV (%)	9	9	9	17	9	12	8	11

^{ns} Não significativo a 5%. Os resultados são médias de 4 repetições.

Nos trabalhos da literatura não existe um consenso sobre a preferência de localização das bactérias, pois para Reis Junior et al. (2000b) e Gomes et al. (2005) os maiores valores foram encontrados nas raízes e para Muthukumarasamy et al. (1999) e Reis Junior et al. (2000a), os maiores valores foram encontrados na parte aérea. A quantificação e localização das bactérias podem estar associadas a diversos fatores como condições climáticas (COSTA; RUSCHEL, 1981; BELLONE et al., 1996), fertilidade do solo (OLIVEIRA et al., 2003), calagem, adubação, perdas de nitrogênio por lixiviação, entre outros (TRIVELIN, 2000).

A tabela 18 compara a quantificação das bactérias nos diferentes períodos de coleta dos materiais e compara também a quantificação entre parte aérea e raízes. Em relação ao período, somente para as bactérias isoladas no meio JMV na parte aérea não houve diferença. Para a metade das observações (LGI-P raiz, JNFb parte aérea, LGI parte aérea e raiz) os maiores valores da quantificação foram observados na cana planta.

Em relação à parte aérea e raízes, podemos observar que na cana planta houve diferença significativa para as bactérias isoladas do meio JNFb e LGI, onde a maior quantificação foi na parte aérea. No 6 meses cana soca somente no meio JMV os valores entre a parte aérea e raízes não foram significativos, onde todos os valores maiores da quantificação foram encontrados nas raízes. Já na cana soca não houve diferença entre parte aérea e raízes.

Tabela 18 - Comparação das bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) nos períodos entre cana planta, 6 meses cana soca e cana soca

Período	LGI-P		JNFb		LGI		JMV	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Cana planta	7,03aA	7,34aA	8,33aA	6,90aB	8,12aA	6,85aB	6,88aA	6,61abA
6 meses soca	5,07bA	6,40bB	5,76bA	8,46bB	4,65bA	5,63bB	6,71aA	6,97aA
Cana soca	5,98abA	6,06bA	5,76bA	5,61cA	5,53cA	5,40bA	5,56aA	5,47bA
Média	6,03	6,6	6,62	6,99	6,1	5,96	6,38	6,35
F	9,19	9,43	73	71	76	76	3,6	6,2
DMS	0,84	0,53	0,45	0,43	0,53	0,56	1,4	0,82
CV (%)	13	9	6,5	6	8	9	14	12

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

As bactérias que se mantiveram mais estáveis ao longo do cultivo da cana foram as isoladas nos meios de cultura LGI-P na raiz e JMV na parte aérea onde as que mais oscilaram foram JNFb na raiz e LGI na parte aérea. A distribuição mais uniforme entre parte aérea e raiz levando em consideração o período foi na cana soca. Estes resultados contrariam Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) onde relataram que a população de *Herbaspirillum* mantém-se estável ao longo dos ciclos da cultura ao contrário da *Gluconacetobacter diazotrophicus* que decresce ao final dos ciclos.

O “start” fornece uma idéia do potencial bacteriano do colmo que foi plantado no ambiente onde continha os metais. Na tabela 19 pode-se visualizar que, utilizando o start como um grupo controle, a bactéria isolada do meio LGI-P raiz, JMV parte aérea e raiz, LGI parte aérea cana planta e LGI raiz 6 meses soca e colheita soca não diferiram do controle ao nível de 5% de significância.

Tabela 19 - Comparação das médias das bactérias endofíticas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) nas 3 épocas de coleta utilizando o “Start” como controle

Períodos	LGI-P		JNFb		LGI		JMV	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
“Start”	9,15	7,04	7,15	3,98	9,15	4,30	4,65	5,04
Cana Planta	7,03	7,34 ^{ns}	8,33	6,90	8,12 ^{ns}	6,85	6,88 ^{ns}	6,61 ^{ns}
6 meses soca	5,07	6,40 ^{ns}	5,76	8,46	4,65	5,63 ^{ns}	6,71 ^{ns}	6,97 ^{ns}
Cana Soca	5,98	6,06 ^{ns}	5,76	5,61	5,53	5,40 ^{ns}	5,56 ^{ns}	5,47 ^{ns}

ns – Não significativo ao nível de 5% no teste de Dunnett.

Para a bactéria isolada no meio LGI-P na parte aérea houve redução das bactérias, para JNFb na parte aérea aumento na cana planta, queda no 6 meses soca e manutenção da concentração na soca. Para as raízes, houve aumentos subsequentes na cana planta e 6 meses soca com queda na soca. A bactéria isolada no meio LGI na cana planta manteve-se igual ao Start, diminuiu no 6 meses soca e aumentou na soca.

Os resultados obtidos na quantificação das bactérias mostram que comparando os períodos a quantificação no geral é maior na cana planta. A localização da bactéria no interior da planta revelou que na cana planta a quantificação foi maior na parte aérea, no 6 meses da cana soca o predomínio foi na raiz e na colheita da cana soca existiu uma distribuição mais uniforme das bactérias no interior da planta. Na quantificação das bactérias realizada nos colmos antes do plantio na área em estudo, análise que foi chamada de “Start”, mostrou que para os valores não significativos, como por exemplo, a bactéria isolada do meio JMV possivelmente não foi afetada pelos metais presentes na planta.

A população das bactérias podem ser influenciadas pela condição hídrica e nutricional da planta, incluindo o nível de nitrogênio aplicado (REIS JUNIOR et al., 2000b), tecidos utilizados para isolamento (raízes, folhas e colmos), idade da planta (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993) e inoculações realizadas em condições de laboratório ou de campo (SEVILLA et al., 2001).

5.4 Ensaio “*in vitro*”

5.4.1 Chumbo

A tabela 20 mostra que na concentração encontrada nas raízes da planta em condições de campo (62 mg L⁻¹, tabela 4), as bactérias *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* não diferiram da testemunha (sem adição de metais), diferentemente do que ocorreu para *Herbaspirillum* e *Azospirillum*. Dobrando e quadruplicando a concentração do metal no meio de cultura, houve influência no crescimento em todas as espécies estudadas, sendo que as mais comprometidas em seu crescimento foram *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. A concentração máxima tolerada foi a máxima estudada, 248 mg L⁻¹. Este valor foi inferior

ao encontrado por Hayat et al. (2002) que obtiveram populações de BFN tolerantes a 400 mg L⁻¹ de Pb.

O teste de Spearman mostrou que existiu correlação entre as concentrações de chumbo acrescidas ao meio de cultura e os padrões de crescimento para as bactérias *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. Para a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* as variáveis concentração e padrão de crescimento não se correlacionaram.

Tabela 20 - Padrões de crescimento¹ de bactérias em 4 concentrações de chumbo (mg L⁻¹) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições

Bactérias	Concentração (mg L ⁻¹)				Teste de Spearman
	0	62	124	248	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5	4	3	3	-0,80
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5	5	4	4	ns
<i>Azospirillum amazonense</i>	5	3,5	3	2	-0,96
<i>Burkholderia tropica</i>	5	5	4	3	-0,77

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação. ns - Não significativo ao nível de 5% de significância.

5.4.2 Níquel

A tabela 21 mostra que a bactéria mais tolerante ao níquel até a dose de 20 mg L⁻¹ foi a *Burkholderia tropica*. As bactérias *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* foram sensíveis a maior doses aplicada, sendo a *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* mais tolerantes, isto é, obtiveram um padrão de crescimento maior. Nas outras concentrações ocorreu o inverso, onde as bactérias *Azospirillum* e *Burkholderia* foram mais tolerantes ao passo que *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* foram mais sensíveis.

A concentração máxima tolerada foi a máxima estudada, 40 mg L⁻¹, resultado dez vezes menor ao encontrado por Hayat et al. (2002) que obtiveram em seu estudo BFN assimbióticas tolerantes a 400 mg L⁻¹ de Ni e Kamika e Momba (2011) que encontraram bactérias tolerantes a 89 mg L⁻¹ de Ni. A tabela 21 também mostrou através do teste de Spearman que para todas as bactérias estudadas houve correlação entre as concentrações de níquel adicionados no meio de cultura e os padrões de crescimento.

Tabela 21 - Padrões de crescimento¹ de bactérias em 4 concentrações de níquel (mg L^{-1}) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições

Bactérias	Concentração (mg L^{-1})				Teste de Spearman
	0	10	20	40	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5	3,25	3,25	3,25	-0,65
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5	3,75	3,5	3	-0,69
<i>Azospirillum amazonense</i>	5	5	4	2,5	-0,94
<i>Burkholderia tropica</i>	5	5	5	2,75	-0,76

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação.

5.4.3 Cromo

Para o cromo, a concentração máxima tolerada foi de 17 mg L^{-1} , a mesma concentração encontrada nas raízes da cana planta. Para esta concentração houve um crescimento muito reduzido de *Burkholderia tropica* e *Herbaspirillum seropedicae*, mostrando que, dentre os metais estudados isoladamente, o cromo foi o mais tóxico para as bactérias, conforme pode ser visualizado na tabela 22. Não houve crescimento de bactérias nas concentrações de 34 e 68 mg L^{-1} . Diversos autores isolaram bactérias com concentrações deste metal bem maiores do que usados neste experimento como em efluentes de curtume onde Hag e Shakoory (1998) isolaram bactérias tolerantes a 25 mg mL^{-1} e Sundar et al. (2010) onde encontraram bactérias tolerantes de 100 a 400 mg mL^{-1} , ambos estudos utilizando o Cr^{+6} em concentrações bem maiores do que as utilizadas neste estudo.

Uma possível causa da diferença entre os resultados da literatura e os obtidos neste trabalho pode ser que as bactérias isoladas na literatura tenham sofrido uma seleção natural de estirpes adaptadas a condição extrema local (alta concentração de Cr^{+6}). Neste trabalho, temos duas situações a serem exploradas: a situação “*in vitro*” onde as bactérias não sofreram a seleção natural do ambiente e portanto não toleraram o Cr^{+6} em meio de cultura e a situação do cromo no solo onde possivelmente este cromo com valência +6 foi reduzido a +3 sendo uma parte associada a matéria orgânica e a outra parte absorvida pela planta, parte esta que não prejudicou a quantificação das bactérias na planta.

Tabela 22 - Padrões de crescimento¹ de bactérias em 4 concentrações de cromo (mg L^{-1}) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições

Bactérias	Concentração (mg L^{-1})				Teste de Spearman
	0	17	34	68	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5	1	0	0	-0,95
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5	0	0	0	-0,77
<i>Azospirillum amazonense</i>	5	0	0	0	-0,77
<i>Burkholderia tropica</i>	5	1	0	0	-0,95

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação.

Para o metal cromo, o teste de Spearman mostrou que houve associação entre os padrões de crescimento e as concentrações de cromo acrescidas ao meio de cultura para todas as bactérias estudadas.

5.4.4 Cádmi

A tabela 23 mostra que o crescimento das 4 espécies de bactérias no meio de cultura com diferentes concentrações de cádmio foi semelhante, onde somente na concentração de 8 mg L^{-1} houve limitação do crescimento sendo que a concentração máxima tolerada foi a máxima estudada, 8 mg L^{-1} . Angle et al. (1993) obtiveram rizóbios de regiões temperadas tolerantes a $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}$. Outros autores obtiveram valores maiores como Matsuda et al. (2002) que encontraram 60 isolados tolerantes a $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}$, mesmo valor encontrado por Moreira et al. (2008) para *Azospirillum amazonense*. Hayat et al. (2002) obtiveram em seu estudo bactérias fixadoras de nitrogênio assimbióticas tolerantes a $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}$.

Tabela 23 - Padrões de crescimento¹ de bactérias em 4 concentrações de cádmio (mg L^{-1}) em meio de cultura e Teste de Spearman. Média de 5 repetições

Bactérias	Concentração (mg L^{-1})				Teste de Spearman
	0	2	4	8	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	5	5	4	3	-0,95
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5	5	5	3	-0,77
<i>Azospirillum amazonense</i>	5	5	5	3	-0,77
<i>Burkholderia tropica</i>	5	5	4	3	-0,95

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação.

Para todas as bactérias estudadas, o teste de Spearman (tabela 23) mostrou que houve correlação entre as concentrações de cádmio acrescidas em meio de cultura e os padrões de crescimento.

5.4.5 Associação entre Metais

Na associação entre dois metais (tabela 24) a *Burkholderia* não cresceu em todas as associações testadas, *Gluconacetobacter* cresceu em apenas um meio (Cd/Cr) e as bactérias que se mostraram mais tolerantes foram a *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, ambas tolerantes às misturas de Cd/Cr, Ni/Cd e Ni/Cr. Neste ponto é necessário ressaltar que foi atribuída a nota mínima (1-crescimento muito reduzido). A mistura que parece ser menos tóxica foi a Cd/Cr pois das 4 bactérias 3 cresceram neste meio. Moreira et al. (2008) não obtiveram crescimento para estirpes de *Azospirillum* na mistura de 54,1 mg L⁻¹ de Cd e 500 mg L⁻¹ de Zn.

Tabela 24 - Padrões de crescimento¹ determinados para os 4 gêneros de bactérias nas diferentes associações entre dois metais em meio de cultura. Média de 5 repetições

Concentração (mg L ⁻¹)	Padrões de crescimento			
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Burkholderia tropica</i>
Ni/Pb (10/62)	0	0	0	0
Ni/Cr (10/17)	1	0	1	0
Ni/Cd (10/2)	1	0	1	0
Pb/Cd (62/2)	0	0	0	0
Pb/Cr (62/17)	0	0	0	0
Cd/Cr (2/17)	1	1	1	0

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação.

Para a associação com três e quatro metais (tabela 25) não houve crescimento bacteriano mostrando que juntos no meio de cultura os metais são extremamente tóxicos para as bactérias, o mesmo não ocorreu na planta, onde foram encontrados os quatro tipos de bactérias. A capacidade de uma bactéria em tolerar uma definida concentração de metal sob condições “*in-vitro*” pode não ser igualmente aplicada em condições naturais por causa da

natureza complexa do meio ambiente em que está inserido (HAYAT et al., 2002; KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Tabela 25 - Padrões de crescimento¹ determinados para os 4 gêneros de bactérias nas diferentes associações entre três e quatro metais em meio de cultura. Média de 5 repetições

Concentração (mg L ⁻¹)	Padrões de crescimento			
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Burkholderia tropica</i>
Ni/Pb/Cr (10/62/17)	0	0	0	0
Ni/Cr/Cd (10/17/2)	0	0	0	0
Pb/Cd/Cr (62/2/17)	0	0	0	0
Pb/Cd/Ni (62/2/10)	0	0	0	0
Pb/Cr/Cd/Ni (62/17/2/10)	0	0	0	0

¹ padrões de crescimento (PC): 0 - sem crescimento visual; 1 - crescimento muito reduzido; 2 - crescimento baixo; 3 - crescimento intermediário; 4 - crescimento abundante; 5 - crescimento máximo, não diferindo do crescimento em meio sem contaminação.

Uma limitação do uso de métodos “*in vitro*” é que alguns metais, como Cu, Pb e Ni são menos tóxicos quando complexados com compostos orgânicos do que em forma livre (BABICH; STOTZKY, 1983) podendo superestimar as concentrações de metais toleradas. Além disso, as concentrações de metais do meio de cultura pode não ser as concentrações metálicas reais encontradas nos habitats dos quais a bactéria foi isolada (CHAUDRI et al., 1993).

A tabela 26 mostra os padrões de crescimento para cada bactéria com a soma alcançada nos respectivos metais para o estabelecimento da toxicidade e tolerância.

Tabela 26- Soma dos padrões de crescimento para cada bactéria

Bactérias	Associação de metais	Cr	Ni	Pb	Cd	Total
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	3	6	14,75	15	17	55,75
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1	5	15,25	18	18	57,25
<i>Azospirillum amazonense</i>	3	5	13,5	16,5	18	56,0
<i>Burkholderia tropica</i>	0	6	17	17	17,75	57,75

A ordem de toxicidade dos metais para cada bactéria foram: *Herbaspirillum seropedicae* – Associação de metais > Cr > Ni > Pb > Cd; *Gluconacetobacter diazotrophicus* – Associação de metais > Cr > Ni > Pb = Cd; *Azospirillum amazonense* – Associação de metais > Cr > Ni > Pb > Cd; *Burkholderia tropica* – Associação de metais > Cr > Pb = Ni >

Cd. A ordem de tolerância aos metais foi *Burkholderia tropica* > *Gluconacetobacter diazotrophicus* > *Azospirillum amazonense* > *Herbaspirillum seropedicae*.

As bactérias isoladas de ambientes poluídos são mais tolerantes a altas concentrações de metais do que bactérias isoladas de ambientes não poluídos. Isto ocorre, pois após a adição dos metais na comunidade bacteriana, ocorre a sobrevivência de bactérias tolerantes ao metal e a morte das sensíveis, com subsequente competição e adaptação (DIAZ-RAVINA; BAATH, 1996).

O estudo envolvendo os quatro gêneros relacionados à fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar (*Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum* e *Burkholderia*) quanto à toxicidade dos metais “*in vitro*” está sendo realizada pela primeira vez, e pelos resultados obtidos verificou-se que a associação de metais e o cromo inibiram o crescimento das bactérias sendo que o metal menos tóxico foi o cádmio. A bactéria fixadora de nitrogênio mais tolerante foi a *Burkholderia tropica*.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos conclui-se que:

1. Foram encontradas bactérias endofíticas na variedade de cana-de-açúcar IAC87-3396;
2. Houve distribuição dos metais (Pb, Ni, Cr e Cd) na cana-de-açúcar com maior concentração nas raízes da planta;
3. A cana-de-açúcar não pode ser considerada uma cultura fitoextratora de metais pesados;
4. A metodologia do tolete pré-germinado não refletiu as condições de concentração de metais (Pb, Ni, Cr e Cd) em relação aos materiais coletados no campo;
5. A tolerância das bactérias (*Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*) aos metais (Pb, Ni, Cr e Cd) “*in situ*” diferiu da “*in vitro*”;
6. O cromo e a associação entre 2, 3 e 4 metais limitaram o crescimento “*in vitro*” de todas as bactérias estudadas.

REFERÊNCIAS

- AGRAFNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **Agriannual 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. p. 215-220.
- ANGLE, J.S.; MACGRATH, S.P.; CHAUDRI, A.M.; CHANEY, R.L.; GILLER, K.E. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 575–580, 1993.
- ANSARI, M.I.; MALIK, A. Season variation of different microorganisms with nickel and cadmium in the industrial waste water and agricultural soils. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 167, p. 151-163, 2010.
- ASSIS, C.A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, V.; CHIBOTA, V.K.; TSEICHIY, A.K.; AKAO, S. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with Japanese sugarcane cultivar. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, p. 759-765, 2000.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to estuarine marine fungi and amelioration by magnesium in sea water. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 19, p. 193-202, 1983.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 922-928, 1997.
- BARZEGAR, A.R.; KOOCHEKZADEH, A.; XING, B.; HERBERT, S.J. Changes of Cd, Ni and Zn in sugarcane cultivated soils. **Water, Air and Soil Pollution**. Netherlands, v. 161, p. 97-112, 2005.
- BELLONE, C.H.; BELLONE, S.C.; PEDRAZA, R.O. Hydric deficiency and acetylene reduction in sugarcane roots. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 7, 1996, Faisalabad, Pakistan. 1996. p. 125-126.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BOONYAPOOKANA, B.; PARKPLAN, P.; TECHAPINYAWAT, S.; DELAUNE, R.D.; JUGSUJINDA, A. Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). **J. Environ. Sci. Heal.**, v.40, p.117-137, 2005.
- CAMILOTTI, F.; MARQUES, M.O.; ANDRIOLI, I.; SILVA, A.R.; JUNIOR, L.C.T.; NOBILE, F.O. Acumulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, p. 284-293, 2007.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHANDRA, S. K.; KAMALA, C.T.; CHARY, N.S.; BALARAM, V.; GARCIA, G. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. **Chemosphere**, v.58, p.507-514, 2005.

CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 12, p. 1643-1651, 1993.

CHEN, Y.; LI, X.D.; SHEN, Z.G. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 187-196, 2004.

CHIBA, M.K.; MATTIAZZO, M.E.; OLIVEIRA, F.C. Cultivo da cana-de-açúcar em argissolo tratado com lodo de esgoto. II. Fertilidade do solo e nutrição da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 653-662, 2008.

CLEMENTS, H.F. **Sugarcane crop logging and crop control: principles and practices**. Hawaii: University Press of Hawaii, 1980. 520 p.

COLLIN, E.; DOELSCH, E. Impact of high soilbourne heavy metal concentration on the mobility and phytoavailability of these elements for sugarcane. **Geoderma**, Amsterdam, v. 159, p. 452-458, 2010.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Decisão de Diretoria No 195-2005-E**, de 23 de novembro de 2005. São Paulo, 2005. 4 p. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf. Acesso em: 20 ago. 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relação de áreas contaminadas**. São Paulo, 2010. 14 p. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/texto_explicativo_dez_10.pdf. Acesso em: 13 mar. 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. 52ª Reunião da Câmara Técnica de Assuntos Jurídicos, de 8 de julho de 2009. Brasília, DF, 2009. 15 p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em: 10 ago. 2009.

COSTA, J.M.T.; RUSCHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugarcane plants. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. (Ed.). **Associative N₂-fixation**. Boca Raton: CRC, 1981. v. 2, p. 109-118.

DAHLIN, S.; WITTER, E.; MÄRTENSSON, A.; TURNER, A.; BÄÄTH, E. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1405–1415, 1997.

DAR, N.; SHAKARI, A.R. Chromium tolerant yeast strains isolate from industrial effluents and their possible use in environmental clean-up. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 63, p. 744-750, 1999.

DIAZ-RAVINA, M.; BAATH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 2970–2977, 1996.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V.O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38 p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

ENSLEY, B.D. Rationale for use of phytoremediation. In: RASKIN, I.; ENSLEY, B.D. (Ed.). **Phytoremediation of toxic metals – Using plants to clean up the environment**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p.3-11.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILIOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY - EEA. **Progress in management of contaminated sites (CSI 015)**. Copenhagen, Denmark, 2007. Disponível em: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites/progress-in-management-of-contaminated-1>. Acessado em: 15 jan. 2012.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars in México. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

GILLIS, M.; TRÂN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLWMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomic in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietmaniensis* sp. nov. for N₂ fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 45, p. 274-289, 1995.

GOMES, A.A.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, p. 1105-1113, 2005.

HAQ, R.; SHAKOORI, A.R. Microbiological treatment of industrial wastes containing toxic chromium involving successive use of bacteria, yeast and algae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 583-585, 1998.

HAYAT, S.A.I.; AZAM, Z.M.; INAM, A. Effect of long-term application of oil refinery wastewater on soil health with special reference to microbiological characteristics. **Bioresource Technology**, Essex, v. 84, p. 159–163, 2002.

JAIN, R.; SHRIVASTAVA, A.K.; SHRIVASTAVA, S. Heavy metals in industrial wastes and their effect on sugarcane. **Sugarcane International**, Singapore, v. 22, p. 23-27, 2004.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica*, a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of others nitrogen fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A.B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007. 550p.

KAMIKA, I.; MOMBA, M.N. Comparing the tolerance limits of selected bacterial and protozoan species to nickel in waste water systems. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 410, p. 172-181, 2011.

KAMNEV, A.A.; TUGAROVA, A.V.; ANTONYUK, L.P. Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasiliense* respond differently to heavy metal stress. **Microbiology**, Saratov, v. 76, p. 908-911, 2007.

KINKLE, B.K.; ANGLE, J.S.; KEYSER, H.H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, p. 315-319, 1987.

KUBOTA, H.; TAKENAKA, C. *Arabis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn. **Int. J. Phytoremediation**, v.5, p.197-120, 2003.

LI, M.S.; LUO, Y.P.; SU, Z.Y. Heavy metal concentration in soil and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 168-175, 2007.

LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; DUNHAM, S.J.; MCGRATH, S.P. Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, p. 1919-1926, 2001.

LONE, M.I.; HE, Z.; STOFFELLA, P.J.; YANG, X. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University. Science B**, Hangzhou, Zhejiang Province, China, v. 9, n. 3, p. 210-220, 2008.

LOPES, E.L. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2007, Piracicaba, SP. **Anais**. Piracicaba: INPN Brasil, 2007. p. 43-67.

LORENZ, S.E.; MCGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Assessment of free-living nitrogen fixation activity as a biological indicator of heavy metal toxicity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 601–606, 1992.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potaffos, 2ed. , 1997, 319p.

MARQUES, M.O.; MELO, W.J.; MARQUES, T.A. Metais pesados e o uso de biossólido na agricultura. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALÉM SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. **Biossólidos na agricultura**. 2. ed. São Paulo: ABES/SP, 2002. p. 365-403.

MARTENSSON, A.M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 435-445, 1992.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 343–355, 2002.

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

MENGEL, K.; KIRBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001, 849p.

MILLIOLI, V.; SILVA, F.C. Acúmulo de metais pesados em solo tratado com lodo de esgoto em cultivo de cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, p. 28-30, 2001.

MOREIRA, F.M.S.; LANGE, A.; KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; NOBREGA, R.S.A.; LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 749-761, 2008.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effects in plant growth. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 454-464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINASIMHAN, C. Influence of nitrogen fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 29, p. 157-164, 1999.

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

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

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 59-61, 2003.

OLIVEIRA, F.C.; MATTIAZZO, M.F. Metais pesados em latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 581-593, 2001.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarus* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 11, p. 111-115, 1991.

PÉRES, J.; CASAS, M. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo canã de açúcar. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 26, p. 13-19, 2005.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.C.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 61-65, 1991.

PRADO JUNIOR, J.P.Q. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2008.

PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 6, p. 275-321, 2003.

RASKIN, I.; KUMAR, P.N.; DUSHENKOV, J.R.; SALT, D.E. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion Biotechnology**, v.5, p. 285-290, 1994.

RAUSER, W.E. Phytochelatins and related peptides – structure, biosynthesis and function. **Plant Physiology**, v.109, p.1141-1149, 1995.

RAYMENT, G.E.; JEFREY, A.J.; BARRY, G.A. Heavy metals in Australian sugarcane. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, p. 3202-3212, 2002.

REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M. Metal-accumulating plants. In: RASKIN, I.; ENSLEY, B.D. (Ed.). **Phytoremediation of toxic metals – Using plants to clean up the environment**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 193-229.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, p. 139-143, 1998.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V.M.; PERIN, L.; REIS JUNIOR, F.B. **Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1999. 5 p. (Comunicado Técnico, 35).

REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 219, p. 153-159, 2000a.

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 985-994, 2000b.

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas, condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 103-113, 2004.

RIBEIRO-GRANJA, A.C. **Elementos potencialmente tóxicos em caldo de cana-de-açúcar cultivada em solo tratado com lodo de esgoto**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ROPER, M.M.; LADHA, J.K. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 211-224, 1995.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent development and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, p. 1-9, 2008.

SARMA, H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 4, p. 118-138, 2011.

SCHWARTZ, C.; ECHEVARRIA, G.; MOREL, J.L. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. **Plant Soil**, v.24, p.27-35, 2003.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 4, p. 358-366, 2001.

SOBRAL, M.F.; NASCIMENTO, C.W.A.; CUNHA, K.P.V.; FERREIRA, H.A.; SILVA, A.J.; SILVA, F.B.V. Escória de siderurgia e seus efeitos nos teores de nutrientes e metais pesados em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 15, p. 687-872, 2011.

SUMNER, M.E. Crop responses to *azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, New York, v. 12, p. 53-123, 1990.

SUNDAR, K.; VIDYA, R.; MURKHERYEE, A.; CHADRASIKARA, N. High chromium tolerant bacterial strain from Palar river basin: impact of tannery pollution. **Research Journal of environmental and Earth Sciences**, v. 2, n. 2, p. 112-117, 2010.

TAMURA, H.; HONDA, M.; SATO, T.; KAMACHI, H. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Journal of Plant Research**, 118, p.355-359, 2005.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMENES-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 49-55, 2000.

TEIXEIRA, K.R.S. *Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-açúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene nifA, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio. 1997. 152p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

TRIVELIN, P.C.O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com uso do traçador ¹⁵N**. 2000. 143 p. Tese (Livre-Docência) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

TSUTIYA, M.T. Metais pesados: O principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20., Rio de Janeiro, 1999. **Anais...** Rio de Janeiro, ABES, 1999. p.753-761.

WEI, S.H.; ZHOU, Q.X.; WANG, X.; CAO, W.; REN, L.P.; SONG, Y.F. Potential of weed species applied to remediation of soils contaminated with heavy metals. **J. Environ. Sci. (China)**, v.16, p.868-873, 2004.

XIA, H.; CHI, X. Uptake and growth response to *Saccharum officinarum* to lead pollution in soil. **IEEEExplore**, New York, p. 1-4, 2009.

XIA, H.; YAN, Z.; CHI, X. Evaluation of the phytoremediation potential of *Saccharum officinarum* for Cd-contaminated soil. **IEEEExplore**, New York, p. 1-5, 2009.

YADAV, D.V.; RADHA, J.; RAI, R.K. Impact of heavy metals on sugarcane. In: SHERAMETI, I.; VARMA, A. (Ed.). **Soil heavy metals**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 338-367. (Soil Biology, 19).

YAN, Y.; XIA, H. Evaluation of the phytoremediation potential of sugarcane for metal-contaminated soils. **IEEEExplore**, New York, p. 1-4, 2010.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANCEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman, 1992. p. 43-86.

ZEITTOUNI, C.F.; BERTON, R.S.; ABREU, C.A. Fitoextração de cádmio e zinco de um latossolo vermelho-amarelo contaminado com metais pesados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 649-657, 2007.

ANEXO

Anexo A – Digestão nítrico-perclórica: Pesou 250mg, adicionou 500 mL HNO₃ purificado + 100 mL ácido perclórico P.A. (Carlo Erba), a digestão a frio foi feita a noite e no dia seguinte foi ao bloco onde iniciou com 100 °C e foi subindo 20 °C a cada 30 minutos até a solução líquida secar, dissolveu e aferiu para 30ml com água ultra pura Mille-Q e procedeu a leitura direta no ICP-MS.

Anexo B – Análise da amostra certificada SRM NIST 1515

Tabela 27 - Resultados das análises na amostra certificada SRM NIST 1515

Elemento	Teor (mg kg ⁻¹)		Recuperação (%)
	Certificado	Obtido	
Cr	0,3*	0,322 ± 0,003	107,3 ± 1
Ni	0,91 ± 0,12	0,91 ± 0,02	99,8 ± 2
Cd	0,013 ± 0,002	0,015 ± 0,001	117,7 ± 7,6
Pb	0,47 ± 0,027	0,43 ± 0,02	92,5 ± 4,2

* Valor de referência não certificado (NIST 1515)

Anexo C – Condições operacionais do ICP-MS

Tabela 28 - Condições operacionais do ICP-MS empregada nas análises

Parâmetro do Plasma	
Potência de Radio Frequência – RF (Watts)	1.500
Potencia RF matching (V)	1,73
Profundidade de amostragem (mm)	8
Cones de amostragem e separação	Nickel
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,9
Vazão do gás do Plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,1

Anexo D – Solução Salina: 4,5g KOH, 3,4g KH₂PO₄, 0,2g MgSO₄.7H₂O, 0,1g NaCl, 0,02g CaCl₂.2H₂O, 2ml solução de micronutrientes, 4ml FeEDTA, ajustar o pH para 7 e completar o volume para 1000ml com água destilada.

Anexo E – JNFb: 5g ácido málico, 0,6g K₂HPO₄, 1,8g KH₂PO₄, 0,2g MgSO₄.7H₂O, 0,1g NaCl, 0,02g CaCl₂.2H₂O, 4,5g KOH, 2g agar, 2ml azul de bromotimol, 4ml de FeEDTA, 1ml de vitamina e 2ml de solução de micronutrientes, ajustar o pH para 5,8.

Anexo F – LGI-P: 100g sacarose, 0,2g K₂HPO₄, 0,6g KH₂PO₄, 0,2g MgSO₄.2H₂O, 0,02g CaCl₂.2H₂O, 0,002g Na₂Mo.2H₂O, 2g agar, 5ml azul de bromotimol, 0,01g FeCl₃.6H₂O, ajustar o pH para 5,5.

Anexo G – LGI: 1g KNO₃, 5g sacarose, 0,2g K₂HPO₄, 0,6g KH₂PO₄, 0,2g MgSO₄.2H₂O, 0,02g CaCl₂.2H₂O, 0,002g Na₂Mo.2H₂O, 2g agar, 5ml azul de bromotimol, 4ml FeEDTA, 1ml vitamina, ajustar o pH para 6 a 6,2.

Anexo **H** – JMV: 5g de manitol, 0,6g K_2HPO_4 , 1,8g KH_2PO_4 , 0,2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g NaCl, 0,02g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2g agar, 2ml azul de bromotimol, 4ml de FeEDTA, 1ml de vitamina e 2ml solução de micronutrientes, ajustar o pH para 4 a 4,2.

Anexo **I** – Meio batata: 25g agar, 200g batata, 2,5g ácido málico, 2,5g açúcar cristal, 2ml solução de micronutrientes, 1ml solução de vitaminas, ajustar o pH para 6,5 a 7.

Solução de micronutrientes: 0,04g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,4g H_3BO_3 , 1g $Na_2Mo \cdot 2H_2O$, 1,175g $MnSO_4 \cdot H_2O$, completar o volume para 1000ml com água destilada.

Solução de vitaminas: 10mg de biotina, 20mg piridoxol, completar o volume para 100ml com água destilada.

FeEDTA (solução 1,64%): 6,95g $FeSO_4$, 9,33g EDTA, completar o volume para 1000ml com água destilada.