

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Engenharias
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
Mestrado em Ciências Ambientais



Dissertação

**Mecanismos de tolerância ao chumbo e resposta ao estresse oxidativo de
Bacillus pumilus, rizobactéria isolada de *Enydra anagallis***

Luísa Andina Bender

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone Pieniz
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Andreazza

Pelotas, 2024

Luísa Andina Bender

**Mecanismos de tolerância ao chumbo e resposta ao estresse oxidativo de
Bacillus pumilus, rizobactéria isolada de *Enydra anagallis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Engenharias da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Andreazza

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B458m Bender, Luisa Andina

Mecanismos de tolerância ao chumbo e resposta ao estresse oxidativo de *Bacillus pumilus*, rizobactéria isolada de *Enydra anagallis* [recurso eletrônico] / Luisa Andina Bender ; Simone Pieniz, orientadora ; Robson Andreazza, coorientador. — Pelotas, 2024.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Fitorremediação. 2. Metal pesado. 3. Catalase. 4. Glutathione peroxidase. 5. Superóxido dismutase. I. Pieniz, Simone, orient. II. Andreazza, Robson, coorient. III. Título.

CDD 363.7

**Mecanismos de tolerância ao chumbo e resposta ao estresse oxidativo de *Bacillus pumilus*,
rizobactéria isolada de *Enydra anagallis***

por

Luísa Andina Bender

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, PPGCAmb, do
Centro de Engenharias da Universidade Federal de Pelotas, como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do Título de

Mestre em Ciências Ambientais

Banca Examinadora:

Prof. Dr. A – Simone Pieniz (UFPel)

Prof. Dr. B – Robson Andreazza (UFPel)

Prof. Dr. C – Flavio Manoel Rodrigues DA Silva Junior (FURG)

Profa. Dra. E – Pathise Souto OLiveira (Anhanguera)

Prof. Dr. D – Maurício Silveira Quadro (UFPel)

Pelotas, 12 de março de 2024

RESUMO

BENDER, Luísa Andina. **Mecanismos de tolerância ao chumbo e resposta ao estresse oxidativo de *Bacillus pumilus*, rizobactéria isolada de *Enydra anagallis***. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

O chumbo está presente nas mais diversas matrizes ambientais em concentrações traço, porém é um dos metais mais tóxicos e mesmo em baixas concentrações já pode causar problemas. Nas plantas, por exemplo, afeta a germinação, estabilidade, crescimento, absorção de água e nutrientes, além de causar estresse oxidativo. Já em humanos e outras espécies animais, pode acumular nos ossos, afetar o sistema reprodutivo, sistema nervoso, entre outros. Na busca de técnicas que visem a remoção ou atenuação desse metal a níveis não prejudiciais, o conceito de fitorremediação aparece como uma alternativa viável, por ser econômica, não prejudicar o meio ambiente e, ainda, auxiliar na revegetação do local. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a tolerância da rizobactéria *Bacillus pumilus* isolada de *Enydra anagallis* ao chumbo e a resposta ao estresse oxidativo do isolado e da espécie vegetal. A planta foi coletada nas margens da barragem Santa Bárbara (Pelotas, RS). Para o estudo foi isolado e selecionado um micro-organismo, o qual foi identificado molecularmente por meio do 16S DNA como *Bacillus pumilus*. Foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, o estado redox através da reação ao ácido tiobarbitúrico, e o potencial de remoção do metal pela rizobactéria. De acordo com os resultados, *Bacillus pumilus* foi resistente a altas concentrações de chumbo (~200 mg/L) e foi capaz de remover o chumbo do caldo nutriente. Interessantemente, o metal não interferiu na atividade enzimática do isolado, mesmo na maior concentração testada. Foram quantificadas altas concentrações de metal nas raízes, folhas e caules de *Enydra anagallis*, demonstrando ser uma planta bioacumuladora. Da mesma forma, foram quantificadas concentrações significativas de chumbo no solo e na água da barragem Santa Bárbara, valores estes maiores do que os estabelecidos pela legislação. Nas análises de atividade enzimática e de estado redox, a presença do metal parece não interferir no metabolismo de *Bacillus pumilus* e *Enydra anagallis*, indicando que, apesar dos níveis de chumbo encontrados nas matrizes ambientais, a condição do meio em que a planta se encontrava não configurou uma causa de estresse no seu metabolismo, provavelmente, por esta ter desenvolvido algum ou alguns mecanismos de resistência.

Palavras-chave: fitorremediação; biorremediação; metal pesado; catalase; glutathione peroxidase; superóxido dismutase; bioacumulação.

ABSTRACT

BENDER, Luísa Andina. **Mechanisms of lead tolerance and response to oxidative stress in *Bacillus pumilus*, a rhizobacteria isolated from *Enydra anagallis***. 2024. 79 p. Dissertation (Master's in Environmental Sciences). Postgraduate Program in Environmental Sciences – Engineering Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Lead is present in the most diverse environmental matrices in trace concentrations, however it is one of the most toxic metals and even at low concentrations can cause problems. In plants, for example, affects germination, stability, growth, water and nutrients absorption, in addition causes oxidative stress. In humans and other animal species, it can accumulate in bones, affect the reproductive and nervous system, among others. In the search for techniques that aim to remove or attenuate this metal to non-harmful levels, the concept of phytoremediation appears as a viable alternative, as it is economical, does not harm the environment and also helps in the revegetation of the site. Thus, this study aimed to evaluate the tolerance of the rhizobacteria *Bacillus pumilus*, isolated from *Enydra anagallis*, to lead and the response to oxidative stress of the isolate and the plant species. The plant was collected on the banks of the Santa Bárbara dam (Pelotas, RS). For the study, a microorganism was isolated and selected, which was molecularly identified through 16S DNA as *Bacillus pumilus*. The activities of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, the redox state through the reaction to thiobarbituric acid, and the metal removal potential by rhizobacteria were analyzed. According to the results, *Bacillus pumilus* was resistant to high concentrations of lead (~200 mg/L) and was able to remove the metal from the nutrient broth. Interestingly, the metal did not interfere with the enzymatic activity of the isolate, even at the highest concentration tested. High concentrations of metal were quantified in the roots, leaves and stems of *Enydra anagallis*, demonstrating that it is a bioaccumulator plant. Likewise, significant concentrations of lead were quantified in the soil and water of the Santa Bárbara dam, values higher than those established by legislation. In the analyzes of enzymatic activity and redox state, the presence of the metal does not seem to interfere with the metabolism of *Bacillus pumilus* and *Enydra anagallis*, indicating that, despite the levels of lead found in the environmental matrices and the concentrations tested, the condition of the medium in which they grow found did not constitute a cause of stress in their metabolism, probably because they had developed one or some resistance mechanisms.

Key words: phytoremediation; bioremediation; heavy metal; catalase; glutathione peroxidase; superoxide dismutase; bioaccumulation

Lista de Figuras

Figura 1	Ilustração de identificação dos países que não possuem legislação/regulamentação proibindo a produção e venda de tintas com chumbo.....	17
Figura 2	Visualização do mapa da cidade de Pelotas e localização da barragem Santa Bárbara	19
Figura 3	Imagem ilustrativa da espécie vegetal <i>Enydra anagallis</i>	24
Figura 4	Ilustração das reações de produção de espécies reativas ao oxigênio pela mitocôndria	31
Figura 5	Sistema de defesa antioxidante enzimática	32
Figura 6	Árvore filogenética de <i>Bacillus pumilus</i>	45
Figura 7	Efeitos do pH na viabilidade de <i>Bacillus pumilus</i>	46
Figura 8	Efeitos da temperatura na viabilidade de <i>Bacillus pumilus</i>	47
Figura 9	Viabilidade de <i>Bacillus pumilus</i> nas diferentes concentrações de chumbo e tempos de incubação	48
Figura 10	Remoção de chumbo por <i>Bacillus pumilus</i>	50
Figura 11	Quantificação de malonaldeído em <i>Bacillus pumilus</i>	52
Figura 12	Atividade da enzima catalase em <i>Bacillus pumilus</i>	54
Figura 13	Atividade da enzima superóxido dismutase em <i>Bacillus pumilus</i>	55
Figura 14	Quantificação de malonaldeído em <i>Enydra anagallis</i>	56

Figura 15	Quantificação da atividade enzimática de catalase e superóxido dismutase em <i>Enydra anagallis</i>	58
Figura 16	Quantificação de chumbo em <i>Enydra anagallis</i>	60

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resumo dos efeitos do chumbo em humanos e nas plantas.....	15
Tabela 2	Concentração de chumbo encontrada em diferentes matrizes....	18
Tabela 3	Concentrações máximas de chumbo permitidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente e pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo no solo	20
Tabela 4	Concentrações de chumbo encontradas na espécie vegetal <i>Enydra anagallis</i>	61
Tabela 5	Concentração de chumbo encontrada em água.....	61
Tabela 6	Concentrações de chumbo encontradas no solo e sedimento	61

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Objetivos	11
1.1.1 Objetivo geral	11
1.1.2 Objetivos específicos	11
1.2 Hipóteses	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Chumbo	13
2.2 Poluição ambiental por chumbo	17
2.3 Fitorremediação	21
2.3.1 <i>Enydra anagallis</i>	23
2.3.2 Rizosfera e rizobactérias	25
2.4 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Preparação inicial	34
3.2 Coleta da macrófita, isolamento das rizobactérias e purificação das colônias	34
3.3 Seleção do isolado e melhores condições de crescimento	35
3.3.1 Remoção de chumbo pelos isolados	36
3.7 Identificação molecular do isolado	36
3.7.1 Extração do DNA	36
3.7.2 Amplificação do DNA	37
3.8 Determinação de chumbo na água	38
3.9 Determinação de chumbo no solo	38
3.10 Determinação de chumbo na planta	39
3.11 Concentração de carotenoides e clorofila	39
3.12 Avaliação da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo	39
3.12.1 Preparação dos extratos enzimáticos	40
3.12.1.1 Extrato extracelular (bruto) microbiológico	40
3.12.1.2 Extrato intracelular microbiológico	40
3.12.1.3 Extrato vegetal	40
3.12.2 Peroxidação lipídica	41
3.12.3 Determinação de proteínas	41
3.12.4 Enzimas antioxidantes	41

3.12.4.1 Atividade da enzima superóxido dismutase	41
3.12.4.2 Atividade da enzima catalase	42
3.12.4.3 Atividade da enzima glutathione peroxidase	42
3.14 Análises estatísticas	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Seleção e identificação molecular do isolado	44
4.2 Efeitos do pH e da temperatura no crescimento de <i>Bacillus pumilus</i>	46
4.3 Efeitos do chumbo no crescimento de <i>Bacillus pumilus</i>	47
4.4 Remoção de chumbo por <i>Bacillus pumilus</i>	49
4.5 Efeito do chumbo na peroxidação lipídica em <i>Bacillus pumilus</i>	52
4.6 Efeito do chumbo no estresse oxidativo em <i>Bacillus pumilus</i>	53
4.7 Peroxidação lipídica no extrato vegetal de <i>Enydra anagallis</i>	56
4.8 Estresse oxidativo no extrato vegetal de <i>Enydra anagallis</i>	57
4.9 Clorofila e carotenoides em <i>Enydra anagallis</i>	59
4.10 Quantificação de chumbo em <i>Enydra anagallis</i>	60
4.11 Quantificação de chumbo na água e no solo da Barragem Santa Bárbara	61
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A poluição por metais pesados vem recebendo atenção devido a toxicidade e a natureza imutável destes no meio ambiente, sendo que as atividades humanas como a mineração, indústria e agricultura, são algumas das fontes geradoras destes tipos de resíduos. A introdução e o acúmulo de metais no solo podem modificar suas características físico-químicas e perturbar as relações ecológicas, pois causam novas reações e inibem algumas atividades biológicas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos. Do mesmo modo, tendem a ser adsorvidos pela matriz e não são degradados pela microbiota ou por processos químicos, o que os torna persistentes (LIN et al., 2021). Além disso, ocorre a possibilidade da entrada desses metais na cadeia alimentar, por meio da absorção por plantas e seu posterior consumo por animais, o que configura um risco à saúde humana devido a exposição aos metais tóxicos (MADANAN et al., 2021). Essa contaminação é agravada, visto que muitas comunidades sobrevivem da pesca, dos subprodutos oriundos da pesca, da caça e da criação de animais em locais com presença de metais pesados, mais especificamente o metal chumbo (Pb).

Como exemplo de intoxicação animal por Pb, pode-se citar o estudo de caso realizado por Guagnini et al. (2018), os quais investigaram um grupo de bovinos na cidade de Butiá (RS), onde 60 animais foram alocados em local que serviu de treinamento para artilharia militar. Com três semanas no local, os animais começaram a apresentar sintomas clínicos, principalmente neurológicos, como sonolência, descoordenação motora, bruxismo, tremores musculares, cegueira, além de perda de peso e salivação excessiva. Quinze (n=15) bovinos do lote foram afetados, destes oito (n=8) vieram a óbito e dois (n=2) passaram por necropsia. Nestes, as concentrações de Pb encontradas nos rins e fígado foram de 51,7 µg/g e 41 µg/g no animal 1, e 431 µg/g e 39 µg/g no animal 2, respectivamente, sendo detectadas lesões nestes órgãos.

Alguns metais são essenciais para o metabolismo de plantas, de animais e de micro-organismos em quantidades muito pequenas, como o cálcio, zinco, ferro, cobre, dentre outros, porém quando presentes em grandes quantidades no organismo podem se tornar tóxicos. Apesar disso, o Pb não possui função fisiológica específica (MANOJ et al., 2020) e, mesmo em pequenas concentrações, pode causar efeitos tóxicos. Por exemplo, em algumas regiões na China o problema é considerado grave,

pois não há condições que sustentem a atividade agrícola com padrões de qualidade adequados, além de os moradores manifestarem sintomas patológicos após consumirem alimentos contaminados com metais (WAN; LEI; CHEN, 2016). Alguns dos efeitos tóxicos causados pelo Pb são: danos ao cérebro, problemas de reprodução e no sistema nervoso (ZULFIQAR et al., 2019; SHAH e DAVEREY, 2020), acúmulo nos ossos e outros tecidos, danos nos órgãos (rins, fígado, etc.), potencial carcinogênico; e ainda pode ter relação com doenças mentais como o Alzheimer, e pode levar a óbito quando em altas concentrações no organismo vivo (SABOL, 2020). Além dos danos que podem ser causados em animais e em humanos, os metais também podem influenciar a comunidade de micro-organismos do solo de diversas formas, como reduzir a produção de biomassa, diminuir a comunidade bacteriana específica e alterar a estrutura desta (MANOJ et al., 2020).

A barragem Santa Bárbara, local alvo do estudo, é uma das principais fontes de abastecimento de água na cidade de Pelotas (DEMARCO et al., 2020), porém devido às diversas fontes poluidoras já citadas, apresenta-se em condições de degradação, sendo identificados altos níveis de micro e de macronutrientes, além de metais pesados como o Pb, cuja concentração encontrada foi de $0,018 \pm 0,011$ mg/L (DEMARCO et al., 2018). Este valor encontra-se acima do limite estabelecido pela Resolução do CONAMA n.º 357/2005 (0,01 mg/L) para águas de Classe II. Destaca-se que o Pb se encontra na forma solúvel, sendo essa a forma mais facilmente acessível para entrada na cadeia alimentar.

Na busca por técnicas que removam poluentes do meio surge o conceito de fitorremediação, a qual se mostra uma alternativa promissora na redução ou na remoção de poluentes do solo e da água, sem que estes sejam modificados como ocorre com outras técnicas físico-químicas de remediação. A fitorremediação pode ser descrita como um processo de descontaminação mediado por plantas criteriosamente selecionadas e também suas associações com micro-organismos, que são capazes de remediar o meio através da degradação, acumulação e/ou estabilização dos mais diversos contaminantes, além de diminuir a formação de resíduos secundários (PATRA et al., 2020; SHAH e DAVEREY, 2020). É de se destacar que esse processo ocorre de forma natural, pois é inerente ao metabolismo vegetal a absorção de moléculas disponíveis no meio, sendo estas essenciais ou não para o seu ciclo.

Apesar da fitorremediação ainda carecer de estudos adicionais, é uma técnica relativamente acessível economicamente, sustentável e possível de ser aplicada em condições reais de poluição (SHAH e DAVEREY, 2020). Além disso, a presença de espécies vegetais melhora a qualidade do solo como um todo, pois aumenta a quantidade de alguns nutrientes, como nitrogênio e potássio, e de matéria orgânica. Para além das espécies vegetais, a microecologia rizosférica também figura parte de extrema relevância, podendo regular a fitorremediação de diversas formas, tais como: alterando a quantidade de nutrientes disponíveis no solo; diminuindo a toxicidade dos metais; modificando a abundância de micro-organismos benéficos e aumentando o crescimento da planta e a acumulação de metais (LIN et al., 2021).

Como um exemplo da influência dos micro-organismos na fitorremediação, pode-se citar o estudo realizado por Mendoza-Hernández et al. (2019) onde utilizaram a espécie vegetal *Brassica juncea* L. e dois gêneros bacterianos, *Serratia* e *Enterobacter*. Os autores puderam demonstrar que a presença das bactérias favoreceu a absorção e o transporte dos metais na planta, principalmente o Pb, além de um crescimento significativamente maior. Considerando os resultados obtidos, nota-se que as bactérias agiram de formas distintas, como *Serratia* K120 que promoveu a translocação e a acumulação dos metais nas partes aéreas, caracterizando o processo chamado de fitoextração; e a *Enterobacter* MC156 que colonizou internamente as raízes, promovendo assim o processo chamado de fitoestabilização.

A fitorremediação apresenta o potencial de remover ou reduzir contaminantes ambientais sem causar danos adicionais significativos ou gerar subprodutos tóxicos. A realização de pesquisas relacionadas à temática é crucial devido aos efeitos adversos da toxicidade, persistência e bioacumulação do Pb em seres vivos e ecossistemas. Além disso, a presença excessiva de Pb na barragem Santa Bárbara em desacordo com a legislação, e os custos e danos associados às técnicas físico-químicas de remediação, como por exemplo a precipitação química, troca iônica, remoção eletroquímica, ou filtração por membranas torna essencial a realização de novos estudos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância da rizobactéria *B. pumilus* isolada de *Enydra anagallis* ao Pb e a resposta ao estresse oxidativo do isolado e da espécie vegetal.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Quantificar a presença de Pb no solo e na água da barragem Santa Bárbara;
- 2) Quantificar a concentração de Pb nas partes da planta (raízes, folhas e caules);
- 3) Analisar a tolerância da rizobactéria *B. pumilus* frente a diferentes concentrações de Pb (0,01; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/L);
- 4) Analisar os efeitos do pH, da temperatura e do tempo de incubação no crescimento do isolado;
- 5) Analisar a capacidade de remoção de Pb pelo isolado, em condições ótimas de crescimento (pH e temperatura);
- 6) Avaliar o estado redox da espécie vegetal e do isolado por meio da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBA);
- 7) Avaliar as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), na espécie vegetal e no isolado, frente as diferentes concentrações de Pb.

1.2 Hipóteses

- 1) A quantificação de Pb no solo e na água da barragem Santa Bárbara está acima da concentração recomendada pela legislação;
- 2) *Enydra anagallis* tem capacidade de absorção de Pb;
- 3) O isolado rizosférico é tolerante a concentrações ambientalmente significativas de Pb;

4) Existem diferenças no crescimento e na remoção de Pb frente as diferentes condições de incubação (pH, temperatura, tempo e concentração de metal) e *B. pumilus* é capaz de remover quantidade significativa de Pb;

5) O estresse oxidativo provocado pela alta concentração de Pb não compromete o sistema de defesa antioxidante do isolado e da espécie vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Chumbo (Pb)

O Pb é um metal pertencente ao grupo 14 da tabela periódica (SABOL, 2020), apresenta número atômico 82, ou seja, possui 82 prótons e 82 elétrons, e possui peso molecular de 207,2 u. O Pb está presente na superfície da Terra em uma abundância de cerca de 14 mg/kg e nos oceanos com cerca de 3×10^{-5} mg/L (KÜLAHCI, 2020). Apresenta coloração cinza, é maleável, macio, não possui uma boa condutividade elétrica e, é resistente a corrosão. Normalmente, encontra-se combinado a outros elementos na forma de minérios (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020), como galena (PbS), mínio ou zarcão (Pb³O⁴), cerussita (PbCO³) e anglesita (PbSO⁴) (SHAHID, 2017).

São descritos na literatura 49 isótopos de Pb, sendo quatro (n=4) estáveis e também os mais encontrados na natureza: ²⁰⁴Pb (<2%), ²⁰⁶Pb (24%), ²⁰⁷Pb (22%) e ²⁰⁸Pb (52%) (SABOL, 2020). Dentre os isótopos estáveis, apenas o ²⁰⁴Pb é um nuclídeo primordial e não resultado de decadência radioativa, ou seja, existe nessa forma desde antes da formação da Terra. Por outro lado, os outros três isótopos estáveis são resultado de decadência dos seguintes elementos: urânio (U), actínio (Ac) e tório (Th), respectivamente. Alguns isótopos possuem meia-vida bastante longas como o ²⁰²Pb com 53.000 anos e o ²⁰⁵Pb com 15,3 milhões de anos. O isótopo de maior relevância é o ²¹⁰Pb, que faz parte da cadeia de decadência do ²³⁸U, apesar de uma de suas principais fontes antropogênicas ser a queima de carvão, este também ocorre de forma natural (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020). Os diferentes isótopos podem ser distinguidos a partir da sua composição, se são provenientes de fontes naturais ou antropogênicas, isso devido a cada fonte de poluição ter sua composição isotópica particular. Como um exemplo, pode-se citar a combustão que expõe ²⁰⁶Pb e ²⁰⁷Pb, diferente dos expelidos por outras fontes (SABOL, 2020).

Estima-se que aproximadamente 98% do Pb estável encontrado no meio ambiente seja proveniente de fontes antropogênicas (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020). As principais fontes que geram Pb são baterias, produtos metálicos, produção de policloreto de vinila (PVC), outros plásticos e borracha,

aditivos de petróleo, tintas, lixo eletrônico, operações de fundição, usinas termelétricas a carvão e produção de cerâmica (ZULFIQAR et al., 2019; SHAH e DAVEREY, 2020).

Devido a sua acumulação e persistência no ambiente, é considerado como um dos metais mais tóxicos, sendo um microelemento sem função fisiológica conhecida, apesar disso é encontrado em concentrações traço nos mais diversos locais (solo, água, sedimento, animais e plantas) (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020), e é capaz de entrar na cadeia alimentar (SABOL, 2020). Como um exemplo, tem-se o estudo de Santos e Silva (2016), os quais buscaram analisar a presença de Pb em 10 espécies de peixes marinhos comercializados nas cidades de Maceió (Alagoas), Aracaju (Sergipe) e Salvador (Bahia). A maior parte dos resultados encontrados estavam de acordo com o valor máximo permitido pela regulamentação do Ministério da Saúde (0,30 mg/kg), com exceção da espécie de peixe “dourado” comercializada na cidade de Maceió, que apresentava concentrações variando de 0,11 a 0,45 mg/kg.

O Pb é geralmente indisponível para a absorção por espécies vegetais, visto que tende a formar complexos com a matriz do solo. Apesar disso, e mesmo não sendo um elemento necessário fisiologicamente, a absorção ocorre com a fração restante que é biodisponível, por meio das raízes, e por este motivo o Pb pode entrar na cadeia alimentar. Geralmente a entrada na planta ocorre por via apoplástica, ou então, pelos canais de absorção de cálcio (Ca^{2+}). Essa absorção depende de diversas características do solo como o pH, o tamanho das partículas, a composição, a capacidade de troca de cátions (CTC), a presença de outras substâncias, e de características da planta como a estrutura das raízes e da rizosfera, os exsudatos, e as associações micorrízicas. O Pb é então absorvido e acumulado nas raízes, porém há relatos de que haja adsorção nas paredes das raízes com cargas negativas (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020).

Os efeitos da sua toxicidade são diversos, por exemplo, nas espécies vegetais, afeta a germinação, a estabilidade, o crescimento, as relações hídricas, a absorção de nutrientes, a estrutura interna, gera problemas oxidativos, no metabolismo do carbono e na atividade enzimática (ZULFIQAR et al., 2019; SHAH e DAVEREY, 2020). Há relatos de que a presença de 200 mg/kg de Pb na pastagem próxima a rodovias é capaz de levar animais bovinos à óbito (SABOL, 2020).

As rotas de intoxicação humana podem ser pelo consumo de alimentos e de água contaminados, pela inalação de ar ou de poeira contaminados, pela utilização

de utensílios/objetos contaminados, por contato direto com a boca, brinquedos, cosméticos e bijuterias produzidas com quantidade significativa de Pb. A intoxicação apenas pelo contato com a pele não ocorre, já que este não é absorvido (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020), porém pode causar irritações.

O Pb que foi absorvido pelo corpo e não excretado, pode passar pelas seguintes vias e órgãos: sangue, tecidos moles (coração, fígado, músculos, rins, baço, pulmões e cérebro) e tecidos mineralizadores (dentes e ossos) (HOLSTEGE et al., 2013). Este metal pesado interfere nas enzimas das células vermelhas, sendo considerado como um potencial carcinogênico, pode ter relação com doenças mentais, como doença de Alzheimer, e pode levar a óbito quando em altas concentrações (SABOL, 2020). Após a entrada no corpo humano, o metal é transferido para o sangue e assim é transportado por todo o corpo pelo sistema circulatório. A absorção depende do tipo de metal que é ingerido/inalado, se orgânico ou inorgânico e, da sua disponibilidade no trato digestivo (BORIES et al., 2018), visto que a quantidade biodisponível não é igual a quantidade presente no organismo (NATASHA et al., 2020).

Alguns dos efeitos do chumbo em humanos e em espécies vegetais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos efeitos do chumbo em humanos e nas plantas.

Efeitos do chumbo	Ação
Em humanos	Acumulação nos ossos e dentes gerando deformações Problemas no sistema reprodutivo Danos no cérebro de fetos e crianças pequenas Problemas no sistema nervoso Interfere nas proteínas das células vermelhas Potencial carcinogênico Pode ter relação com o desenvolvimento de doenças mentais Problemas em diversos órgãos (rins, fígado, ...) Óbito
Em espécies vegetais	Afeta a germinação Afeta a estabilidade da planta Afeta o crescimento Afeta as relações hídricas Afeta a absorção de nutrientes Afeta a estrutura interna Problemas oxidativos Problemas no metabolismo Altera a atividade enzimática Óbito

Fonte: Adaptado de Zulfiqar et al. (2019); Sabol (2020); Shah e Daverey (2020).

Devido ao uso do Pb em diversas atividades industriais, a exposição e contaminação dos trabalhadores é comum (TONG et al., 2000), podendo resultar em níveis elevados de Pb no sangue (BARBOSA Jr et al., 2005; TUTUARIMA, 2018). Atualmente, há um maior conhecimento sobre os problemas que o metal pode causar e uma maior segurança para os trabalhadores, mas ainda podem acontecer casos de exposição em alguns processos industriais. Não há nível considerado como seguro para a presença de Pb no sangue, concentrações a partir de 5 µg/dL já têm capacidade de causar danos neurológicos (CETESB, 2021). No estudo de Jesus et al. (2018), os autores buscaram investigar os níveis de Pb no sangue de 119 moradores da região Poconé, no Pantanal (MT), afetada por queimadas e extensos ciclos de garimpo, e encontraram valores de $2,82 \pm 1,53$ µg/dL. Os autores ressaltam que apesar da baixa concentração encontrada, é preciso ter atenção e cuidado, visto os efeitos acumulativos do metal.

A absorção de Pb por crianças pode ser de 40-70% do total ingerido/inalado, enquanto essa porcentagem em adultos é de 10-20%. Além disso, crianças retêm até 1/3 do metal absorvido, enquanto adultos retêm 1%. Há alguns fatores que contribuem para o aumento da absorção, como anemia, níveis baixos de ferro, cálcio, zinco e ingestão de alimentos ácidos. A excreção do Pb varia bastante a depender do local onde se acumula no corpo humano, por exemplo, quando está presente apenas na corrente sanguínea é passível de ser excretado em 25 dias, nos tecidos moles em 40 dias e quando se acumula nos ossos pode ser excretado em 25 anos. A maior parte do Pb absorvido pelo corpo se acumula nos ossos (90%) quando em exposição crônica ao metal (OMS, 2008).

A preocupação com o chumbo é tão grande, que anualmente ocorre uma Semana Internacional de Prevenção ao Envenenamento por Chumbo (*International Lead Poisoning Prevention Week – ILPPW*), a qual é uma iniciativa da Aliança Global para Eliminação de Tintas com Chumbo (*Global Alliance to Eliminate Lead Paint, “Lead Paint Alliance”*) e conta com apoio da OMS e do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (*UN Environment Programme*). A campanha possui como objetivo acelerar e incentivar o banimento de tintas com Pb por meio de legislações e regulamentações, além de levar conhecimento quanto aos problemas que o Pb pode causar. A venda e a produção desse tipo de tinta ainda são permitidas em 55% dos países (Figura 1), as quais configuram uma fonte de contaminação e de intoxicação

para trabalhadores e crianças, principalmente (OMS, 2021). O uso de Pb foi reduzido em países desenvolvidos, porém ainda é bastante utilizado em países em desenvolvimento pelas suas propriedades e aplicações. O uso contínuo de Pb se torna um problema ambiental e, da mesma forma, de saúde humana (WANI et al., 2015). Segundo a OMS (2022), cerca de 1 milhão de pessoas são levadas à óbito anualmente por conta de contaminação com Pb.



Figura 1: Ilustração da identificação dos países que não possuem legislação/regulamentação proibindo a produção e venda de tintas com chumbo. Na figura, os países em azul são os que possuem alguma legislação/regulamentação quanto às tintas com chumbo; os países em laranja são os que não possuem e os países em cinza e branco são os que não possuem dados ou os dados são indisponíveis. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2021).

2.2 Poluição ambiental por chumbo

Inicialmente é essencial definir o conceito de poluição. A legislação brasileira por meio da Lei n.º 6.938 de 31 de agosto de 1981, que estabelece a Política Nacional do Meio Ambiente, define poluição como sendo:

Art. 3º [...]

III – [...] a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente:

- a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
- c) afetem desfavoravelmente a biota;
- d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
- e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

A literatura conceitua poluição e contaminação de forma distinta. A contaminação é dita como uma alteração nos níveis normais de um fator, a qual é imperceptível ao olhar e não causa danos ecossistêmicos. Enquanto que pode-se dizer que a poluição ocorre quando os níveis de contaminação são suficientes para causarem danos à saúde humana e ao ecossistema como um todo, sendo perceptível a degradação do local. Desta forma, pode-se inferir que toda poluição é uma contaminação, mas nem toda contaminação é uma poluição.

Devido às variadas fontes poluidoras, há diversos locais que apresentam poluição por Pb (Tabela 2), como exemplos, é possível citar o rio Doce (Mariana, MG), onde foi encontrada a concentração máxima de 0,097 mg/L (CARVALHO et al., 2017). Schmidt (2019) analisou amostras de lodo de estações de tratamento de água (ETA) das cidades de Cachoeirinha, Gravataí e Guaíba (RS) e encontrou valores de 7,94 a 10,3 mg/kg. Boleji et al. (2021) encontraram concentrações entre 0,007 a 0,016 e 0,009 a 0,026 mg/L nas lagoas Paca e Tragadero (Jauja, Peru), respectivamente, e as concentrações encontradas no sedimento das mesmas lagoas foram de 35,56 a 53,96 e 41,52 a 59,52 mg/kg, respectivamente. Ferreira et al. (2021) encontraram concentrações nos sedimentos de três reservatórios sendo os de Billings, Guarapiranga e Rio Grande (São Paulo, SP), de 75,5 mg/kg, 78,8 mg/kg e 46,7 mg/kg, respectivamente. Todos os valores estavam acima do valor estipulado pela Resolução do CONAMA nº 454/2012, que versa sobre sedimentos de corpos de água de Classe I e Classe II, sendo 35 e 91,3 mg/kg, respectivamente.

Tabela 2: Concentração de chumbo encontrada em diferentes matrizes.

Concentração	Local	Matriz	Referência
0,11 a 0,18 mg/L	Santa Bárbara (Pelotas, RS)	Água	Demarco et al. (2018)
0,097 mg/L	Rio Doce, (Mariana, MG)	Água	Carvalho et al. (2017)
7,94 a 10,3 mg/kg	Cachoeirinha, Gravataí e Guaíba (RS)	lodo ETA	Schmidt et al. (2019)
0,007 a 0,016 mg/L	Paca (Jauja, Peru)	Sedimento	Boleji et al. (2021)
0,009 a 0,026 mg/L	Tragadero (Jauja, Peru)		
35,56 a 35,96 mg/kg	Paca (Jauja, Peru)		
41,52 a 59,52 mg/kg	Tragadero (Jauja, Peru)		

75,5 mg/kg	Billings (São Paulo, SP)	Sedimento	Ferreira et al. (2021)
78,8 mg/kg	Guarapiranga (São Paulo, SP)		
46,7 mg/kg	Rio Grande (São Paulo, SP)		

O local alvo do presente estudo será a barragem de Santa Bárbara em Pelotas (RS), a qual foi inaugurada em outubro de 1968, pelo Departamento Nacional de Obras e Saneamento (DNOS). Possui 352 hectares de área inundada e 359 hectares de proteção, com profundidade variando de 3 a 4 metros e um volume de água estimado em 10 bilhões de litros. Foi desenvolvida com os objetivos de evitar inundações na área urbana da cidade de Pelotas e de servir como reserva para o abastecimento público de água potável (SANEP, 2021). Segundo estudo de Demarco et al. (2020), o nível de Pb encontrado na Santa Bárbara foi de $0,18 \pm 0,11$ mg/L. Os autores sugerem que esse valor pode estar relacionado com a deposição das partículas atmosféricas contaminadas pela emissão de veículos que circulam nas proximidades, devido a localização do corpo hídrico, o qual possui uma rodovia federal, a BR 116, que a transpassa, como pode ser visualizado na Figura 2.

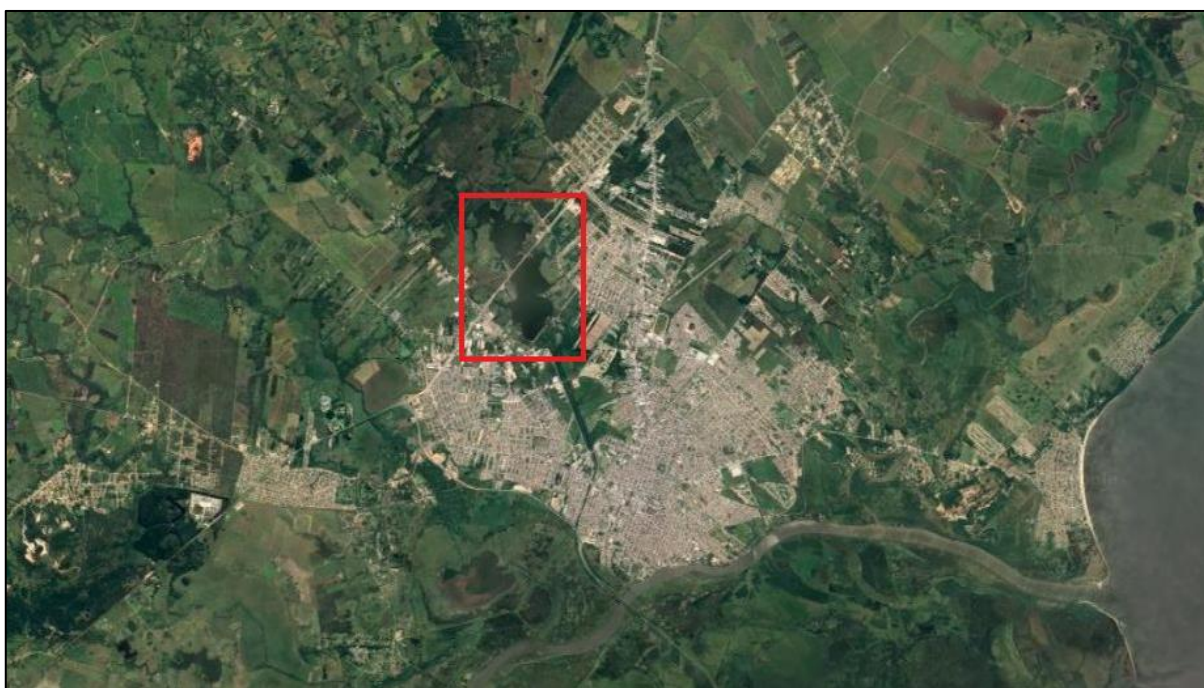


Figura 2: Visualização do mapa da cidade de Pelotas e localização da barragem Santa Bárbara, destacada em vermelho.
Fonte: Google Maps (2022).

No que tange as regulamentações e legislações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2011) estabeleceu uma diretriz provisória que prevê a presença de 10

µg/L (0,01 mg/L) de Pb em águas de consumo humano, alegando a dificuldade de se obter valores abaixo do citado. Segundo a Resolução do CONAMA n.º 357/2005, os limites máximos de Pb em águas de consumo humano são de 0,01 mg/L em águas de Classe II e 0,033 mg/L em águas de Classe III. As águas de Classe II possuem como uma de suas finalidades a proteção das comunidades aquáticas (Artigo 4º, Inciso III, Alínea b), enquanto as águas de Classe III não abrangem esse ponto. Devido a isto, será considerado o limite de 0,01 mg/L neste estudo. Ainda, o CONAMA por meio da Resolução n.º 420/2009 e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) por meio da Decisão de Diretoria (DD) n.º 256/2016/E, estabeleceram valores máximos para a presença de Pb no solo, como indicado na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações máximas de chumbo no solo permitidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente e pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo no solo.

Concentração (mg/kg)*	Aplicação	Referência
72	Valor de prevenção	Resolução CONAMA n.º 420/2009
180	VI** cenário agrícola-APMax***	
300	VI cenário residencial	
900	VI cenário industrial	
72	Valor de prevenção	Decisão de Diretoria CETESB DD n.º 256/2016/E
150	VI cenário agrícola	
240	VI cenário residencial	
4400	VI cenário industrial	
17	VRQ****	

*Todas as concentrações são referentes ao peso da matéria seca; **VI = valor de investigação (CONAMA) / Valor de intervenção (CETESB); ***APMax = Área de proteção máxima; ****VRQ = valor de referência de qualidade.

2.3 Fitorremediação

Devido ao exposto quanto ao cenário de poluição por metais pesados em diversos ambientes, se torna necessária a remediação desses locais, com a remoção total ou parcial dos poluentes. Já existem diversas técnicas físico-químicas de remoção como a adsorção, a vitrificação, a separação por membrana, a imobilização, a encapsulação, a troca de íons e a cloração (GIROLKAR et al., 2021). Porém, estas técnicas são demasiadas caras e agressivas ao meio ambiente, e por vezes, deixam subprodutos tóxicos como resíduos.

As novas propostas de remediação focam em tecnologias integradas e têm recebido atenção dos pesquisadores devido a sua eficácia na remoção de

contaminantes sem causar danos ao meio ambiente ou com danos mínimos e sem a geração de subprodutos tóxicos (GIROLKAR et al., 2021). A fitorremediação é um processo de descontaminação mediado por plantas criteriosamente selecionadas, que inclui macrófitas, gramíneas, arbustos e árvores e, também, suas associações a micro-organismos, os quais são capazes de remediar o meio através da degradação, da acumulação e/ou da estabilização dos mais diversos contaminantes. É considerada como uma “tecnologia verde” com potencial de remover contaminantes do meio (água, solo e ar) e de reduzir a formação de resíduos secundários (PATRA et al., 2020; SHAH e DAVEREY, 2020). A fitorremediação apresenta um antigo conceito de “utilizar a natureza (plantas) para limpar a natureza (solo e água)”, que pode ser definida como processos em que a planta absorve, acumula ou inativa contaminantes ou poluentes do substrato por meio de processos físicos, químicos ou biológicos (SAXENA et al., 1999).

A fitorremediação, assim como outras técnicas de biorremediação, apresentam diversos benefícios: 1) surgem com melhor custo-benefício, 2) não são invasivas, 3) agregam um valor estético ao local contaminado, 4) servem de suporte para polinizadores, 5) não agredem o meio ambiente como outras técnicas de remediação físico-químicas, 6) não alteram o pH do solo de maneira significativa, 7) a presença do vegetal aumenta a quantidade de alguns nutrientes no solo, como o nitrogênio, o potássio, e de matéria orgânica, 8) algumas espécies possuem potencial para uso econômico, 9) aumento da aeração do solo, 10) reduz a erosão, 11) estimula a microfauna rizosférica e flora ao redor, contribuindo na manutenção de um ecossistema mais saudável (SAXENA et al., 1999), além disso os benefícios da aplicação dessa técnica podem compensar os gastos do projeto em até 7 anos (WAN; LEI; CHEN, 2016).

Apesar dos diversos pontos positivos, há alguns fatores que podem limitar a fitorremediação como: 1) a demora no crescimento das plantas, 2) pouca produção de biomassa e 3) sensibilidade ao metal pesado que irá ser remediado. Entretanto, essas situações podem ser contornadas utilizando-se micro-organismos rizosféricos. Estes podem estimular o crescimento vegetal e a absorção de metais por meio da produção e da secreção de agentes quelantes, de processos de acidificação e de mudanças no estado redox (MANOJ et al., 2020). Os micro-organismos serão melhor abordados no tópico 2.3.2.

Para a aplicação da fitorremediação em solos contaminados com metais pesados é necessário considerar diversos fatores como: as características do solo, a atividade enzimática e a comunidade microbiana associada e, a relação de uma com a outra (LIN et al., 2021), visto que, de acordo com estudos, a atividade microbiana se mostra de extrema importância tanto para o crescimento vegetal quanto para a qualidade do solo e, conseqüentemente, promovendo melhoria na remoção dos metais (SHAH e DAVEREY, 2020), além de reduzir o estresse oxidativo causado pela presença dos metais (LIN et al., 2021). Assim, é de suma importância a seleção adequada tanto da espécie vegetal como das espécies de micro-organismos, as quais podem influenciar positivamente na fitorremediação (LIN et al., 2021; SHAH e DAVEREY, 2020).

A fitorremediação envolve diversos processos, que podem ocorrer isoladamente ou um após o outro, como a fitoextração, a fitoacumulação, a fitovolatilização e a fitoestabilização (SHAH e DAVEREY, 2020). Quanto à nomenclatura dos processos, há divergências entre os autores, porém Saxena et al. (1999) definem os processos da seguinte maneira: a) fitoextração: a planta hiperacumula contaminantes e/ou nutrientes nos seus tecidos, e após é possível que seja feita a poda ou colheita da parte aérea vegetal para retirada dessa biomassa contaminada do ambiente; b) rizofiltração (ou fitoacumulação): a planta acumula nas raízes os contaminantes e/ou nutrientes; c) fitoestabilização: os exsudatos da planta imobilizam os contaminantes na matriz do solo, tornando-os bioindisponíveis; d) fitovolatilização: a planta absorve os contaminantes e/ou nutrientes, transporta até a parte aérea onde ocorre a volatilização da substância e, e) fitodegradação/fitoestimulação: onde ocorre a associação com micro-organismos e a degradação dos complexos organometálicos.

Diversas espécies vêm sendo testadas na remoção de metais do solo e de soluções aquosas, como *Helianthus annuus* L. e *Sesamum indicum* L. (ZHOU et al., 2020), *Tagetes erecta* L. (MADANAN et al., 2021), *Pontederia cordata* (XIN et al., 2020), *Trifolium repens* L. (LIN et al., 2021), e tantas outras. Além das espécies vegetais citadas, ainda há a presença de inúmeros grupos de micro-organismos (fungos e bactérias) que agem em conjunto na fitorremediação.

Como um exemplo de aplicação prática pode-se citar o estudo de Wan, Lei e Chen (2016) que implantaram um projeto de fitorremediação de grande escala em

condições reais de contaminação durante dois anos, com análises anteriores à técnica e após a sua implementação. As espécies utilizadas foram a *Pteris vittata*, que acumula arsênio (As) e Pb, e a *Sedum alfredii* Hance, acumuladora de cádmio (Cd). As concentrações de As, Cd e prata (Ag) reduziram de forma significativa após dois anos de estudo, níveis estes abaixo dos parâmetros nacionais preconizados na China. O solo havia recuperado sua capacidade de utilização na agricultura de forma saudável e sua função ecológica também foi restaurada, não mais afetando a saúde dos habitantes locais.

2.3.1 *Enydra anagallis* Gardner

Devido à escassez de informações quanto a espécie alvo do estudo, *E. anagallis*, é que se ampliará também ao gênero a revisão a seguir.

A espécie *E. anagallis* (Figura 3) é uma espécie encontrada na América do Sul, mais especificamente no sul do Brasil, no Uruguai, no Paraguai e no nordeste da Argentina, o gênero conta com aproximadamente 10 espécies pertencentes à família Asteraceae. É uma planta perene que pode criar densas coberturas em áreas inundadas (COSTA et al., 2005).

A espécie ocorre naturalmente em várias regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, incluindo Encosta Inferior do Nordeste, Litoral, Depressão Central, Encosta do Sudeste e Campanha. É encontrada em habitats como planícies úmidas, banhados, córregos e canais. Além disso, a espécie é nativa tanto no Rio Grande do Sul quanto em Santa Catarina (FLORA DIGITAL, 2023).



Figura 3: Imagem ilustrativa da espécie vegetal *Enydra anagallis*.
Fonte: Autora, 2022.

Há autores que colocam as espécies vegetais *E. anagallis* e *E. fluctuans* como sendo a mesma (ALI et al., 2013). Essa possível relação pode ser em consequência de as plantas serem muito parecidas e gerarem dúvidas na identificação, ou, de fato, serem a mesma espécie, o que necessita de estudos genômicos para que haja confirmação da hipótese. *E. fluctuans* é uma planta herbácea semi-aquática flutuante ou rasteira, amplamente distribuída na África, no sul e sudeste da Ásia e da Austrália, onde é consumida como alimento e como planta medicinal (PARVEN; DE; GUPTA, 2021).

É de se destacar que a espécie *E. anagallis* ocorre apenas em corpos hídricos com excesso de nutrientes, como os encontrados na barragem Santa Bárbara (Pelotas, RS): cálcio ($78,1 \pm 7,1$ mg/L), ferro ($23,1 \pm 0,8$ mg/L), potássio ($20 \pm 1,1$ mg/L), magnésio ($23,5 \pm 3,6$ mg/L), manganês ($0,6 \pm 0,0$ mg/L), nitrogênio ($10,4 \pm 1,9$ mg/L), fósforo ($1 \pm 0,3$ mg/L) e zinco ($1,7 \pm 0,1$ mg/L) (DEMARCO et al., 2020).

Em estudo com a espécie *E. fluctuans*, a acumulação de Pb ocorreu principalmente nas raízes (97,1 – 99,1%) em 96 h de tratamento. De acordo com os valores dos Fatores de Bioconcentração e de Translocação, essa espécie não foi considerada como hiperacumuladora de Pb. As concentrações utilizadas para os ensaios foram de: 11,5, 20,1, 35,7 e 50,2 mg/L. Na maior concentração (50,2 mg/L) a

acumulação nas raízes foi de até $1093,60 \pm 4,08 \mu\text{g/g}$ de massa seca com uma exposição de 96 h, enquanto que com a exposição em 3 h na mesma concentração, a acumulação foi de até $587,72 \pm 3,09 \mu\text{g/g}$ de massa seca. Devido a sua larga distribuição geográfica e com base nos resultados obtidos, os autores consideraram a espécie como uma candidata a utilização para fitorremediação, além de biomonitoramento de metais em ambientes aquáticos. A espécie mostrou-se capaz de sobreviver em altas concentrações de Pb ($50,2 \text{ mg/L}$), além de acumular grandes quantidades nas raízes (PARVEN; DE; GUPTA, 2021).

No estudo de Demarco et al. (2020) foi quantificado um total de $25,8 \text{ mg/kg}$ de Pb na massa seca de *E. anagallis*. Ainda, foram calculados os Fatores de Bioacumulação e de Translocação, sendo 114 ± 26 e $0,3 \pm 0,04$, respectivamente, demonstrando a capacidade da espécie em acumular contaminantes nas suas raízes, processo denominado de rizofiltração. Já no estudo de Pitelli et al. (2018) com a espécie *E. sessilis*, foram encontradas variações nas concentrações entre plantas marginais, flutuantes e submersas, além de variações sazonais. A concentração máxima encontrada foi de $17,7 \text{ mg/kg}$ e a mínima de $13,7 \text{ mg/kg}$, com uma média de $15,9 \text{ mg/kg}$. Os espécimes foram coletados no reservatório Santana, em Piraí, Rio de Janeiro, Brasil.

No estudo de Jha et al. (2016), os autores avaliaram 11 pontos para a presença de Pb na água e no sedimento, sendo que a espécie *E. fluctuans* aparece apenas no ponto 10, que apresenta uma concentração de Pb na água de $0,013 \pm 0,002 \text{ mg/L}$ e no sedimento de $28,85 \text{ mg/kg}$. Além disso, avaliaram a concentração de Pb na planta, encontrando o valor de $84,7 \text{ mg/kg}$ somadas as partes aérea e radicular. A espécie apresentou um alto Fator de Bioacumulação nas raízes (2,05), demonstrando o processo de rizofiltração/rizoacumulação.

2.3.2 Rizosfera e rizobactérias

Rizosfera é definida como a porção de solo adjacente às raízes das plantas e que sofre influência físico-química da atividade radicular. É um microssistema bastante dinâmico que engloba as interações entre o sistema radicular vegetal, micro-organismos e solo.

Há diferenças entre os micro-organismos habitantes da região rizosférica e os habitantes do restante do solo. Essa diferença é resultado das interações entre as plantas, as rizobactérias e os fatores bióticos e os abióticos, como os exsudatos radiculares, a presença e a competição de nutrientes no solo, o pH e a temperatura (ALVES et al., 2021). Os exsudatos radiculares são relevantes para os micro-organismos rizosféricos, pois são uma fonte de carbono e energia, estimulando a atividade microbiana, controlando a sua diversidade e o crescimento (BOWEN e ROVIRA, 1999). O solo rizosférico, quando comparado ao restante do solo, é mais rico em nutrientes, além de ser um depósito de carbono (HINSINGER et al., 2006).

Estimativas sugerem que haja na rizosfera uma quantidade de micro-organismos aproximada de 10^{11} células por grama de solo, de diversas espécies, englobando os grupos *Bacteria*, *Fungi* e *Archea* (MENDES et al., 2013). O carbono depositado no solo é acumulado através de rizodeposição, a qual pode ocorrer das seguintes formas: secreção, difusões, lises, gases e mucilagem (NGUYEN, 2003). Os rizodepósitos, além de servirem de armazenamento de nutrientes, são determinantes para a estrutura dos micro-organismos, visto que cada composição de secreção pode alterar a diversidade destes (CHAPARRO et al., 2012).

As plantas secretam vitaminas, hormônios, toxinas e compostos antagônicos que agem selecionando os micro-organismos, favorecendo os que são benéficos para as plantas. De um lado, as plantas promovem um ambiente propício para o crescimento microbiano, do outro lado os micro-organismos melhoram a absorção de nutrientes, aliviam o estresse oxidativo causado por fatores abióticos, e ainda podem proteger a planta contra agentes patogênicos (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; RASHID et al., 2016). Os micro-organismos rizosféricos possuem importante papel na fitorremediação e na fitomineração, tendo potencial para serem usados como inoculantes para aumentar a eficiência dessas técnicas (ALVES et al., 2021).

As “rizobactérias promotoras de crescimento vegetal” (*plant growth promoting rhizobacteria* – PGPR), são as bactérias capazes de colonizar as raízes das plantas e capazes de sobreviver, se multiplicar, se adaptar e de competir com outros micro-organismos, enquanto promovem o crescimento vegetal, por meio de diversas formas como: produção de substâncias ou metabólitos como fitormônios, sideróforos e amônia, além da solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e da mineralização de compostos orgânicos. Esses compostos são capazes de alterar a natureza

(acidificação e oxidação) e mobilidade (quelção, precipitação e imobilização) dos metais no ambiente rizosférico, aumentando assim, a eficiência da fitorremediação e reduzindo o estresse (ALVES et al., 2021; MANOJ et al., 2020; PAREDES-PÁLIZ et al., 2018). A remediação de solos utilizando plantas e micro-organismos associados é considerada a técnica ideal e mais segura (GIROLKAR et al., 2021; MANOJ et al., 2020).

As PGPR possuem diversos mecanismos de ação, como os específicos que agem por meio da facilitação da disponibilidade dos nutrientes no solo, estimulação do crescimento radicular, divisão e alongamento celular e, estabilidade metabólica. Além desses, existem mecanismos não-específicos, os quais não estão diretamente envolvidos no crescimento vegetal, porém essas substâncias produzidas reduzem o estresse causado por fatores bióticos ou abióticos, por meio da supressão da toxicidade dos metais, melhorando o sistema de resistência (MANOJ et al., 2020).

As rizobactérias podem ser classificadas de acordo com as suas funções, sendo estas: fitoestimuladoras, quando produzem fitormônios; biopesticidas, quando produzem e secretam substâncias capazes de controlar pragas e doenças; biofertilizantes, quando aumentam a disponibilidade de nutrientes no solo; ou rizorremediadoras, quando são capazes de solubilizar e adsorver os metais (MANOJ et al., 2020).

Em estudo de Paredes-Páliz et al. (2018), onde foram investigados os efeitos das rizobactérias na espécie vegetal *Spartina densiflora* com presença de metais, foi observado o aumento da expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), porém, a CAT em menor quantidade. Foi avaliada também a reação ao ácido tiobarbitúrico (TBA), onde seu aumento em 30% indicava a ocorrência de dano nas membranas. Com esses resultados, foi possível concluir que as rizobactérias auxiliaram, de fato, na redução do estresse causado pelos metais, além de que o Índice de Estresse Oxidativo (IEO) reduziu de 50 a 75% nas plantas inoculadas com as bactérias. No estudo em questão, o IEO nas espécies vegetais sem inóculo bacteriano foi quase duas vezes maior do que os controles. Ainda, a inoculação das rizobactérias levou à redução da atividade de todas as enzimas que eliminam moléculas reativas ao oxigênio, que causam o estresse oxidativo, porém, o grau dessa redução depende da enzima ou da espécie inoculada. Os gêneros

Pantoea e *Bacillus* tiveram um melhor resultado, em comparação com a aplicação de consórcio bacteriano.

Jiang et al. (2017) isolaram seis (n=6) estirpes bacterianas da rizosfera de *Bohemeria nivea*, espécie vegetal conhecida como rami, coletadas ao redor de uma refinaria. Foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* (estirpe 1), *Cupriavidus* (estirpe 2), *Bacillus* (estirpes 11 e 15) e *Acinetobacter* (estirpes 10 e 18). Nos testes de tolerância ao Pb, as estirpes 2, 11 e 15 foram capazes de crescer até a concentração de 1.600 mg/L, a estirpe 1 até a concentração de 1.500 e as estirpes 10 e 18 até a concentração de 1.400 mg/L.

2.4 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre de forma natural e constante nos seres vivos, pois é decorrente da respiração celular, sendo a mitocôndria sua principal fonte, porém, ocorre também nas membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA et al., 2010). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a quantidade eliminada por processos enzimáticos e não enzimáticos, causando efeitos deletérios. As ERO agem como mediadoras na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas que ocorrem nos processos metabólicos, possibilitando, por exemplo, a geração de adenosina trifosfato (ATP), a ativação de genes e, participam da defesa nos processos infecciosos. Porém, a produção excessiva de ERO pode causar danos (SHAMI e MOREIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997), levando à oxidação de biomoléculas, à perda de suas funções ou ao desequilíbrio homeostático, o que resulta em dano oxidativo em células e tecidos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Essa contínua geração de ERO levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, os quais tem como objetivo limitar a presença dessas espécies dentro da célula, evitando assim os danos (SHAMI e MOREIRA, 2004; BIANCHI e ANTUNES, 1999). O sistema antioxidante tem por função inibir ou reduzir os danos causados pelas ERO, sendo dividido em enzimático e não-enzimático (BARBOSA et al., 2010). Entre os não-enzimáticas, destaca-se a presença de compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides. Nesse estudo daremos atenção apenas ao sistema antioxidante enzimático das enzimas: SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx).

Na mitocôndria, o oxigênio (O_2) passa por redução tetravalente, ou seja, recebe quatro elétrons, formando água. A enzima catalizadora desse processo é chamada de citocromo oxidase. Ao final da cadeia transportadora de elétrons, a citocromo oxidase, oxida quatro moléculas de citocromo c, ou seja, remove um elétron de cada molécula, e adiciona-os na molécula de oxigênio para que haja a formação de uma molécula de água. A ação da enzima citocromo oxidase controla a produção de ERO, impedindo a geração excessiva, porém, de 2 a 5% do oxigênio é desviado para outra via metabólica, onde são reduzidos univalentemente e, assim, originam ERO (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; KOURY e DONANGELO, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Essa redução univalente produz os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As reduções são catalisadas por enzimas e há a participação dos íons de ferro e de cobre.

Uma questão a ser observada é que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, pois não possui um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, porém apresenta alto potencial reativo. Este participa da reação que produz hidroxila (OH), a qual pode causar danos em qualquer estrutura celular. O H_2O_2 possui vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares, sendo potencialmente tóxico para as células e, ainda, essa toxicidade pode ser aumentada quando há presença de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Os íons de ferro e de cobre são significativos nas reações de oxidação-redução, servindo como catalisadores nas reações que produzem ERO. Duas reações são bastante importantes: 1) Fenton: que produz o radical OH por meio de reações com o H_2O_2 e os íons de ferro e cobre; e 2) Haber-Weiss: que produz OH por meio das reações entre H_2O_2 e O_2 (KOURY e DONANGELO, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Quando esses íons se encontram ligados às proteínas transferrina, ferritina e ceruloplasmina, a geração de ERO é reduzida (KOURY e DONANGELO, 2003; WELCH et al., 2002).

Outra fonte de geração de ERO são os ácidos graxos poli-insaturados que estão presentes nas membranas plasmáticas das células, os quais produzem alcoxila (LO) e peroxila (LO_2), por meio da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é constituída pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O radical OH é considerado o iniciador do processo, pois retira um átomo de hidrogênio (H) dos ácidos graxos da membrana celular, tendo um papel

relevante na peroxidação lipídica (WELCH et al., 2002). O íon de ferro também é essencial, facilitando a iniciação do processo, pois agem como catalisadores na conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) nos radicais LO e LO₂, os quais são potencialmente reativos e podem iniciar novas cadeias de reações (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As enzimas NADPH oxidases (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases*) são outra importante fonte geradora de ERO. São proteínas presentes na membrana celular com função de transportar elétrons pela membrana, produzindo, geralmente, o radical O₂ (BERNARD e KRAUSE, 2007).

O sistema de defesa antioxidante, como citado anteriormente, tem por função inibir e/ou reduzir os danos causados pela formação e ação de ERO. Essa defesa pode ser feita das seguintes formas: impedindo a formação de ERO, chamado de sistema de prevenção; impedindo a ação de ERO, chamado de sistema varredouro; ou, estimulando o reparo e a reconstituição das estruturas que foram lesadas, chamado de sistema de reparo (KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000).

O sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas CAT, SOD e GPx, as quais agem por meio do mecanismo de prevenção. As enzimas CAT e GPx possuem o mesmo objetivo de impedir o acúmulo de H₂O₂. Essa ação é de extrema importância, pois a ERO gera o radical OH, o qual não possui defesa no sistema enzimático (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). A enzima CAT catalisa a conversão de H₂O₂ em O₂ e H₂O; a enzima SOD catalisa a conversão do radical O₂ em H₂O₂; e a enzima GPx catalisa a redução do H₂O₂ em H₂O (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

Na Figura 4 é possível observar as reações de produção de ERO pela mitocôndria. Na equação 1, está demonstrada a redução tetravalente do oxigênio (O₂), onde este recebe quatro elétrons (e⁻) e quatro íons de hidrogênio (H⁺), formando duas moléculas de água (H₂O) e liberando energia; na segunda equação, observa-se a formação do radical superóxido (O₂⁻) que ocorre através da adição de um elétron a uma molécula de oxigênio; na terceira equação, está ilustrado o processo chamado de dismutação, onde o radical superóxido recebe dois íons de H e forma o H₂O₂, sendo a reação catalisada pela enzima SOD, a qual acelera a reação em 10⁴ vezes; na quarta equação, demonstra-se a Reação de Fenton, onde o H₂O₂ reage com íons de

ferro ou cobre gerando o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$); na quinta equação, encontra-se a Reação de Haber-Weiss, onde os íons de ferro ou cobre podem catalisar a reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2\cdot$ gerando o radical $\text{OH}\cdot$; e na sexta e última equação, o radical $\text{O}_2\cdot$ pode reagir com o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e gerar peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

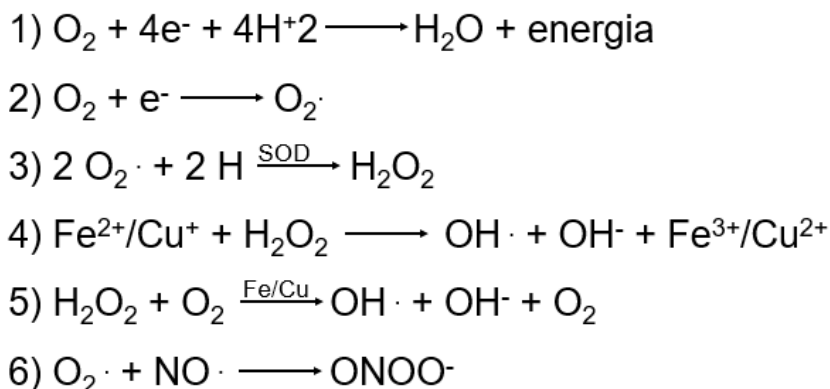


Figura 4: Ilustração das reações de produção de espécies reativas ao oxigênio pela mitocôndria.

O radical $\text{OH}\cdot$ é considerado com o maior potencial reativo, bastante instável e o mais provável de causar danos oxidativos, além de ser o iniciador no processo de peroxidação lipídica, alterando as funções biológicas da membrana, agindo sob as proteínas, alterando sua estrutura, e podendo acarretar danos no DNA gerando mutações (WELCH et al., 2002). Devido ao potencial do radical $\text{OH}\cdot$ e a falta de defesa antioxidante enzimática para agir sobre ele, é relevante a manutenção na presença das enzimas, para que seja mantida a integridade celular. Assim, a enzima GPx necessita de maior atenção, uma vez que sua ação depende do ciclo redox da glutathione, na relação entre a glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001).

Na Figura 5 é possível observar um esquema do sistema de defesa antioxidante, onde a enzima SOD catalisa a geração de H_2O_2 a partir do radical $\text{O}_2\cdot$ e as enzimas CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 . O acúmulo de H_2O_2 possibilita a geração do radical $\text{OH}\cdot$, através das reações de Fenton e Haber-Weiss. A enzima GPx, por sua vez, reduz o H_2O_2 à água, porém converte a enzima GSH em GSSG. A GSSG possui função antioxidante devido a sua ligação dissulfeto.

É relevante a manutenção da glutathione redutase (GRd), pois essa recupera a GSH, possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathione e, conseqüentemente, do equilíbrio entre os sistemas de defesa (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001).

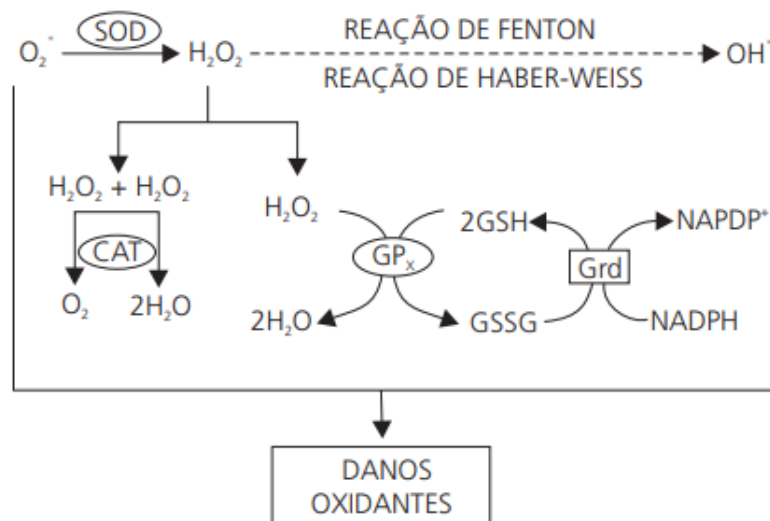


Figura 5: Sistema de defesa antioxidante enzimática.
Fonte: ROVER; HOEHR; VELLASCO (2001).

A enzima SOD pode ser encontrada nos sistemas biológicos de duas formas: 1) no citoplasma, onde é dependente do cobre ou zinco (SOD-Cu/Zn); e 2) na mitocôndria, onde precisa do cofator manganês (SOD-Mn). A enzima GPx também se apresenta de duas formas: dependente ou independente de selênio, podendo estar presente no citoplasma ou na mitocôndria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

Quando o estresse oxidativo ocorre, ou seja, a produção de ERO supera a ação do sistema antioxidante, causando efeitos deletérios, são gerados marcadores de estresse oxidativo, os quais são metabólitos específicos fontes da peroxidação lipídica, de proteínas e do ácido desoxirribonucléico (DNA) e que podem ser identificados e quantificados (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; VINCENT; INNES; VINCENT, 2007; MAYNE, 2003). Alguns exemplos de metabólitos que servem como marcadores são o malonaldeído (MDA) (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; MAYNE, 2003) e o TBA (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007), ambos derivados da oxidação de lipídios.

Em estudo com *Cichorium intybus* L., Malik et al. (2021) investigaram os efeitos do metal chumbo no crescimento da planta, a taxa de absorção e translocação do metal para a parte aérea e a atividade enzimática do sistema antioxidante. O Pb causou uma redução no crescimento radicular e na parte aérea, com reduções máximas na concentração de 300 μ M. Houve um maior acúmulo de Pb nas raízes do que na parte aérea, chegando a ~40 mg/g na concentração de 300 μ M. Quanto a concentração de MDA, foi maior na presença de Pb, na concentração de 300 μ M, alcançando a ~4 nmol/g. Quanto a atividade enzimática, houve aumentos de todas as enzimas analisadas (SOD, CAT e GPx), com as atividades máximas alcançadas também na concentração de 300 μ M.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação inicial

Anterior ao início dos experimentos, vidraria e demais materiais utilizados nas análises (ponteiras, béquer, tubos Eppendorf, Falcon e de ensaio, placas de petri, etc) passaram por lavagem, esterilização em autoclave (121 °C / 15 minutos), secagem e armazenamento. Após o uso e contato com Pb, os materiais foram lavados com água corrente e sabão neutro, deixados de molho em ácido nítrico (HNO₃) 1:1 por 24 horas, e após enxaguados em água corrente e água destilada. Os meios de cultura utilizados foram: caldo nutriente (*Nutrient Broth*) da marca Kasvi, composto por peptona de gelatina (5 g/L) e extrato de carne (3 g/L); e ágar nutriente, sendo ágar-ágar misturado com o caldo nutriente citado anteriormente. Ambos os meios de cultura seguiram as recomendações de preparo e de esterilização do fabricante.

Além do preparo dos materiais, todos os cuidados foram tomados para que se evitasse o contato direto da pele com o Pb, com o uso de equipamentos de proteção individuais (EPI).

Para o preparo da solução estoque de 1000 mg/L⁻¹ de Pb foi utilizado o reagente de nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂), o qual possui peso molecular de 331,2 g/mol, da marca Dinâmica. Para isso, foi pesado 1,599 g do reagente e completado até o volume de 1 L com água destilada, após o pH foi ajustado para 7,0 com os tampões de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M ou ácido clorídrico (HCl) 1 M.

3.2 Coleta da macrófita, isolamento das rizobactérias e purificação das colônias

Para os testes foram usados micro-organismos previamente isolados da rizosfera da macrófita *Enydra anagallis*. O isolamento foi feito conforme as metodologias adaptadas de Freitas (1994) e Costa et al. (2017), descrito a seguir.

As plantas foram coletadas nas margens da barragem Santa Bárbara na cidade de Pelotas, acondicionadas em sacos vedados estéreis e levadas até o Laboratório de Química Ambiental da Universidade Federal de Pelotas (LQA, UFPEL), onde foram lavadas levemente com água destilada. A raiz, após lavagem, foi colocada em solução

salina estéril (NaCl 0,85%), na proporção de 100 mL de solução para 1 g de raiz, e colocada em agitador magnético por 30 minutos. Após esta etapa (diluição 10^0), procedeu-se as demais diluições até 10^{-5} , como descrito a seguir: em tubos eppendorf foram colocadas 100 μ L de amostra e 900 μ L de solução salina estéril. Antes de cada nova diluição, os tubos passaram por agitação em vórtex. As diluições (10^{-1} até 10^{-5}) foram semeadas em duplicata por *spread plate* em meio de cultura ágar nutriente, da seguinte maneira: foram retiradas 100 μ L de cada diluição e colocadas em placas de petri contendo ágar nutriente, espalhando com alça de Drigalski. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. As diluições foram feitas dentro da câmara de fluxo vertical laminar, para que se evitassem contaminações.

Após o crescimento, foi feita a purificação das colônias. Com o auxílio de uma lupa, as colônias foram observadas considerando suas características morfológicas distintas, como cor, brilho, forma da borda e consistência. As diferentes colônias foram transferidas para novas placas de petri contendo ágar nutriente. Para se obter culturas puras foi utilizada a técnica de esgotamento por estria. Essa etapa também foi feita na câmara de fluxo vertical laminar. Após, as placas foram incubadas por 24 horas a 30 °C.

Para a preservação dos isolados, os micro-organismos foram mantidos sob refrigeração e repicados quinzenalmente, em meio ágar nutriente suplementado com 50 mg/L de Pb, além de serem congelados em glicerol.

3.3 Seleção do isolado e melhores condições de crescimento

Para a seleção do isolado em estudo com maior potencial de crescimento na presença de Pb, foi feito um experimento para avaliar a tolerância ao metal, da seguinte forma: foi adicionado 10 mL de caldo nutriente (pH 7,0) suplementado com diferentes concentrações de Pb, sendo 0; 0,01; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/L⁻¹. Após a inoculação, que foi feita em triplicata, mais o controle negativo (caldo nutriente com as diferentes concentrações sem a inoculação do micro-organismo), foram incubados em condições padrões: temperatura de 30 °C, por 24 horas.

Após 24 horas de crescimento, alíquotas de 1 mL das amostras com micro-organismos foram transferidas para microtubos eppendorf estéreis, centrifugadas à 5.000 rpm por 15 minutos, separando o sobrenadante da biomassa, para que fosse

feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), a qual possibilita conhecer a concentração de bactérias por mL dos inóculos preparados.

Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em solução salina estéril (0,85%) e diluído até 10^{-5} . A partir de cada diluição, foram retirados 100 μ L e depositados em placas de petri com ágar nutriente suplementado com as mesmas diferentes concentrações de Pb. As placas foram incubadas a 30 °C. Após 72 horas de incubação, a concentração na qual os isolados não permaneceram viáveis foi considerada como o nível limite da tolerância (YASIN et al., 2018).

O isolado com maior capacidade de crescimento nas condições padrão acima citadas foi testado em diferentes condições de pH (pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0), temperatura (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C) e tempos de crescimento (24, 48 e 72 horas).

3.3.1 Remoção de chumbo pelo isolado

A remoção de Pb pelo isolado foi quantificada por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES), que identificou a concentração total/final de Pb no meio. Para isso, foram preparadas amostras com o sobrenadante diluído a 10% e o pH ajustado a $< 2,0$, com adição de HCl. Foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de Pb. As determinações de Pb foram realizadas no Laboratório de Metrologia Química da Universidade Federal de Pelotas (LabMeQ, UFPEL).

3.4 Identificação molecular do isolado

A identificação molecular do isolado foi realizada pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia, da Universidade de Caxias do Sul (UCS), de acordo com os protocolos descritos a seguir, padronizados pelo próprio laboratório.

3.7.1 Extração do DNA

Os micro-organismos foram crescidos *overnight* em meio Luria Bertani (LB) (HiMedia) em agitação a 140 rpm à 37 °C. A extração do DNA foi realizada com

HiMedia HiPura™ Bacterial genomic DNA Purification Kit® (HiMedia Laboratories), seguindo o protocolo do fabricante.

3.7.2 Amplificação do DNA

A amplificação dos genes 16S rRNA foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *Kit GoTaq® Green Master Mix* (Promega), utilizando os oligonucleotídeos universais 11F (5'-GTTTGATCCTGGCT-3') (KANE *et al.*, 1993) e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (LIN e STAHL, 1995), de acordo com a seguinte reação: 1 µL de cada oligonucleotídeo, 10 µL do Master Mix, 7 µL de água Milli-Q e 1 µL do DNA extraído, totalizando 20 µL. Todas as amplificações foram acompanhadas por controle negativo, isto é, sem DNA.

A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*), seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94 °C durante 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto e extensão final, a 72 °C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose (1,5%) e eletroforese (80 volts). A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) (*Vilber Lourmat*) após coloração com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)*.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando 0,25 µL da enzima *Exonuclease I* (*Amersham Bioscience* 2500U), 0,25 µL da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*Amersham Bioscience* 5000U), 0,50 µL de água Milli-Q e 6,0 µL do produto amplificado. A reação foi incubada a 37 °C durante 30 minutos e após a 80 °C por 15 minutos para inativação das enzimas.

Após a purificação, os produtos foram submetidos ao sequenciamento genético utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (*Applied Biosystems*). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do oligonucleotídeo específico e 0,5 µL do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit®* (*Applied Biosystems*) de acordo com instruções do fabricante.

Os dados do sequenciamento foram coletados e os arquivos FASTA obtidos foram alinhados e a identificação dos isolados foi realizada pela comparação das sequências de DNA com as sequências depositadas no *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST (BLASTn) (EDGAR, 2010).

3.8 Determinação de chumbo na água

Foram coletadas três amostras de 1 L da água da barragem, em pontos próximos onde a planta foi coletada. As amostras foram armazenadas em recipientes de plástico, previamente lavados com água e sabão neutro e banhados em ácido nítrico (HNO_3) 1:1. A metodologia utilizada foi adaptada de Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008). As amostras foram pré-concentradas da seguinte forma: foi transferida 250 mL da amostra homogeneizada para um béquer e adicionado 5 mL de ácido nítrico, essa solução foi aquecida lentamente até a ebulição para que se obtivesse um volume aproximado de 10 mL. Após, foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completado com água destilada. O ensaio foi feito em duplicata. As leituras foram feitas com auxílio do LabMeQ da UFPEL, utilizando MIP-OES. Foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de Pb.

3.9 Determinação de chumbo no solo

A determinação de chumbo no solo foi feita conforme metodologia adaptada de digestão ácida de solos da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1996). Foram coletadas três amostras de aproximadamente 200 g de solo, em pontos próximos às coletas de água e da planta, e acondicionadas em potes plásticos, previamente lavados com HNO_3 1:1. O solo foi homogeneizado, seco em estufa até peso constante, e peneirado, sendo que o material de maior granulometria foi descartado. Foi feita digestão em bloco digestor em duplicata. Foi colocada 1 g da amostra de solo e 10 mL de HNO_3 1:1 em um tubo de digestão, aquecido a 95 °C por 10 a 15 minutos, sem ferver. A amostra foi deixada esfriar e após adicionou-se 5 mL de HNO_3 concentrado, foi coberto com vidro de relógio e aquecido a 95 °C por 30 minutos. A amostra foi aquecida até que se obtivesse 5 mL de amostra. Foi deixada esfriar novamente e adicionou-se 2 mL de água e 3 mL de H_2O_2 30% e colocada para aquecer novamente, lentamente para que não ocorresse muita efervescência. Seguiu-se o aquecimento até a obtenção de 5 mL de amostra. A amostra foi resfriada, filtrada

e colocada em um balão de 25 mL e completado o volume com água destilada. Foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de Pb e as leituras feitas com auxílio do LabMeQ da UFPEL, com o MIP-OES.

3.10 Determinação de chumbo na planta

A concentração de Pb foi determinada, conforme metodologia adaptada de Zhang et al. (2009), nas folhas, caule e raízes, separadamente, da seguinte forma: os tecidos descritos anteriormente foram secos e pesados 100 mg e adicionados 5 mL de HNO₃ concentrado. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 10 horas e, em seguida, foram aquecidas a 90 °C por 1 hora, após, a temperatura foi elevada a 120 °C por 2 horas. As amostras foram resfriadas, filtradas e transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completadas com água destilada. Foi feita uma curva com concentrações conhecidas de Pb e as leituras foram feitas em MIP-OES, com auxílio do LabMeQ da UFPEL.

3.11 Concentração de carotenoides e clorofila

As concentrações de carotenoides e clorofilas *a* e *b* na planta foram determinadas conforme a metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) e com o auxílio da fórmula de Lichtenthaler (1987), descritas a seguir.

Foram pesadas 100 mg de folhas frescas da planta de diferentes posições do caule e incubadas a 65 °C com 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 1 M, até que as folhas fossem digeridas. Após, o extrato líquido foi transferido para um balão volumétrico e o volume completado até 10 mL com DMSO. Foi feita leitura em espectrofotômetro UV-VIS com ondas de 470, 645 e 663 nm para determinar as concentrações de carotenoides, clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente.

3.12 Avaliação da peroxidação lipídica e das enzimas antioxidantes

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas com as folhas da planta e no micro-organismo isolado em estudo. As análises foram realizadas em triplicata mais um controle negativo (sem o extrato enzimático).

3.12.1 Preparação dos extratos enzimáticos

3.12.1.1 Extrato extracelular (bruto) microbiológico

O isolado foi inoculado em 10 mL de caldo nutriente, pH 7,0, e incubado a 30 °C por 24 horas. Após este período, foram coletados 5 mL do meio que foram centrifugados a 3500 x g por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril para posterior utilização e a biomassa resultante utilizada conforme descrito a seguir no item 3.12.1.2.

3.12.1.2 Extrato intracelular microbiológico

As células obtidas conforme descrito no item 3.12.1.1 foram lavadas duas vezes com tampão 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5, contendo 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, as células foram ressuspensas em 3 mL do tampão e submetidas ao rompimento celular (*lise*) durante 1 minuto em agitador vórtex contendo 1 g de microesferas de vidro estéreis, seguido de uma pausa de 30 s em banho de gelo (SHAO et al., 2019). Por fim, os detritos celulares e as microesferas de vidro foram removidos por centrifugação e o extrato intracelular foi transferido para um novo tubo estéril para posterior determinação das atividades enzimáticas e de peroxidação lipídica.

Ambos os extratos (bruto e intracelular) foram congelados para posterior utilização nas análises dos biomarcadores.

3.12.1.3 Extrato vegetal

A preparação do extrato enzimático vegetal foi realizada conforme metodologia de Yasin et al. (2018), descrita a seguir. Foram pesadas 500 mg de folhas e adicionadas a 3 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,5), essa mistura foi moída com o auxílio de um pilão e um almofariz. A mistura resultante foi colocada em tubos e centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado para as análises posteriores.

3.12.2 Peroxidação lipídica

A reação ao ácido tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia modificada de Velikova, Yordanov e Edreva (2000) descrita a seguir.

Foi feita uma mistura de 0,5 mL do extrato, 0,2 mL de SDS 8,1%, 1 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1 mL de TBA 0,67% (pH 4,0), após, a mistura foi colocada em banho-maria a 95 °C por 60 minutos e depois colocada em banho de gelo por 10 minutos. Após foi medida a absorbância em 532 nm em espectrofotômetro UV-VIS. O SDS foi adicionado apenas para análise do extrato enzimático microbiológico. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g.

3.12.3 Determinação de proteína

A determinação de proteínas nas amostras foi realizada com base na metodologia de Lowry et al. (1951) modificada, com as seguintes soluções: reagente de Lowry: 10 mL da solução de CTC (sulfato de cobre 1% e tartarato de sódio e potássio 2% e a essa foi adicionada uma solução de carbonato de sódio 2%), 10 mL SDS 10%, 8 mL NaOH 1 M e 12 mL água mili-Q, reagente de fenol Folin-Ciocalteu diluído na proporção de 1:5 (v/v) em água mili-Q e albumina 1 mg/mL. A reação foi então preparada: 30 µL de amostra, 1170 µL de água mili-Q, 1200 µL do reagente de Lowry, agitou-se a mistura e aguardou-se 10 minutos, após foi adicionado 600 µL do reagente de Folin, agitou-se e aguardou-se 30 minutos para que fossem feitas as leituras em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 750 nm. Foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina (proteína).

3.12.4 Enzimas antioxidantes

3.12.4.1 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada por meio do método descrito por Giannopolities e Ries (1977), quantificada em 50 µL do extrato enzimático (descrito em 3.9.1) e 3 mL de reação de mistura (pH 8,0) (azul de nitrotetrazólio 63 µM,

riboflavina 1,3 μ M, metionina 13 mM, EDTA 0,1 mM e tampão Tris-HCl 50 mM). A preparação foi feita em ausência de iluminação, em frascos de vidro cobertos com papel, após os frascos foram expostos à luz fluorescente por 20 minutos. A absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 560 nm em cubeta de quartzo. A atividade enzimática da SOD foi expressa em Unidade SOD mg/proteína.

3.12.4.2 Atividade da enzima catalase

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Aebi (1984). Para isso, foram misturados a 25 °C, 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 200 μ L de peróxido de hidrogênio (1%) e 300 μ L dos extratos enzimáticos descritos em 3.9.1. A absorbância foi monitorada por 2 minutos a cada 15 segundos, em espectrofotômetro UV-VIS ajustado ao comprimento de onda de 240 nm, em cubeta de quartzo. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase por mg de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μ mol de H_2O_2 por minuto por mg/proteína).

3.12.4.3 Atividade da enzima glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi determinada conforme descrito por Upadhyaya et al. (1985) que se baseia na mistura de uma reação que deverá conter 1 mL de H_2O_2 a 1%, 2,5 mL de 50 mM tampão fosfato (pH 6,1), 20 μ L dos extratos enzimáticos descritos em 3.9.1 e 1 mL de guaiacol a 1%. A taxa de oxidação do guaiacol foi monitorada a 420 nm em espectrofotômetro UV-VIS durante 1 minuto a cada 30 segundos, em cubeta de quartzo. O resultado foi expresso em Unidade de GPx por mg/proteína.

3.13 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Graph Pad Prism 8. Foram feitas análises de normalidade (Shapiro-Wilk), para verificar a distribuição dos dados,

one-way ANOVA e Kruskal-Wallis, para aferir diferença estatística significativa entre os grupos, considerando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção e identificação molecular do isolado

Foram isoladas da rizosfera de *E. anagallis* cinco (n=5) colônias de micro-organismos distintos, identificados como I1, I2, I3, I4 e I5. No teste de tolerância ao Pb, todos os isolados permaneceram viáveis até a concentração de 100 mg/L, porém na concentração de 200 mg/L apenas o isolado I1 apresentou viabilidade quando inoculado em placa, sendo selecionado para dar prosseguimento neste estudo.

O isolado selecionado, até então denominado de I1, foi submetido ao teste de coloração de Gram e identificado como um bacilo Gram-positivo. Posteriormente, foi realizada a identificação molecular por meio de sequenciamento de DNA capilar – Método Sanger (STERKY & LUDENBERG, 2000), apresentando 96,41% de similaridade com *B. pumilus* (Figura 6), o qual pertence ao filo Bacillota e à ordem Bacillales, com número de acesso “KX218316.1” no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

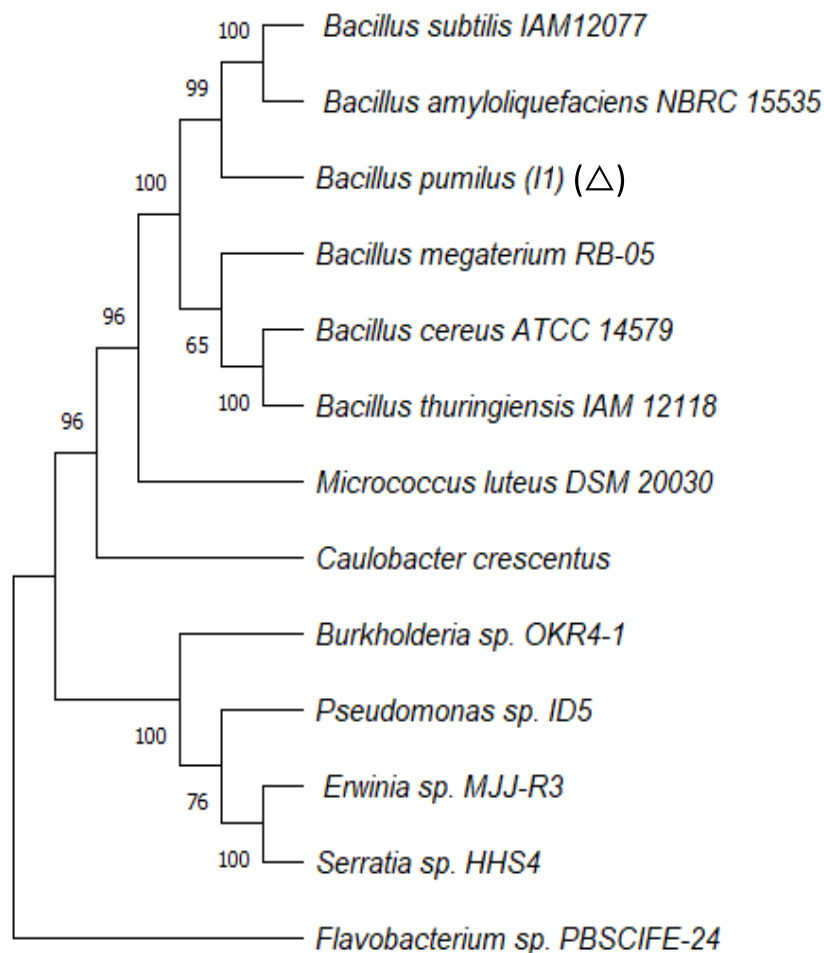


Figura 6: Árvore inferida pelo método Neighbor-Joining baseada nas sequências do gene 16S rRNA indicando a posição filogenética de *Bacillus pumilus* HG8 (Δ). O isolado foi depositado no GenBank sob o número NCBI KX218316.1.

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, possuem formato de bastão, são formadoras de esporos na natureza quando expostas a condições desfavoráveis, podem ser tanto aeróbias como anaeróbias facultativas. O grupo é bastante heterogêneo estando presente no solo, no ar, na água, nos alimentos e até no intestino humano. Algumas espécies são patogênicas enquanto outras são utilizadas na indústria (ALOTAIBI, KHAN & SHAMIM, 2021), como por exemplo fungicida em lavouras de soja.

Estudos sugerem que bactérias Gram-positivas possuem maior habilidade em se ligar a metais devido às características da parede celular. Uma característica relevante da parede celular de bactérias Gram-positivas são que estas contêm ácidos teicóicos associados à parede celular, diferente das Gram-negativas, os quais possuem grupos fosfatos importantes no processo de adsorção de metais. O grupo carboxil é um dos principais grupos envolvidos na adsorção de metais, e a fonte destes grupos carboxil são os ácidos teicóicos (ÇOLAK et al., 2021).

4.2 Efeitos do pH e da temperatura no crescimento de *Bacillus pumilus*

Foram avaliados os efeitos do pH (pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) e da temperatura incubação (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C) no crescimento do micro-organismo *B. pumilus*. Em todos os ensaios o meio de cultura foi suplementado com 50 mg/L de Pb.

Como resultados, observou-se maior viabilidade nos pHs de 6,0 e 7,0, porém sem diferença significativa entre ambos ($p=0.7570$); nos pHs de 8,0 e 9,0 a viabilidade foi significativamente inferior a detectada nos pHs 6,0 e 7,0; enquanto no pH de 5,0 não houve viabilidade (Figura 7). Os resultados obtidos corroboram com os resultados descritos por Wierzba & Latala (2010) e Çolak et al. (2011), com viabilidade de crescimento em pHs entre 5,0 e 8,0. Da mesma forma, Bennis et al. (2022) relataram que o isolado *B. pumilus* apresentou viabilidade em pHs de 5,0 a 9,0; já Efe (2020) demonstrou viabilidade do isolado entre os pHs de 4,0 e 11,0.

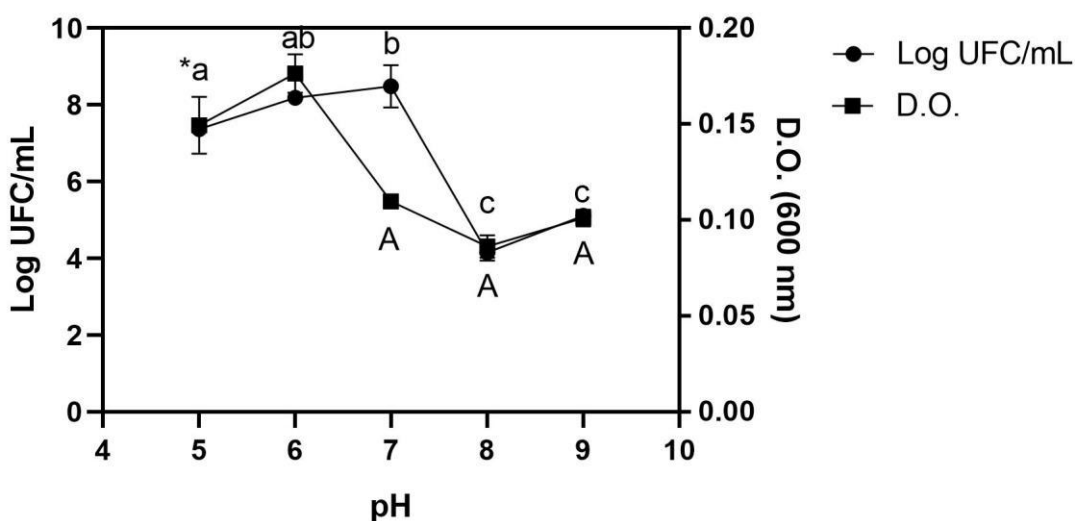


Figura 7: Efeito do pH na viabilidade de *Bacillus pumilus*. As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p<0,05$). *Letras minúsculas referem-se às medianas das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e letras maiúsculas referem-se às medianas da densidade ótica (D.O.).

Ao observar-se a influência da temperatura, foi possível verificar maior viabilidade nas temperaturas de 30 e 35 °C (Figura 8), não havendo diferença significativa entre estas ($p=0.9954$). Não houve viabilidade na temperatura de 10 °C, o que está em contraposição com os resultados obtidos por Wierzba & Latala (2010) e Çolak et al. (2011), onde *B. pumilus* foi capaz de se multiplicar e manter a viabilidade

na temperatura de 10 °C. No entanto, Bennis et al. (2022), encontraram resultados semelhantes aos relatados no presente estudo, onde as temperaturas entre 30 e 40 °C foram as que demonstraram maior viabilidade de *B. pumilus*.

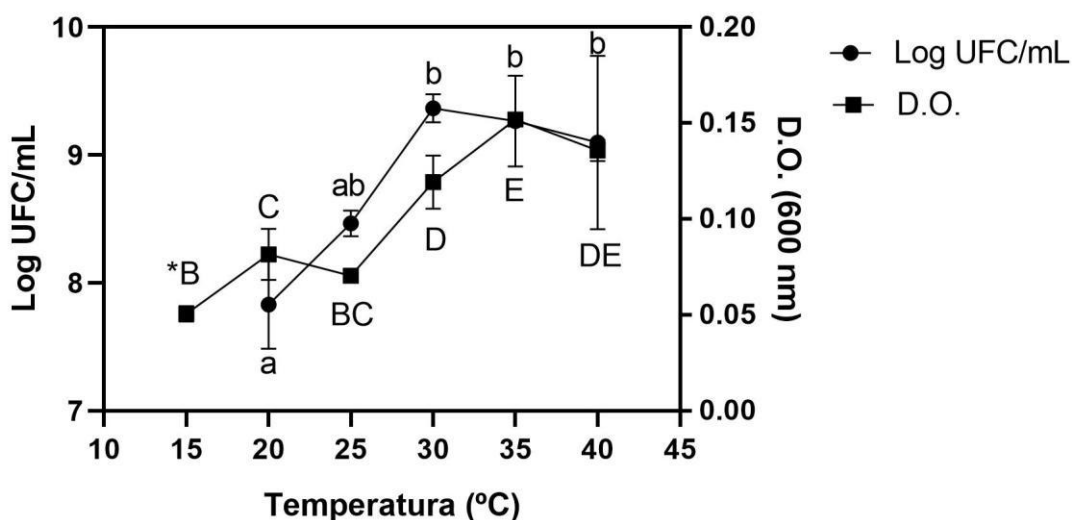


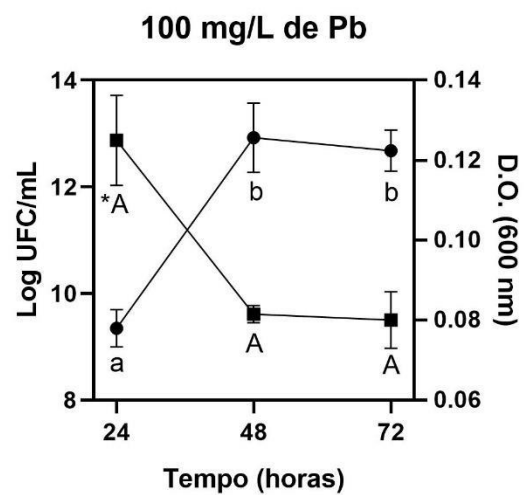
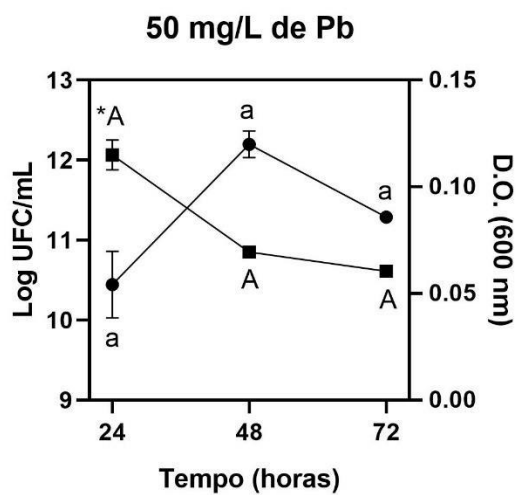
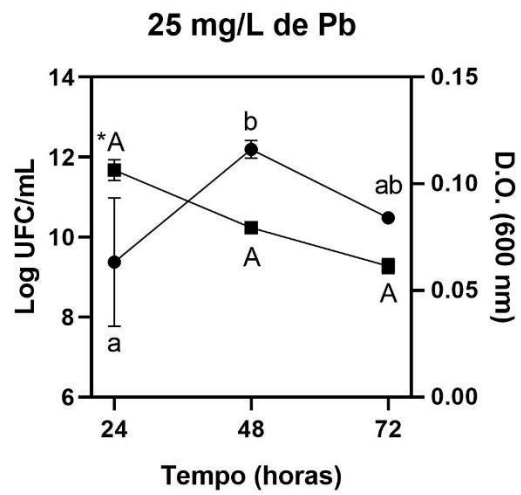
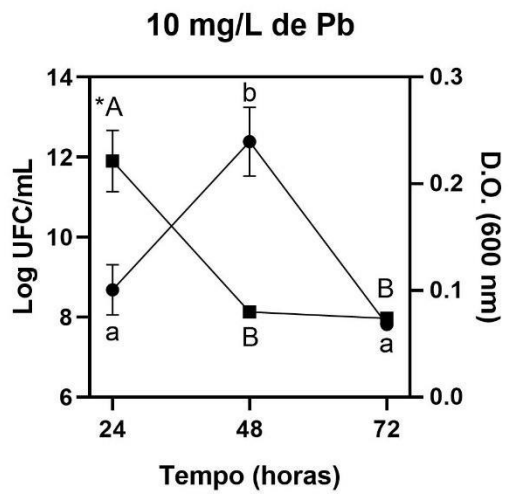
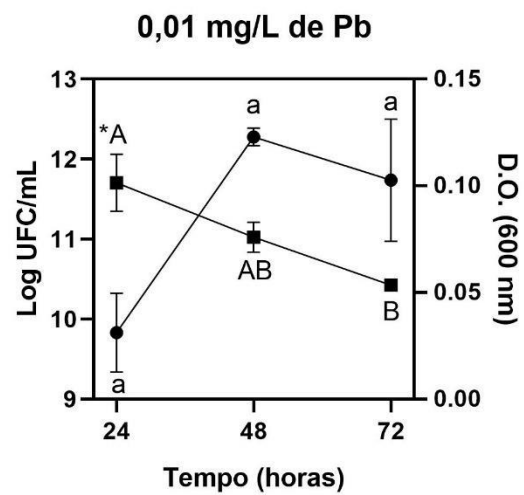
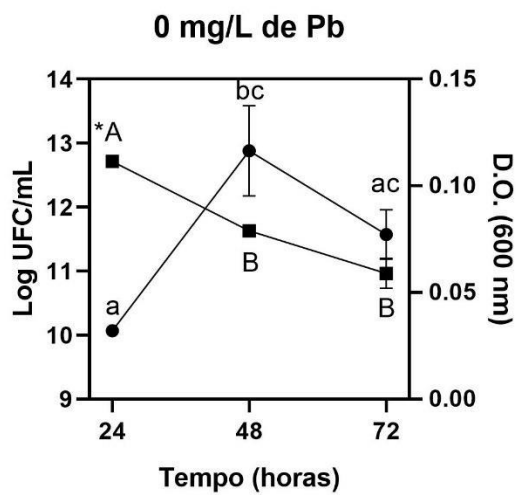
Figura 8: Efeito da temperatura na viabilidade de *Bacillus pumilus*. As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Letras minúsculas referem-se às medianas das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e letras maiúsculas referem-se às medianas da densidade ótica (D.O.).

Após análise dos resultados, foram definidas como melhores condições de crescimento o pH de 7,0 e a temperatura de 30 °C, assim utilizadas como padrão para o prosseguimento dos experimentos.

4.3 Efeitos do chumbo no crescimento de *Bacillus pumilus*

Para avaliar os efeitos do Pb na viabilidade do isolado, foram utilizadas diferentes concentrações do metal no meio de cultura (caldo nutriente e ágar nutriente), sendo estas: 0; 0,01; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/L. O crescimento foi monitorado em diferentes tempos de incubação: 24, 48 e 72 horas (Figura 9). As condições de pH e de temperatura utilizadas foram as estabelecidas previamente: pH 7,0 e temperatura de 30 °C.

Analisando apenas a viabilidade nos tempos de 24 e 48 horas não houve diferença significativa entre as concentrações de Pb analisadas. Já com 72 horas, na concentração de 10 mg/L o micro-organismo apresentou uma viabilidade significativamente menor comparada às demais concentrações (Figura 9).



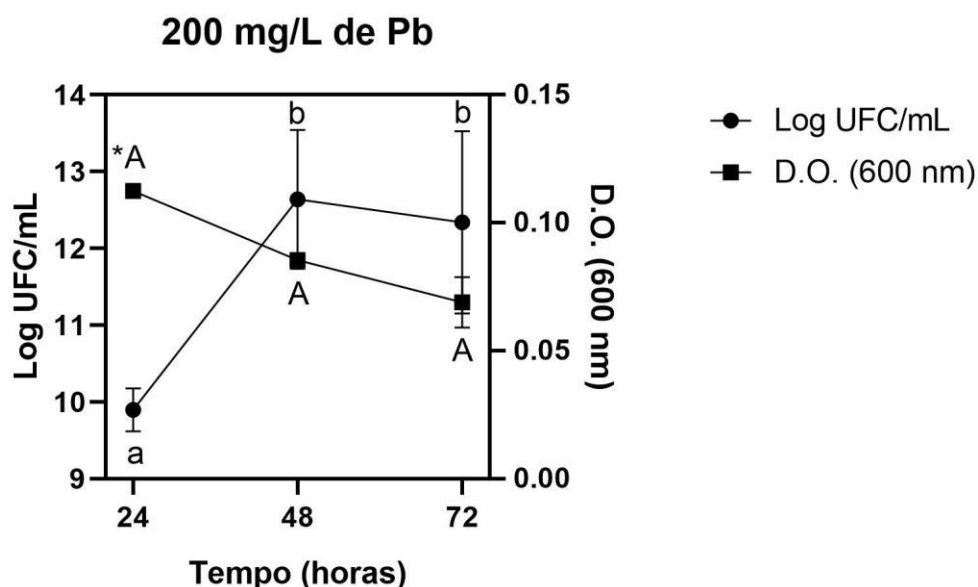


Figura 9: Viabilidade de *Bacillus pumilus* nas diferentes concentrações de chumbo e tempos de incubação (horas). As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Letras minúsculas referem-se às medianas das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e letras maiúsculas referem-se às medianas da densidade ótica (D.O.).

Outros autores também demonstraram a capacidade de crescimento de *B. pumilus* em meio contendo Pb e outros metais, como Jayanthi et al. (2016), os quais isolaram bactéria do solo de um depósito de lixo operacional e essa mostrou-se capaz de sobreviver em concentrações de ~20 mg/L de Pb. Sharma et al. (2021) também demonstrou viabilidade da bactéria em meios contendo >100 mg/L de Pb.

Um exemplo de aplicação prática está no estudo de Zulfiqar et al. (2022), onde os autores inocularam *B. pumilus* na espécie vegetal *Vigna radiata*, e sua semente foi colocada para germinar em um solo contaminado artificialmente com 300 mg/kg de Pb; os resultados indicaram que a inoculação da bactéria favoreceu o crescimento da espécie vegetal e também a fitoextração do metal de forma significativa.

4.4 Remoção de chumbo por *Bacillus pumilus*

O isolado foi testado quanto a sua capacidade em remover o Pb do meio (caldo nutriente). Na Figura 10, pode-se observar as taxas de remoção de Pb após 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo evidente a redução em todas as concentrações iniciais

após o período total de 72 horas. Nas concentrações de 25, 100 e 200 mg/L observou-se diferença significativa entre os tempos de 24 e 48 horas e 24 e 72 horas.

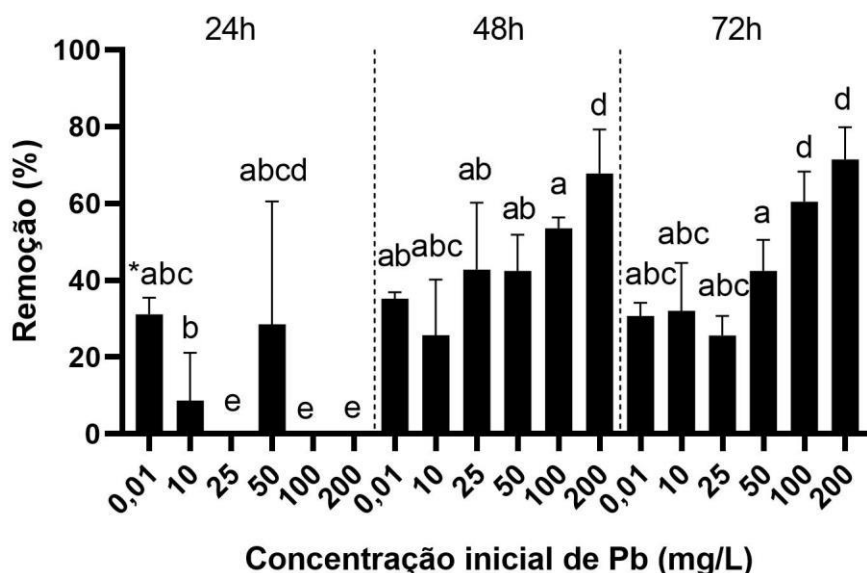


Figura 10: Remoção de chumbo por *Bacillus pumilus*, com tempo de exposição de 24, 48 e 72 horas. *As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Çolak et al. (2011) obtiveram taxas de remoção de Pb de até 28,06 mg/g, utilizando um sistema de leito fixo no pH ótimo de 6,0. Esse comportamento pode ser explicado devido às mudanças nas cargas elétricas na superfície da biomassa. Em pHs mais baixos, a superfície da biomassa se torna carregada positivamente, assim os íons de hidrogênio competem com o Pb pelos sítios de ligação. Em pHs mais neutros, a biomassa fica carregada negativamente aumentando as ligações com o Pb devido à força de atração eletrostática.

Wierzba e Latala (2010) testaram a biomassa viável e não-viável de *B. pumilus*, obtendo uma maior remoção no pH ótimo de 6,0, com as células vivas (viáveis), isso pode ser explicado devido ao acúmulo intracelular, além da adsorção nas paredes celulares externas. Testaram também a capacidade de dessorção, com intuito de se reutilizar a biomassa em outras remoções, onde a biomassa de células não-vivas apresentou uma maior taxa de dessorção, o que pode ser explicado, mais uma vez, pelo acúmulo intracelular de metal nas células vivas, impossibilitando, assim, a dessorção.

A afinidade de ligação entre cátions e os grupos funcionais presentes nas membranas celulares é fortemente relacionada ao pH. Conforme os resultados

relatados por Wierzba e Latala (2010), a capacidade de remoção do metal aumentou proporcionalmente com o aumento do pH, até atingir a capacidade máxima no pH de 6,0, onde *B. pumilus* adsorveu 74,1 mg/g de Pb. Já nos pHs de 7,0 e 8,0 foi observada uma pequena redução na adsorção. Essa relação de dependência é decorrente dos grupos funcionais da parede celular bacteriana e da química do metal. As paredes celulares possuem grupos funcionais como aminas, amidas e carboxilas que podem estar carregados positivamente ou negativamente, a depender do pH do meio em que estão inseridas. Quando o pH do meio é aumentado, aumentam as cargas negativas dos grupos funcionais, o que aumenta a força de atração, favorecendo, assim, a adsorção de cátions, que são moléculas carregadas positivamente. Assim, o contrário também é verdadeiro, quando o pH do meio é reduzido, aumentam as cargas positivas dos grupos funcionais, favorecendo, assim, a dessorção desses cátions anteriormente ligados.

Sayyadi et al. (2017) investigaram a capacidade de remoção de Pb de uma solução aquosa com *B. pumilus* sp. AS1, obtendo, conforme os parâmetros de *Langmuir*, a capacidade máxima de adsorção de 0,671 mmol/g no pH ótimo de 4,0. Ainda, por meio de análises FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier), observaram a participação dos grupos carboxil e hidroxil da parede celular no processo de adsorção.

Sharma et al. (2021) buscaram desenvolver um consórcio de *B. pumilus* e *B. cereus* para remover Pb de soluções aquosas, obtendo remoções de até 95,93% com a concentração inicial de 100 mg/L.

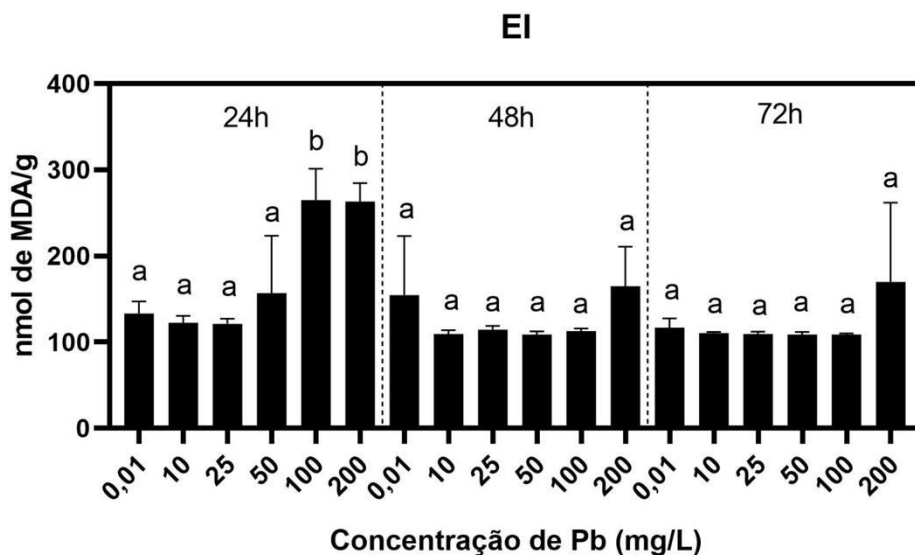
Jayanthi et al. (2016) isolaram diversas espécies de bactérias de dois lixões, um ativo e um inativo. Um dos isolados do lixão operacional foi *B. pumilus*, o qual se mostrou altamente resistente a todos os metais testados, com exceção para o níquel e cádmio. O isolado manteve a viabilidade em todas as concentrações de Pb testadas (5, 10, 15 e 20 ppm). Esses resultados demonstraram a alta viabilidade do micro-organismo mesmo quando na presença de altos níveis de metais, o que pode indicar a presença de mecanismos de resistência a diversos metais.

No estudo de Nithya et al. (2011), os autores buscaram isolar e identificar a resistência de bactérias isoladas do sedimento de Palk Bay (Índia) a diferentes tipos de metais. Foram 46 isolados, entre estes, *B. pumilus*, que se mostrou altamente resistente aos metais arsênio, mercúrio, cobalto, cádmio, chumbo e selênio. No

estudo, os autores removeram o plasmídeo (*plasmid curing*) de *B. pumilus*, e após a remoção a viabilidade não foi afetada de forma significativa, indicando que a resistência aos metais é proveniente do cromossomo e não do plasmídeo.

4.5 Efeito do chumbo na peroxidação lipídica em *Baccillus pumilus*

A peroxidação lipídica em *B. pumilus* foi quantificada por meio da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e expressa em nmol de MDA/g, conforme demonstrado na Figura 11. De acordo com os resultados, no extrato intracelular, a bactéria demonstrou capacidade de inibição da peroxidação lipídica até a concentração de 50 mg/L somente no tempo de 24h, enquanto nos demais tempos de incubação demonstrou capacidade até a concentração de 200 mg/L. Já no extrato bruto, a bactéria apresentou capacidade de inibição em todas as concentrações e tempos com exceção de 200 mg/L nos três tempos testados. O aumento da presença de MDA nas maiores concentrações indica que houve um aumento na geração de ERO. É possível considerar a hipótese de que *B. pumilus* possua a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana plasmática quando em condições adversas, a fim de evitar danos celulares.



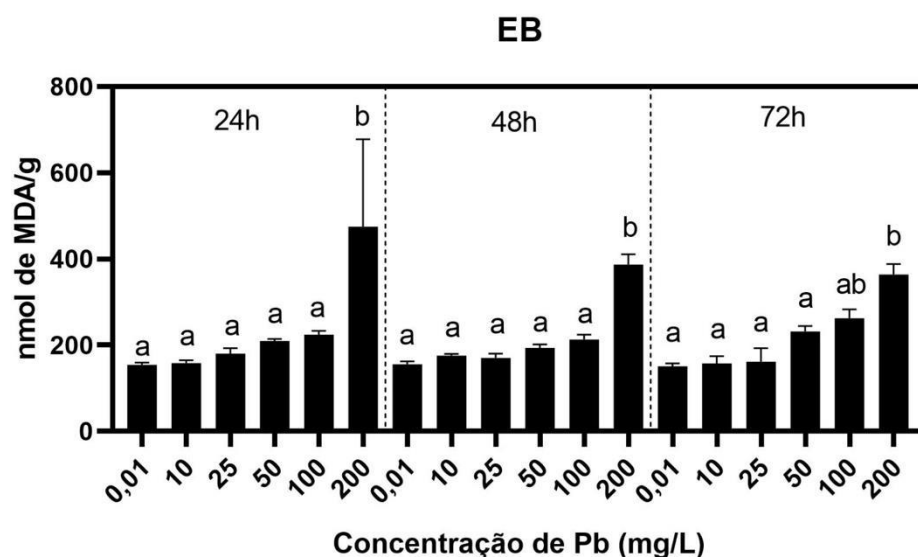


Figura 11: Quantificação de malonaldeído/g em *Bacillus pumilus*, nos extratos bruto (EB) e intracelular (EI), nas diferentes concentrações de chumbo e tempo de exposição. *As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.6 Efeito do chumbo na atividade das enzimas antioxidantes em *Bacillus pumilus*

As atividades das enzimas foram quantificadas nos extratos brutos (EB) e nos extratos intracelulares (EI), visando aferir o efeito do Pb na atividade das enzimas antioxidantes de *B. pumilus*. Na atividade da catalase (Figura 12) houve diferença significativa nas concentrações de 10 e 25 mg/L nos tempos de 24 e 72h, respectivamente, no extrato bruto; e no extrato intracelular na concentração de 0,01 mg/L no tempo de 72h, onde as enzimas apresentaram maior atividade. No estudo de Shao *et al.* (2019), considerando EI, a CAT apenas aumentou na maior concentração utilizada, sendo de 5 mmol/L de Pb. A catalase é uma enzima crucial que atua na decomposição do H_2O_2 . Esta age na proteção das células contra danos oxidativos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (ERO). Um fenômeno interessante neste estudo é que a atividade da catalase não aumentou significativamente sob estresse leve, mas aumentou rapidamente em condições severas. Isso sugere que, em situações mais críticas, há uma maior produção de H_2O_2 após os processos metabólicos, em comparação com momentos de estresse mais brandos.

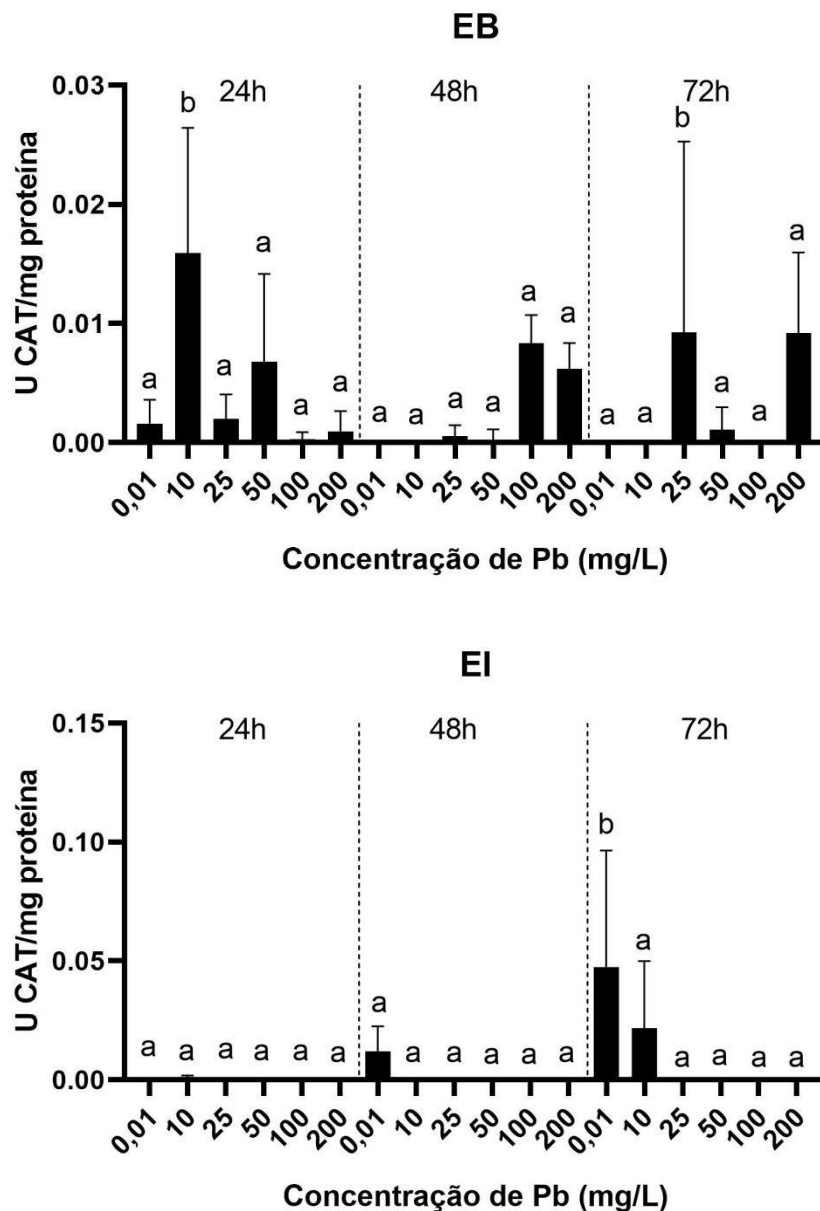


Figura 12: Atividade da enzima catalase em *Bacillus pumilus* em diferentes concentrações de chumbo e em diferentes tempos de exposição: 24, 48 e 72 horas (da esquerda para a direita). Dados expressos em unidades de catalase/mg de proteína. *As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na atividade das enzimas superóxido dismutase no extrato bruto, ocorreram diferenças significativas apenas na concentração de 10 mg/L em 24h, e em todas as concentrações em 48h. Enquanto no extrato intracelular, houve diferenças entre os tempos de 24h e os demais, com exceção da concentração de 100 mg/L no tempo de 24h (Figura 13). No estudo de Shao *et al.* (2019) a atividade intracelular da SOD

aumentou levemente nas concentrações de 0.5 e 1 mmol/L de Pb, porém teve um aumento maior na concentração de 5 mmol/L. Esses resultados demonstram que a atividade foi dependente da presença de ERO, indicando que a SOD figura um importante papel na remoção dessas ERO.

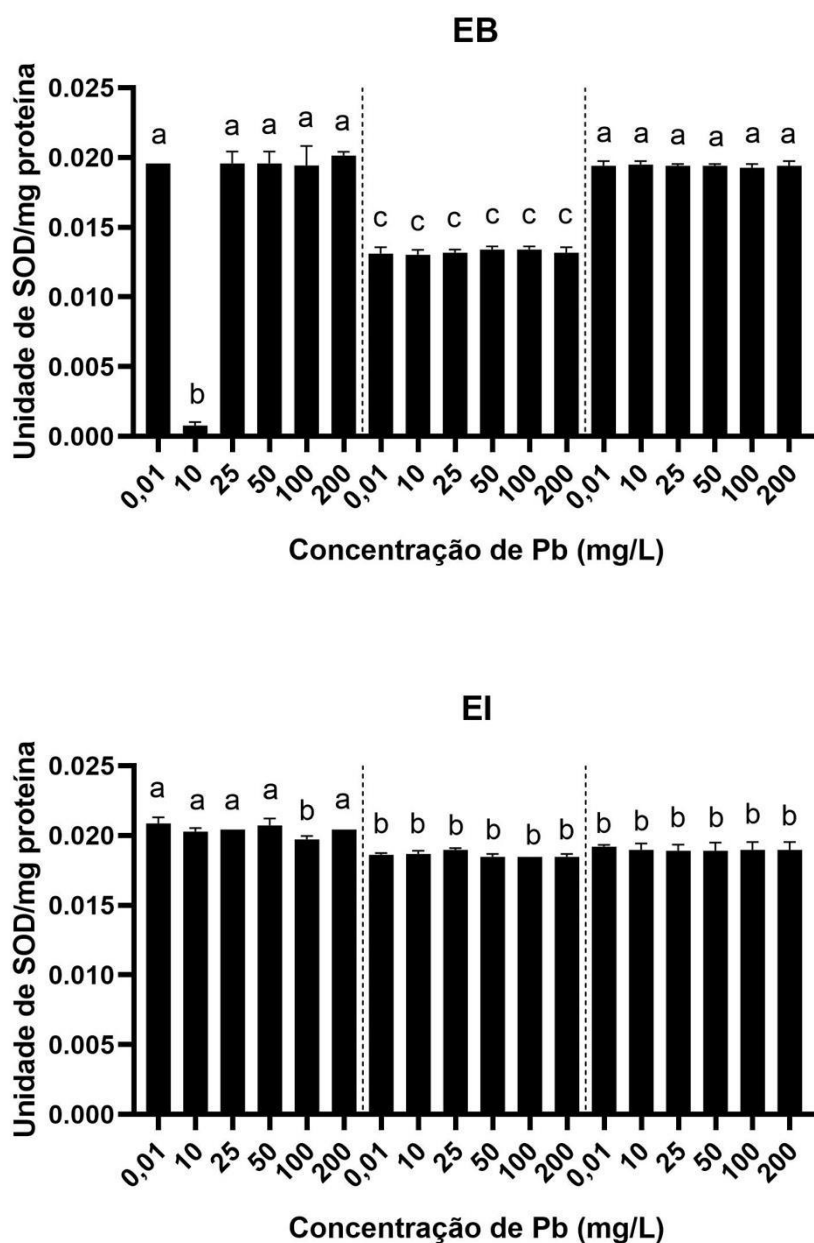


Figura 13: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em *Bacillus pumilus* em diferentes concentrações de chumbo e em diferentes tempos de exposição: 24, 48 e 72 horas (da esquerda para a direita). Dados expressos em Unidade de SOD mg/proteína. *As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O experimento demonstrou que a produção de enzimas antioxidantes é um mecanismo bioquímico pelo qual os organismos respondem à acumulação de metais. Além disso, micro-organismos podem apresentar diferentes sensibilidades e respostas em relação a diferentes metais, especialmente no contexto do estresse oxidativo.

4.7 Peroxidação lipídica no extrato vegetal de *Enydra anagallis*

O MDA, um produto citotóxico da peroxidação lipídica, tem sido considerado um indicador fisiológico da deterioração da membrana celular devido ao estresse oxidativo (Wang et al., 2008, 2012; Li et al., 2018). Desta forma, a peroxidação lipídica também foi avaliada no extrato vegetal realizado a partir das folhas (Figura 14). Pelos resultados obtidos pode-se observar que, a quantidade de MDA em todos os pontos de coleta analisados foi semelhante, não havendo diferença significativa entre estes ao longo da Barragem. Porém, a quantidade de nmol de MDA/g encontrada foi elevada em todas as amostras (média de 381,79 nmol de MDA/g).

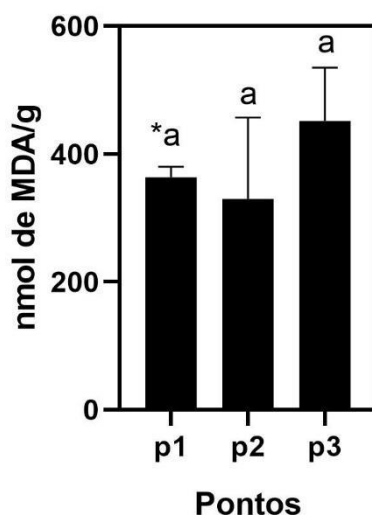


Figura 14: Quantificação de malonaldeído/g na espécie vegetal *Enydra anagallis*. *As medianas seguidas de letras iguais não diferem entre si de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Compreender os mecanismos de peroxidação lipídica em plantas fitorremediadoras pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhorar a capacidade de remediação das plantas e proteger sua integridade celular em ambientes poluídos. Ao explorar formas de mitigar a peroxidação lipídica, pretende-

se melhorar a eficiência e a sustentabilidade dos processos de fitorremediação utilizando plantas aquáticas. Estas desempenham um papel vital na fitorremediação, absorvendo contaminantes da água, solo ou sedimentos e transformando-os ou armazenando-os em seus tecidos. No entanto, esta absorção e armazenamento de contaminantes pode desencadear estresse oxidativo nas células vegetais, promovendo a peroxidação lipídica (WANG, et al., 2008; GUO et al., 2019).

Por outro lado, o sistema de enzimas antioxidantes pode oferecer às plantas proteção suficiente contra a deterioração causada por espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como bem sabemos, CAT, SOD e SOD são enzimas antioxidantes importantes nas plantas para resistir ao estresse oxidativo (LÓPEZ-HUERTAS e del RÍO, 2014; YADAV et al., 2018).

4.8 Estresse oxidativo no extrato vegetal de *Enydra anagallis*

O estresse oxidativo foi avaliado ainda nos extratos feitos a partir das folhas da planta. Não houve nenhuma atividade registrada para a enzima GPx e, nas demais enzimas analisadas, não houve atividade significativa, conforme pode ser observado na Figura 15. Com os resultados é possível inferir que as condições ambientais nas quais a planta está inserida não são uma causa de estresse oxidativo no seu metabolismo.

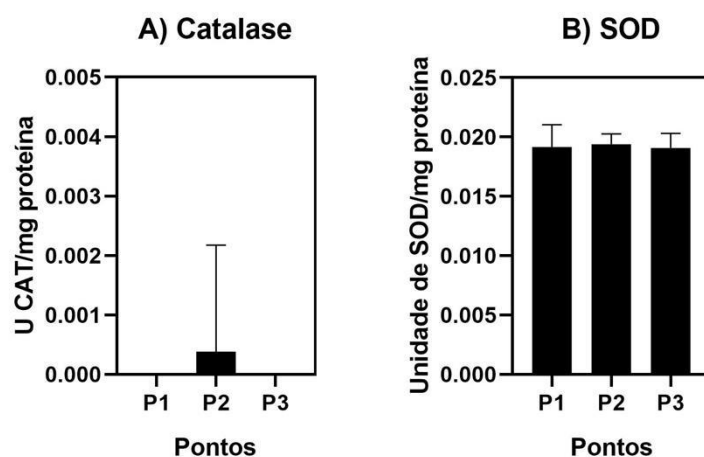


Figura 15: Quantificação da atividade enzimática de catalase (A) e superóxido dismutase (B) na espécie vegetal *Enydra anagallis*. Não houve diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

No estudo de Ma et al. (2022), os autores buscaram avaliar o estresse oxidativo e a atividade antioxidante de *Glycyrrhiza uralensis*, na presença e na ausência de *B. pumilus*. Os resultados apontaram que o estresse hídrico causa uma produção exacerbada de ERO em *G. uralensis* e, também, uma redução na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). Porém, a inoculação de *B. pumilus* e o uso de silício (Si) aumentaram a efetividade do sistema antioxidante, aceleraram o ciclo de Ascorbate-glutathione (AsA-GSH) e ativaram o metabolismo de flavonoides e carotenoides, que agem para reduzir o excesso de ERO, assim reduzindo o estresse oxidativo. *Glycyrrhiza uralensis* aumentou a produção do radical hidróxido (O^2) quando em estresse hídrico, porém a presença do micro-organismo, combinado com a presença de Si, reduziram de forma significativa a produção do radical hidróxido, assim como, reduziram a taxa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de MDA. As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram reduzidas de forma significativa, enquanto a atividade de GPx foi aumentada significativamente, em *G. uralensis* durante o estresse hídrico. Utilizando de forma isolada, *B. pumilus* apenas aumentou a taxa de atividade da enzima CAT, enquanto o uso combinado de *B. pumilus* e Si aumentou as taxas de CAT e SOD. Também durante o estresse hídrico, a síntese de carotenoides e flavonoides foi reduzida, porém na presença de *B. pumilus* e/ou de Si foi aumentada de forma significativa. Os autores concluíram que o uso, principalmente, da forma combinada do micro-organismo e Si apresentou efeitos positivos no sistema antioxidante de *G. uralensis* sob estresse hídrico.

Ekinci et al. (2021) aferiram os efeitos de *B. pumilus* e de *Bacillus cereus* no crescimento e estresse oxidativo de *Capsicum annuum* L. sob estresse salino. Os resultados mostraram que os índices de ácido giberélico, ácido salicílico, ácido indolacético e a hidratação nas folhas foram reduzidas sob estresse salino, porém quando na presença dos micro-organismos, estes índices foram aumentados. As concentrações de prolina, sucrose, hormônios e clorofilas, aumentaram, e, ainda, observou-se melhora na absorção de nutrientes e otimização da atividade do sistema antioxidante. As atividades enzimáticas foram aumentadas na planta sob estresse sem a presença dos micro-organismos, porém a atividade enzimática foi reduzida na presença dos mesmos. Este fato pode indicar que a presença de bactérias reduziu os efeitos do estresse em meio salino.

4.9 Clorofila e carotenoides

As plantas são capazes de combater o estresse ambiental por meio de mecanismos estruturais e funcionais. Já é conhecido que um baixo nível de estresse estimula o desempenho das plantas e é essencial para o seu funcionamento (AGATHOKLEUS; FENG; PEÑUELAS, 2020).

A redução do conteúdo de clorofila tem sido observada em várias espécies de plantas devido à contaminação com metais pesados (MOBIN e KHAN, 2007) que, frequentemente, inibem processos metabólicos por meio da inibição da ação de enzimas. O decréscimo no conteúdo de clorofila associado com o estresse de metais pesados pode ser resultado da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de clorofila (STOBART et al., 1985)

A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios, como por exemplo, a clorofila *b* e os carotenoides. As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza em uma proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3 (TAIZ, e ZIEGLER, 2004).

No presente estudo, os níveis de carotenoides e de clorofilas *a* e *b* foram quantificados utilizando os extratos feitos a partir das folhas da espécie vegetal *E. anagallis*. Foi possível observar um nível maior de clorofila *a* ($7.564 \pm 1.091 \mu\text{g/mL}$), seguido de carotenoides ($2.684 \pm 0.34626 \mu\text{g/mL}$) e clorofila *b* ($1.610 \pm 0.1643 \mu\text{g/mL}$). Os resultados encontrados estão de acordo com o estudo de Petrovic & Krivokapic (2020) realizado com a planta *Trapa natans* L., onde os autores quantificaram clorofila *a* até 1.15 mg/g, e clorofila *b* até 0.757 mg/g. Os autores ainda observaram uma correlação negativa entre a presença de metal nas folhas e a quantidade de clorofila, demonstrando que essa redução pode ter ocorrido devido ao estresse oxidativo.

4.10 Quantificação de chumbo em *Enydra anagallis*

Os níveis de chumbo na espécie vegetal foram quantificados de forma isolada nas folhas, no caule e na raiz, conforme demonstrado na Figura 16.

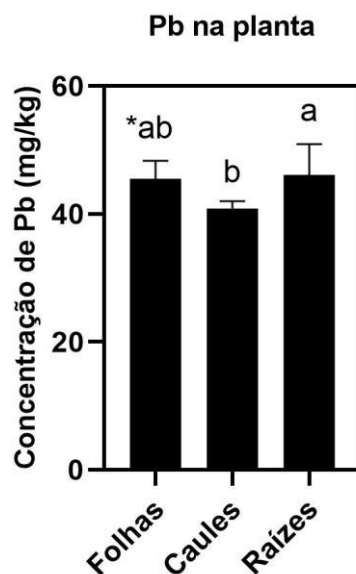


Figura 16: Quantificação de chumbo na espécie vegetal *Enydra anagallis*. *As medianas seguidas de letras iguais indicam que não houve diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Outros autores também quantificaram Pb em *E. anagallis*, porém em valores bem abaixo do que os encontrados no presente estudo (Tabela 4), como Demarco et al. (2018) que obtiveram como resultado 25,8 mg/kg na massa seca; já Pitelli et al. (2018), obtiveram uma média de 15,9 mg/kg e Jha et al. (2016) encontraram valores de 84,7 mg/kg.

Tabela 4: Concentrações média de chumbo encontradas na espécie vegetal *E. anagallis*.

Concentração (mg/kg)	Região da planta	Referência
46,125	Raízes	Autora (2023)
40,875	Caule	Autora (2023)
45,5	Folhas	Autora (2023)
25,8	Raiz e aérea	Demarco et al. (2018)
15,9	Não especificado	Pitelli et al. (2018)
84,7	Não especificado	Jha et al. (2016)

4.11 Quantificação de chumbo na água e no solo da Barragem Santa Bárbara

Os níveis de Pb também foram quantificados na água e no solo da barragem Santa Bárbara. Na água, foram encontrados valores de 0,0134 a 0,0250 mg/L. As concentrações encontradas estão acima do estabelecido pela resolução nº 357 do CONAMA (0,01 mg/L).

Demarco et al. (2018) já haviam quantificado Pb na água da barragem Santa Bárbara, encontrando valores de 0,011 a 0,018 mg/L. Outros autores também encontraram níveis variados de Pb na água, como Carvalho et al. (2017) e Boleji et al. (2021) (Tabela 5), também acima do preconizado pelo CONAMA.

Tabela 5: Concentração de Pb encontrada em água.

Concentração (mg/L)	Local	Referência
0,0134 a 0,025	Santa Bárbara (Pelotas, RS)	Autora (2023)
0,018 a 0,011	Santa Bárbara (Pelotas, RS)	Demarco et al. (2018)
0,097	Rio Doce, (Mariana, MG)	Carvalho et al. (2017)
0,007 a 0,016	Paca (Jauja, Peru)	Boleji et al. (2021)
0,009 a 0,026	Tragadero (Jauja, Peru)	Boleji et al. (2021)

Quanto aos valores encontrados no solo, variaram de 8,775 mg/kg a 14,325 mg/kg. Outros autores (Boleji et al., 2021; Ferreira et al., 2021) encontraram valores superiores aos descritos no presente estudo com relação ao Pb no solo e em sedimentos, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6: Concentrações de Pb encontradas no solo e sedimento.

Concentração (mg/kg)	Local	Referência
8,775 a 14,325	Santa Bárbara (Pelotas, RS)	Autora (2023)
35,56 a 35,96	Paca (Jauja, Peru)	Boleji et al. (2021)
41,52 a 59,52	Tragadero (Jauja, Peru)	Boleji et al. (2021)
75,5	Billings (São Paulo, SP)	Ferreira et al. (2021)
78,8	Guarapiranga (São Paulo, SP)	Ferreira et al. (2021)
46,7	Rio Grande (São Paulo, SP)	Ferreira et al. (2021)

Esses níveis elevados encontrados na água e no solo requerem atenção, pois além de serem matrizes indispensáveis a todo ecossistema, são também indispensáveis aos setores de produção e ao desenvolvimento socioeconômico (Rodrigues et al., 2016). Como citado anteriormente no capítulo 2.2, níveis elevados

de metais podem causar diversos problemas no ambiente e nos seres vivos (plantas, animais e seres humanos).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que a rizobactéria *B. pumilus* isolada da espécie vegetal *E. anagallis* foi resistente ao metal Pb, demonstrando viabilidade significativa mesmo em alta concentração (~200 mg/L), porém apresentou diferenças no crescimento de acordo com a temperatura, pH e concentração do metal.

Referente às análises de quantificação de Pb, a espécie *E. anagallis* mostrou-se capaz de acumular grande quantidade de metal em seus tecidos, demonstrando ser uma planta bioacumuladora. Quanto às concentrações encontradas no solo e na água, requerem atenção e monitoramento, pois os valores estavam acima do preconizado pela legislação vigente.

Nas análises de atividade enzimática e de estado redox, a presença do metal parece não interferir no metabolismo de *B. pumilus* frente a atividade da SOD e TBARS. Da mesma forma, quando analisada a resposta oxidativa na espécie vegetal *E. anagallis*, não foi observada diferença significativa na atividade enzimática, indicando que, apesar dos níveis de Pb encontrados, a condição ambiental em que a planta se encontrava, não configurou uma causa de estresse no seu metabolismo, provavelmente, por esta ter desenvolvido mecanismos de resistência.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. DOI 10.1016/s0076-6879(84)05016-3. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>>. Acesso em 19/05/2021.
- ALI, R.; BILLAH, M.; HASSAN, M.; DEWAN, S. M. R.; AL-EMRAM. *Enhydra fluctuans* Lour: A review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 9, p. 927-929, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/261513846_Enhydra_fluctuans_Lour_A_R_eview>. Acesso em 10/11/2021.
- ALOITABI, B. S.; KHAN, M.; SHAMIM, S. Unraveling the Underlying Heavy Metal Detoxification Mechanisms of Bacillus Species. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 2021. Disponível em: <10.3390/microorganisms9081628>. Acesso em 17/02/2024.
- ALVES, A. R. A.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, E. F.; NOVO, L. A. B. Role of bacteria and mycorrhizal fungi in phytomining: status and future perspectives. In: KUMAR, A.; SINGH, V. K.; SINGH, P.; MISHRA, V. K. Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants. **Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition**, p. 15-26, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00002-X>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012821199100002X>>. Acesso em 09/12/2021.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>>. Acesso em 20/12/2021.
- BARBOSA JR. F.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F.; PARSONS, P. J. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations and future needs. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 229-241, 2006. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csc/a/xfyWghxT39Bvyr54kCDGH5f/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em 1º/06/2022.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007. DOI 10.1152/physrev.00044.2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237347/>>. Acesso em 27/12/2021.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, 1999. DOI 10.1590/S1415-52731999000200001. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rn/a/bzHBTqBfJr8jmJn3ZXx9nMs/abstract/?lang=pt>>. Acesso em 27/12/2021.

BOLEJI, L. A.; CUSTODIO-VILLANUEVA, M.; ZAPATA, F. C. C.; CAMPÓ, W. J. C.; FERNÁNDEZ, R. P. P. Bioconcentração e bioacumulação de metais tóxicos em *Scirpus californicus* de áreas úmidas naturais nos Andes Centrais do Peru.

Ambiente e Água, v. 16, n. 5, 2021. DOI 10.4136/1980-993X. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ambiagua/a/CP5nszc5vRTQZh3DGKD9qHv/?lang=en#>>. Acesso em 11/01/2021.

BORIES, O.; DUMAT, C.; SOCHACKI, L.; AUBRY, C. Les agricultures urbaines durables: un vecteur pour la transition écologique. **VertigO**, série 31, 2018. DOI 10.4000/vertigo.20953.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D.. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, p. 1-102, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60425-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60425-3)>. Acesso em 20/12/2021.

BRASIL. Lei n.º 6.938, de 31 de agosto de 1981. **Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6938compilada.htm>. Acesso em 15/12/2021.

CARVALHO, M. S. de; MOREIRA, R. M.; RIBEIRO, K. D.; ALMEIDA, A. M. de. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 37-41, 2017. DOI 10.22571/Actabra13201758. Disponível em: <<http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/58/29>>. Acesso em 07/01/2022.

CETESB. Dispõe sobre a aprovação dos “Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2016” e dá outras providências. **Decisão de Diretoria nº. 256 de 21/11/2016**. Disponível em: <<https://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016-Intranet.pdf>>. Acesso em 1º/12/2021.

CETESB. Ficha de Informação Toxicológica. **Chumbo e seus compostos**. 2021. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Chumbo.pdf>>. Acesso em 1º/12/2021.

CHAPARRO, J. M.; SHEFLIN, A. M.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 489-499, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00374-012-0691-4>>. Acesso em 20/12/2021.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-46S, 2000. DOI 10.1093/ajcn/72.2.637S. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10919970/>>. Acesso em 27/12/2021.

ÇOLAK, F.; ATAR, N.; YAZICIOGLU, D.; OLGUN, A. Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. **Chemical**

Engineering Journal, v. 173, n. 2, p. 422-428, 2011. DOI 10.1016/j.cej.2011.07.084. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.084>>. Acesso em 1º/04/2023.

CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Resolução CONAMA, nº 357 de 17/03/2005 e suas alterações**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>.

CONAMA. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=111046>>. Acesso em 1º/06/2022.

CONAMA. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. **Resolução CONAMA nº 454 de 1º de novembro de 2012**. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2012/res_conama_454_2012_materialserdragadoemaguasjurisdicionaisbrasileiras.pdf>. Acesso em 1º/06/2022.

COSTA, N. V.; CARDOSO, L. A.; MARCHI, S. R.; DOMINGOS, V. D.; MARTINS, D. Controle químico de plantas daninhas aquáticas: *Alternanthera philoxeroides*, *Enhydra anagallis* e *Pycnus decubens*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 335-342, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000200022>>. Acesso em 09/11/2021.

COSTA, M. S.; ARAÚJO, T. R. R.; MARTINS, Á. de J.; SILVA, H. S. da.; COSTA, C. H.; MIRANDA, R. de C. M. de. Isolamento de microrganismos de interesse biotecnológico oriundos de áreas contaminadas com agroquímico. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, n. 1, p. 17-23, 2017. DOI 10.24863/rib.v9i1.83. Disponível em: <<http://www.ceuma.br/portalderevistas/index.php/RIB/article/view/83>>. Acesso em 25/08/2021.

DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H.; DEHGHANI, Z. Immobilized stearic acid as a new sorbent for on-line preconcentration and determination of lead by flow injection flame atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, 2006. DOI 10.1590/S0103-50532006000300018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbchs/a/PzmgSqPpJTgwhRDD4SzFpmg/?lang=en>>. Acesso em 01/04/2022.

DEMARCO, C. F.; AFONSO, T. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A. O.; ANDREAZZA, R. In situ phytoremediation characterization of heavy metals promoted by *Hydrocotyle ranunculoides* at Santa Bárbara stream, an anthropogenic polluted site in Southern of Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 28312-28321, 2018. DOI 10.1007/s11356-018-2836-y.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2836-y>>. Acesso em 19/04/2021.

DEMARCO, C. F.; AFONSO, T. F.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; CAMARGO, F. A. O.; ANDREAZZA, R. Evaluation of *Enydra anagallis* remediation at a contaminated watercourse in South Brazil. **International Journal of Phytoremediation**, 2020. DOI 10.1080/15226514.2020.175475. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1754759>>. Acesso em 28/10/2021.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, vol. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010. DOI 10.1093/bioinformatics/btq461. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/19/2460/230188>>. Acesso em 05/11/2021.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, 1997. DOI 10.1590/S0104-42301997000100014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ramb/a/FBtqwzvvhJhcCgRbYZtp4yTQ/?lang=pt#>>. Acesso em 27/12/2021.

FERREIRA, K. DE S.; RANI-BORGES, B.; SANTOS, G. L. M.; CARDOSO-SILVA, S.; SÁ, L. R. M. DE; POMPEO, M. Metals in the sediments of reservoirs: is there potencial toxicity? **Sociedade & Natureza**, v. 33, 2021. DOI 10.14393/SN-v33-2021-58794. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sn/a/HL7KQ6fNkdd8s9KStKWwRxy/?lang=en#>>. Acesso em 11/01/2022.

FREITAS, S. dos S.; Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Em: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília, DF: Embrapa, 1994, p. 369-374. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/199952/manual-de-metodos-empregados-em-estudos-de-microbiologia-agricola>>. Acesso em 22/08/2021.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI 10.1104/pp.59.2.309. Disponível em: <<https://academic-oup-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/plphys/article/59/2/309/6075837>>. Acesso em 15/02/2022.

GIROLKAR, S.; THAWALE, P.; JUWARKAR, A. Bacteria-assisted phytoremediation of heavy metals and organic pollutants: challenges and future prospects. **Bioremediation for Environmental Sustainability**, p. 247-267, capítulo 12, 2021. DOI 10.1016/B978-0-12-820318-7.00012-5. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128203187000125>>. Acesso em 14/05/2021.

GOOGLE. Imagem de satélite da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. 2022.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. S110-S118. DOI 10.2337/diabetes.53.2007.S110. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/suppl_1/S110/11614/Prevention-of-Mitochondrial-Oxidative-Damage-as-a>. Acesso em 27/12/2021.

GUAGNINI, F. de S.; CORREA, A.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; PANZIERA, W.; DALTO, A.; DRIEMEIER, D. Intoxicação por chumbo em bovinos mantidos em área de treinamento militar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/46-suple-1/CR_253.pdf>. Acesso em 26/01/2022.

GUO, J.; QIN, S.; RENGEL, Z.; GAO, W.; NIE, Z.; LIU, H.; LI, C.; ZHAO, P. Cadmium stress increases antioxidant enzyme activities and decreases endogenous hormone concentrations more in Cd-tolerant than Cd-sensitive wheat varieties. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 380-387, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.069>>. Acesso em: 24/02/2024.

GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; WALTHER, C. (Editores). Radionuclides and Heavy Metals in the Environment. **Lead in plants and the environment**. Springer Nature Switzerland, 2020. ISBN 978-3-030-21638-2 (e-book). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2>>. Acesso em 27/10/2021.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004. DOI 10.1038/sj.bjp.0705776. Disponível em: <<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0705776>>. Acesso em 27/12/2021.

HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; JAILLARD, B. Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 88, n. 1-3, p. 210-213, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.041>>. Acesso em 20/12/2021.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A Method for Extraction of Chlorophyll from Leaf Tissue without Maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979. DOI 10.1139/b79-163.

HOLSTEGE, C. P.; ROSS, J. A.; KOPATIC, M. C.; HOLSTEGE, E. P.; BOREK, H. A.; RAMACHANDRAN, T. S.; HUFF, J. S.; ROWDEN, A. K.; O'MALLEY, R. N. Pathophysiology and Etiology of Lead Toxicity. **Medscape**, 2020. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/2060369-overview?reg=1#a1>>. Acesso em 1º/06/2022.

JESUS, L. D. F. de; MOREIRA, M. de F. R.; AZEVEDO, S. V. de; BORGES, R. M.; GOMES, R. A. de A.; BERGAMINI, R. P. B.; TEIXEIRA, L. R. Avaliação dos níveis

de chumbo e mercúrio em população exposta ambientalmente na Região Centro-oeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, 2018. DOI 10.1590/0102-311X00034417. Disponível em:

<<https://www.scielo.org/article/csp/2018.v34n2/e00034417/#>>. Acesso em 19/01/2022.

JHA, P.; SAMAL, A. C.; SANTRA, S. C.; DEWANJI, A. Heavy metal accumulation potencial of some wetland plants growing naturally in the city of Kolkata, India.

American Journal of Plant Sciences, v. 7, n. 15, 2016. DOI

10.4236/ajps.2016.715189. Disponível em:

<<https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=71625>>. Acesso em 26/01/2022.

JIANG, J.; PAN, C.; XIAO, A.; YANG, X.; ZHANG, G. Isolation, identification, and environmental adaptability of heavy-metal-resistant bacteria from ramie rhizosphere soil around mine refinery. **3 Biotec**, v. 7, n. 5, 2017. DOI 10.1007/s13205-017-0603-2. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0603-2>>.

Acesso em 11/06/2021.

KANE, M. D.; POULSEN, L. K.; STAHL, D. A. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 682-686, 1993. DOI 10.1007/s11356-015-5354-1. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.59.3.682-686.1993>>.

Acesso em 13/06/2022.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física.

Revista de Nutrição, v. 14, n. 4, 2003. DOI 10.1590/S1415-52732003000400007.

Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/rn/a/BhXWBSZLdCG7q8dYF3tcTGm/?lang=pt>>. Acesso em 27/12/2021.

KÜLAHCI, F. Environmental distribution and modelling of radioactive lead (210): a Monte Carlos simulation application. Em: GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; WALTHER, C. (Editores). **Lead in plants and the environment**. 2020.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987. DOI

10.1016/0076-6879(87)48036-1. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/313093886_Chlorophylls_and_carotenoid_s_pigments_of_photosynthesis>. Acesso em 07/11/2021.

LIN, C.; STAHL, D. A. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1348-1351, 1995. DOI

<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1348-1351.1995>.

LIN, H.; LIU, C.; LI, B.; DONG, Y. *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402,

123829, 2021. DOI 10.1016/j.jhazmat.2020.123829. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33254810/>>. Acesso em 14/05/2021.

LOPEZ-HUERTAS, E.; DEL RÍO, L. A. Characterization of antioxidant enzymes and peroxisomes of olive (*Olea europaea* L.) fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 16, p. 1463-1471, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.014>>. Acesso em: 24/02/2024.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. DOI 10.1016/S0021-9258(19)52451-6. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819524516>>. Acesso em 19/05/2021.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>>. Acesso em 20/12/2021.

MADANAN, M. T.; SHAH, I. K.; VARGHESE, G. K.; KAUSHAL, R. K. Application of Aztec Marigold (*Tagetes erecta* L.) for phytoremediation of heavy metal polluted lateritic soil. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, p. 17-22, 2021. DOI 10.1016/j.enceco.2020.10.007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S259018262030031X>>. Acesso em janeiro/2021.

MALIK, B.; PIRZADAH, T. B.; TAHIR, I.; HAKEEM, K. R.; RATHER, I. A.; SABIR, J. S. M.; REHMAN, R. UI. Lead and aluminium-induced oxidative stress and alteration in the activities of antioxidant enzymes in chicory plants. **Scientia Horticulturae**, v. 278, 2021. DOI 10.1016/j.scienta.2020.109847. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109847>>. Acesso em 25/06/2023.

MANOJ, S. R.; KARTHIK, C.; KADIRVELU, K.; ARULSELVI, P. I.; SHANMUGASUNDARAM, T.; BRUNO, B.; RAJKUMAR, M. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 254, 109779, 2020. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.109779. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479719314975>>. Acesso em janeiro/2021.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 933S-940S, 2003. DOI 10.1093/jn/133.3.933S. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12612179/>>. Acesso em 27/12/2021.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>>. Acesso em 20/12/2021.

MENDOZA-HERNÁNDEZ, J. C.; VÁZQUEZ-DELGADO, O. R.; CASTILLO-MORALES, M.; VARELA, J. L.; SANTAMARÍA-JUÁREZ, J. D.; OLIVARES-XOMETL, O.; MORALES, J. A.; PÉREZ-OSORIO, G. Phytoremediation of mine tailings by *Brassica juncea* inoculated with plant growth-promoting bacteria. **Microbiological Research**, v. 228, 2019. DOI 10.1016/j.micres.2019.126308. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126308>>. Acesso em 17/05/2021.

MOBIN, M.; KHAN, N. A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 5, 2007. Disponível em: <10.1016/j.jplph.2006.03.003>. Acesso em: 24/02/2024.

NATASHA; DUMAT, C.; SHAHID, M.; KHALID, S.; MURTAZA, B. Lead Pollution and human exposure: Forewarned is forearmed, and the question now becomes how to respond to the threat! Em: GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; WALTHER, C. (Editores). **Lead in plants and the environment**. 2020.

NGUYEN, C. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Em: LICHTFOUSE, E.; NAVARRETE, M.; DEBAEKE, P.; VÉRONIQUE, S.; ALBEROLA, C. (Editores). **Sustainable Agriculture**, p. 97-123. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_9>. Acesso em 20/12/2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chumbo. Saúde Infantil e o Meio Ambiente**. Pacote de Treinamento da OMS para o setor de Saúde. 2008. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336918/WHO-HSE-PHE-AMR-08.01.04-por.pdf?sequence=5&isAllowed=y>>. Acesso em: 04/11/2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Lead in drinking-water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2011. Disponível em: <https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/lead.pdf>. Acesso em: 04/11/2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **9ª Semana Internacional de Prevenção ao Envenenamento por Chumbo**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/campaigns/international-lead-poisoning-prevention-week/2021>>. Acesso em 04/11/2021.

PAREDES-PÁLIZ, K., RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R., DUARTE, B., CAVIEDES, M. A., MATEOS-NARANJO, E., REDONDO-GÓMEZ, S., CAÇADOR, M. I., RODRÍGUEZ-LLORENTE, I. D., PAJUELO, E. Investigating the mechanisms underlying phytoprotection by plant growth-promoting rhizobacteria in *Spartina densiflora* under metal stress. **Plant Biology**, v. 20, p. 497-506, 2018. DOI 10.1111/plb.12693. Disponível em: <<https://doi-org.ez66.periodicos.capes.gov.br/10.1111/plb.12693>>. Acesso em 11/06/2021.

PARVEN, S.; DE, A.; GUPTA, A. Cu and Pb accumulation and removal from aqueous medium by *Enydra fluctuans* DC. (Asteraceae) – A medicinal plant with potencial for

phytoremediation. **Research Square**, 2021. DOI 10.21203/rs.3.rs-634449/v1. Disponível em: <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-634449/v1>>. Acesso em 10/11/2021.

PATRA, D. K., PRADHAN, C., PATRA, H. K. Toxic metal decontamination by phytoremediation approach: Concept, challenges, opportunities and future perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, 2020. DOI 10.1016/j.eti.2020.100672. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100672>>. Acesso em 26/05/2021.

PÉREZ-PALACIOS, P.; AGOSTINI, E.; IBÁÑEZ, S. G.; TALANO, M. A.; RODRÍGUEZ-LLORENTE, I. D.; CAVIEDES, M. A.; PAJUELO, E. Removal of copper from aqueous solutions by rhizofiltration using genetically modified hairy roots expressing a bacterial Cu binding protein. **Environmental Technology**, v. 38, p. 2877-2888, 2017. DOI: 10.1080/09593330.2017.1281350. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2017.1281350>>. Acesso em 14/06/2021.

PETROVIC, D.; KRIVOKAPIC, S. The effect of Cu, Zn, Cd and Pb accumulation on biochemical parameters (proline, chlorophyll) in the water caltrop (*Trapa natans* L.), Lake Skadar, Montenegro. **Plants**, v. 9, 1287, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/9/10/1287>>. Acesso em: 21/02/2024.

PITELLI, R. A.; PITELLI, R. L. C. M.; CERVEIRA FILHO, W. R.; ROCHA, R. J. DA S.; CRUZ, F.; JACOB NETO, J. Avaliação das concentrações de nutrientes e metais pesados nas principais macrófitas aquáticas do reservatório de Santana – RJ no período de três anos. **Semioses: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**, v. 12, n. 2, 2018. DOI 10.15202/1981996x.2018v12n2p112. Disponível em: <<https://doi.org/10.15202/1981996x.2018v12n2p112>>. Acesso em 09/11/2021.

RASHID, M.I.; MUJAWAR, L.H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I.M.I.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, v. 183, p. 26-41. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>>. Acesso em 20/12/2021.

RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: Possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016. DOI: 10.5935/1984-6835.20160017. Disponível em: <<https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1488/726>>. Acesso em 20/11/2023.

ROVER, L. JR.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol24No1_112_18.pdf>. Acesso em 27/12/2021.

RUI-YAN, F. U.; JIAN, C. H. E. N.; YIN, L. I. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems

of microbial cells. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 770-775, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(07\)60048-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(07)60048-X)>. Acesso em 18/02/2024.

SABOL, J. Major analytical Methods for determining lead in environmental and biological samples. Em: GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; WALTHER, C. (Editores). **Lead in plants and the environment**. 2020.

SANEP. Serviço Autônomo de Saneamento de Pelotas. **Sistema de Captação**. Disponível em: <<https://portal.sanep.com.br/agua/sistema-captacao>>. Acesso em 07/12/2021.

SANTOS, S. de O.; SILVA, C. A. da. Teores de chumbo, cádmio e arsênio em peixes marinhos comercializados em Maceió, Aracaju e Salvador. In: **Embrapa Tabuleiros Costeiros - Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Em: VI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, Aracaju, 2016. Anais... Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2016., 2016.

SAXENA et al. Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soils. Em: PRASAD, M. N. V. et al. **Heavy metal stress in plants**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 305-329, 1999.

SAYYADI, S.; AHMADY-ASBCHIN, S.; KAMALI, K.; TAVAKOLI, N. Thermodynamic, equilibrium and Kinect studies on biosorption of Pb+2 from aqueous solution by *Bacillus pumilus* sp. AS1 isolated from soil at abandoned lead mine. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 80, p. 701-708, 2017. DOI 10.1016/j.jtice.2017.09.005. Disponível em: <<https://www-webofscience.ez66.periodicos.capes.gov.br/wos/woscc/full-record/WOS:000415769200079>>. Acesso em 25/05/2023.

SCHMIDT, A. V. **Determinação de chumbo em lodo de estação de tratamento de água visando sua possível utilização na agricultura**. 2019. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/212997>>. Acesso em 21/04/2022.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/71871>>. Acesso em 27/12/2021.

SHAH, V.; DAVEREY, A. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, 100774, 2020. DOI 10.1016/j.eti.2020.100774. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352186419308107>>. Acesso em janeiro/2021.

SHAHID, M. **Biogeochemical behavior of heavy metals in soil-plant system**. Paquistão: Higher Education Commission – Pakistan, 2017. Disponível em:

<<http://pr.hec.gov.pk/jspui/bitstream/123456789/49/1/BIOGEOCHEMICAL%20BEHAVIOUR%20OF%20HEAVY%20METALS%20IN%20SOIL-PLANT%20SYSTEM.pdf>>. Acesso em 1º/06/2022.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, 2004. DOI 10.1590/S1415-52732004000200009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rn/a/sJ6qRLvhXvkQR6CjnKgZN7K/abstract/?lang=pt#>>. Acesso em 27/12/2021.

SHAO, W.; LI, MIN.; TENG, Z.; QIU, B.; HUO, Y.; ZHANG, K. Effects of Pb(II) and Cr(VI) Stress on Phosphate- Solubilizing Bacteria (Bacillus SP. Strain MRP-3): Oxidative Stress and Bioaccumulation Potential. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 2172, p. 1-15, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Heavy-metal-intracellular-and-extracellular-bioaccumulation-mmolg-1-dry-weight-of_tbl1_333888583>. Acesso em 06/06/2022.

SILVA, C. M. M. de S.; VIEIRA, R. F. Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo. Capítulo 2, p. 16-48. Em: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Microbiologia Ambiental**. 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. ISBN 978-85-85771-44-7. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/15285>>. Acesso em 25/02/2022.

STOBART, A. K.; GRIFFITHS, W. T.; AMEEN-BUKHARI, I.; SHERWOOD, R. P. (1985). The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 63, n. 3, p. 293-298, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb04268.x>>. Acesso em: 24/02/2024.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.693.

TONG, S.; SCHIRNDING, Y. E. von; PRAPAMONTOL, T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bull World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1068-1077, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2560844/>>. Acesso em 1º/06/2022.

TUTUARIMA, J. Lead level correlation (Pb) in blood on Hb level, hematocrit, cystatin C serum, SGOT and SGPT serum on car paint workshop in Rungkut, Surabaya. **Health Notions**, v. 2, n. 3, 2018. Disponível em: <<http://heanoti.com/index.php/hn/article/view/hn20317>>. Acesso em 1º/06/2022.

USEPA. **EPA Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils**. Data and Tools. 1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/esam/epa-method-3050b-acid-digestion-sediments-sludges-and-soils>>. Acesso em 31/03/2023.

UPADHYAYA, A.; SANKHLA, D.; DAVIS, Tim D.; SANKHLA, N.; SMITH, B. N. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 121, p. 453-461, 1985. DOI 10.1016/S0176-1617(85)80081-X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S017616178580081X>>. Acesso em 19/05/2021.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000. DOI 10.1016/S0168-9452(99)00197-1. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945299001971>>. Acesso em 04/03/2022.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potencial interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007. DOI 10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17924865/>>. Acesso em 27/12/2021.

WAN, X.; LEI, M.; CHEN, T. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 796-802, 2016. DOI 10.1016/j.scitotenv.2015.12.080. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969715312377>>. Acesso em janeiro/2021.

WANG, C., ZHANG, S.H., WANG, P.F., HOU, J., LI, W., ZHANG, W.J. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 88–98, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.009>>. Acesso em: 24/02/2024.

WANI, A. L.; ARA, A.; USMANI, J. A. Lead toxicity: a review. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 8, p. 55–64, 2015.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; EDEN, M. E. V.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free radical biology & medicine**, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002. DOI 10.1016/s0891-5849(02)00760-8. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11909692/>>. Acesso em 27/12/2021.

WIERZBA, S.; LATALA, A. Biosorption lead (II) and nikel (II) from an aqueous solution by bacterial biomass. **Polish Journal of Technology**, v. 12, n. 3, 2010. DOI: 10.2478/v10026-010-0038-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.2478/v10026-010-0038-6>>. Acesso em 23/05/2023.

XIN, J.; MA, S.; LI, Y.; ZHAO, C.; TIAN, R. *Pontederia cordata*, an ornamental aquatic macrophyte with great potencial in phytoremediation of heavy-metal-contaminated wetlands. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, 111024, 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2020.111024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651320308630>>. Acesso em janeiro/2021.

YADAV, V.; SINGH, H.; SINGH, A.; HUSSAIN, I.; SINGH, N. B. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) grown under cinnamic acid stress. **Russian Agricultural Sciences**, v.

44, p. 9-17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3103/S1068367418010202>>. Acesso em: 24/02/2024.

YASIN, N. A.; KHAN, W. U.; AHMAD, S. R.; ALI, A.; AHMED, S.; AHMAD, A. Effect of *Bacillus fortis* 162 on growth, oxidative stress tolerance and phytoremediation potencial of *Catharanthus roseus* under chromium stress. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 20, p. 1513-1522, 2018. DOI 10.17957/IJAB/15.0655.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/323601095_Effect_of_Bacillus_fortis_162_on_growth_oxidative_stress_tolerance_and_phytoremediation_potential_of_Catharanthus_roseus_under_chromium_stress>. Acesso em 08/03/2021.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (EDS.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV ed., 1 ed. online. São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em:

<https://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em 31/03/2023.

ZHANG, Z.S.; LU, X.G.; WANG, Q.C.; ZHENG, D.M. Mercury, Cadmium and Lead Biogeochemistry in the Soil–Plant–Insect System in Huludao City. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p. 255–259, 2009.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-009-9688-6>>. Acesso em: 26/02/2024.

ZHOU, J.; CHEN, L. H.; PENG, L.; LUO, S.; ZENG, Q. R. Phytoremediation of heavy metals under an oil crop rotation and treatment of biochar from contaminated biomass for safe use. **Chemosphere**, v. 247, 125856, 2020. DOI

10.1016/j.chemosphere.2020.125856. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653520300473>>.

Acesso em janeiro/2021.

ZULFIQAR, U.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, S.; MAQSOOD, M.; HUSSAIN, M.; ISHFAQ, M.; AHMAD, M.; ANJUM, M. Z. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. **Journal of Environmental Management**, v. 250, 109557, 2019. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.109557. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545179/>>. Acesso em janeiro/2021.