

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Salvinia auriculata* Aublet MEDIADA POR  
*Enterobacter* sp. SOB ESTRESSE POR COBRE**

**JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES- RIO DE JANEIRO**

**JULHO 2019**

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Salvinia auriculata* Aublet MEDIADA POR  
*Enterobacter* sp. SOB ESTRESSE POR COBRE**

**JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Chaves Intorne

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO- UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES- RIO DE JANEIRO  
JULHO 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586 Silva, Jussara Tamires de Souza.

Promoção do Crescimento de *Salvinia auriculata* Aublet mediada por *Enterobacter* sp. sob Estresse por cobre / Jussara Tamires de Souza Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

61 f. : il.  
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.  
Orientadora: Aline Chaves Intorne.

1. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal . 2. Interações Planta - Bactérias. 3. Biorremediação. 4. Metal. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Salvinia auriculata* Aublet MEDIADA POR  
*Enterobacter* sp. SOB ESTRESSE POR COBRE

JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal

Aprovada em de 31 Julho de 2019

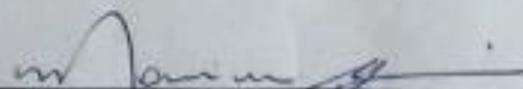
Comissão Examinadora:



Dr. Vinicius Fortes Farjalla (UFRJ)



Dr. Fábio Lopes Olivares (UENF)



Drª Marina Satika Suzuki (UENF)



Drª Aline Chaves Intorne (IFRJ)  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tudo que faz por mim.

À professora Dr<sup>a</sup> Aline Chaves Intorne pelas oportunidades de desenvolver pesquisa e extensão no grupo de Microbiologia Ambiental, pela orientação e pelo aprendizado.

Aos membros da banca Dr. Vinícius Fortes Farjalla, Dr. Fábio Lopes Olivares, Dr<sup>a</sup> Marina Satika Suzuki pelas contribuições ao trabalho.

À UENF pela estrutura, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal (PPGBV) pela oportunidade de realizar o curso com todo apoio científico e institucional, à FAPERJ pelo apoio financeiro. À secretária do PPGBV Margareth de Vasconcelos Paes. Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido.

À minha família pelo apoio em todos os momentos da minha vida, à Nelson Luis Motta Goulart por ser presente em todos os sentidos.

Aos amigos que a UENF trouxe, que me dão a motivação nos dias ruins e são a companhia para os dias alegres. Muito obrigada. Aos colegas do Grupo de Microbiologia Ambiental, aos técnicos, professores, alunos e pesquisadores do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM).

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| RESUMO .....  | VII  |
| ABSTRACT .....  | VIII |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 9    |
| 2. OBJETIVOS .....  | 11   |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....   | 11   |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 11   |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 12   |
| 3.1. O metal cobre .....  | 12   |
| 3.2. Plantas aquáticas .....  | 13   |
| 3.3. Bactérias benéficas .....  | 15   |
| 3.4. Biorremediação.....  | 17   |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 19   |
| CAPÍTULO 1.....   | 25   |
| 5.1. INTRODUÇÃO .....   | 25   |
| 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 28   |
| 5.2.1. Local de coleta.....   | 28   |
| 5.2.2. Cultivo da planta .....  | 28   |
| 5.2.3. Isolamento de bactérias.....   | 28   |
| 5.2.4. Micro-organismos e condições de cultivo .....  | 29   |
| 5.2.5. Identificação molecular dos isolados .....   | 29   |
| 5.2.6. Fixação biológica de nitrogênio .....  | 30   |
| 5.2.7. Produção de compostos indólicos .....  | 30   |
| 5.2.8. Solubilização de fosfato.....  | 31   |
| 5.2.9. Ensaio de promoção do crescimento vegetal .....  | 31   |
| 5.2.10. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima .....  | 32   |
| 5.2.11. Inoculação da bactéria na planta com metal.....   | 32   |
| 5.2.12. Desenvolvimento da planta.....  | 33   |
| 5.2.13. Extravasamento de eletrólitos.....  | 33   |
| 5.2.14. Determinação de pigmentos fotossintéticos .....   | 33   |
| 5.2.15. Análise estatística .....   | 34   |
| 6. RESULTADOS .....   | 35   |
| 6.1. Bactérias associadas à <i>Salvinia auriculata</i> .....  | 35   |
| 6.2. Potencial de promoção do crescimento vegetal das bactérias .....                               | 37   |
| 6.3. Promoção do crescimento de <i>S. auriculata</i> por <i>Enterobacter</i> sp.....                | 38   |
| 6.4. Bactérias resistentes a cobre associadas à <i>S. auriculata</i> .....                          | 38   |
| 6.5. Efeito de <i>Enterobacter</i> sp. em <i>Salvinia auriculata</i> sob o estresse por cobre ..... | 40   |
| 7. DISCUSSÃO .....  | 43   |
| 8. CONCLUSÃO .....  | 49   |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 50   |

## RESUMO

A produção contínua de resíduos leva a contaminação das águas doces por metais, o que representa sérias ameaças à saúde humana e aos demais seres vivos. Entre estes encontra-se o cobre, que é um micronutriente essencial, porém em elevada concentração torna-se tóxico para os organismos. O uso de plantas aquáticas como *Salvinia auriculata* tem sido proposto para biorremediação de ambientes contaminados por metal. Associadas com essas plantas são encontradas bactérias, que exibem diferentes mecanismos para promover o crescimento vegetal, entre eles está a proteção contra o estresse abiótico. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à *S. auriculata* e resistentes a cobre com potencial de promover a biorremediação deste metal em áreas contaminadas. Inicialmente, realizou-se o isolamento das bactérias associadas à planta em meio de cultura DYGS. Foram obtidas 18 bactérias identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA: *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp, *Bacillus toyonensis*, *Curtobacterium* sp. (4 cepas), *Enterobacter* sp. (2 cepas), *Pseudomonas aeruginosa* (2 cepas), *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas fulva*, *Siccibacter colletis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (2 cepas) e *Stenotrophomonas* sp. Em seguida, avaliou-se produção de compostos indólicos pelo método de Salkowsky, fixação biológica de nitrogênio com meios semi-sólidos NFb e JNFb, e solubilização de fosfato em meio Basal com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Como resultado, oito isolados se destacaram na produção de compostos indólicos, 12 fixaram nitrogênio atmosférico e 17 foram capazes de solubilizar fosfato. O isolado *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 obteve melhores resultados *in vitro* para as características de promoção e foi selecionado para inóculo em *S. auriculata*. Neste sentido, foram realizados 2 tratamentos mantidos em casa de vegetação por 4 dias: 1) planta (controle) e 2) planta + bactéria, sendo observado ao final que a planta inoculada apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de biomassa vegetal fresca (29,6%). Posteriormente, realizou-se ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os 18 isolados com  $\text{CuSO}_4$  nas concentrações de 1 a 9 mmol. Quatro bactérias foram mais resistentes ao metal: duas cepas de *P. aeruginosa* 3.1.3.0.X.2 e 3.1.3.0.X.6 (CIM: 7 mmol), *R. radiobacter* 3.1.3.0.X.12 (CIM: 5 mmol) e *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 (CIM: 9 mmol). No ensaio com metal em meio líquido com essas bactérias, observou-se que *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 foi a cepa mais resistente. Então, um segundo ensaio com planta foi realizado utilizando o metal, sendo o inóculo da bactéria feito no 1º dia e adicionado o metal no 5º dia, totalizando 8 dias de experimento e 4 tratamentos: 1) planta, 2) planta + bactéria resistente, 3) planta + 0,01 mmol de  $\text{CuCl}_2$  e 4) planta + bactéria resistente + 0,01 mmol de  $\text{CuCl}_2$ . A bactéria inoculada nas plantas na presença de cobre e comparada as plantas não inoculadas na presença do metal levou a um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de biomassa fresca (51%), biomassa seca (62%), teores de clorofila a (18%), clorofila b (47%) e carotenóides (4,69%). O extravasamento de eletrólitos foi maior no tratamento 3 em relação ao tratamento 4 inoculado com o micro-organismo. Assim, foi possível encontrar bactérias promotoras do crescimento vegetal resistentes a cobre associadas à *Salvinia auriculata* e obter um isolado candidato a tornar processos de biorremediação de efluentes contaminados por cobre mais eficientes.

**Palavras-Chave:** Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal, Interações Planta-Bactéria, Biorremediação, Metal.

## ABSTRACT

Continuous waste production leads to freshwater contamination by metals, which pose serious threats to human health and other living things. Among these is copper, which is an essential micronutrient, but in high concentration it becomes toxic to organisms. The use of aquatic plants such as *Salvinia auriculata* has been proposed for bioremediation of metal contaminated environments. Associated with these plants are bacteria, which exhibit different mechanisms to promote plant growth, including protection against abiotic stress. Thus, the objective of the present work was to identify plant growth promoting bacteria associated with *S. auriculata* and copper resistant with potential to promote the bioremediation of this metal in contaminated areas. Initially, plant-associated bacteria were isolated in DYGS culture medium. Eighteen bacteria identified by sequencing of the 16S rRNA gene were obtained: *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Bacillus toyonensis*, *Curtobacterium* sp. (4 strains), *Enterobacter* sp. (2 strains), *Pseudomonas aeruginosa* (2 strains), *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas fulva*, *Siccibacter colletis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (2 strains) and *Stenotrophomonas* sp. Then, the production of indole compounds by Salkowsky method, biological nitrogen fixation with semi-solid Nfb and JNfb media, and phosphate solubilization in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Basal medium were evaluated. As a result, eight isolates excelled in the production of indolic compounds, 12 fixed atmospheric nitrogen and 17 were able to solubilize phosphate. The *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 isolate obtained better in vitro results for the promotion characteristics and was selected for inoculum in *S. auriculata*. In this sense, 2 treatments were carried out in a greenhouse for 4 days: 1) plant (control) and 2) plant + bacteria. It was observed at the end that the inoculated plant showed a significant increase ( $p \leq 0.05$ ) of plant biomass fresh (29.6%). Subsequently, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay was performed for 18 isolates with  $\text{CuSO}_4$  at concentrations of 1 to 9 mmol. Four bacteria were more resistant to the metal: two strains of *P. aeruginosa* 3.1.3.0.X.2 and 3.1.3.0.X.6 (MIC: 7 mmol), *R. radiobacter* 3.1.3.0.X.12 (MIC: 5 mmol) and *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 (MIC: 9 mmol). The in liquid medium metal assay with these bacteria, *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 was found to be the most resistant strain. Then, a second plant experiment was performed using the metal, being the bacterium inoculum made on the 1st day and the metal added on the 5th day, totaling 8 days of experiment and 4 treatments: 1) plant, 2) plant + resistant bacteria, 3) plant + 0.01 mmol  $\text{CuCl}_2$  and 4) plant + resistant bacteria + 0.01 mmol  $\text{CuCl}_2$ . Bacterial inoculated plants in the presence of copper and compared to non inoculated plants in the presence of metal led to a significant increase ( $p \leq 0.05$ ) of fresh biomass (51%), dry biomass (62%), chlorophyll a (18%), chlorophyll b (47%) and carotenoids (4.69%). Electrolyte leakage was higher in treatment 3 compared to treatment 4 inoculated with the microorganism. Thus, it was possible to find copper resistant plant growth promoting bacteria associated with *Salvinia auriculata* and to obtain an isolate candidate to make copper contaminated effluent bioremediation processes more efficient.

Key words: Plant Growth promoting Bacteria, Plant-Bacterial Interactions. Bioremediation, Metal.

## 1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de metais no ambiente aquático aumentou a partir da Revolução Industrial (JACOB *et al.*, 2017). Desse modo, os níveis de contaminantes tornaram-se excessivos, ameaçando a saúde humana e prejudicando o desenvolvimento daqueles que habitam corpos hídricos, já que metais não são degradados e podem se acumular na cadeia trófica, causando dano às células (RAJESHKUMAR *et al.*, 2018; OBREGÓN *et al.*, 2019).

Das contaminações por metal ocorridas no meio aquático, as concentrações crescentes de cobre vêm se destacando, e apesar desse metal ser um micronutriente com participação em várias reações metabólicas, em elevada concentração é tóxico para os seres vivos. O aumento de cobre no ambiente aquático ocorre devido a processos que utilizam o metal como matéria-prima, por exemplo, o cobre é muito utilizado na agricultura para fabricação de fungicidas e herbicidas (BRUNETTO *et al.*, 2014; RUBIO *et al.*, 2016). Também é aplicado como algicida em atividades domésticas para limpeza de piscina e aquário (POMPÊO, 2017), é encontrado em despejos de efluentes industriais de galvanoplastia (POMBO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2019) e atividades de mineração (de CARVALHO *et al.*, 2017).

Plantas aquáticas do gênero *Salvinia* apresentam característica fitorremediadoras e têm sido indicadas para remoção de cobre em corpos hídricos (BIZZO *et al.*, 2014; DAS *et al.*, 2016; PANFILI *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2018). A planta também já é utilizada no tratamento de efluentes (PINAFFI & SANTOS, 2019; SCHWANTES *et al.*, 2019). Por isso, pode ser considerada uma alternativa viável para uso na remoção de metais e em processos de tratamento de efluentes industriais.

Associadas com as plantas, frequentemente, são encontradas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Estas bactérias atuam por mecanismos diretos de promoção, realizando fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato e produção de fitormônios (GLICK *et al.*, 2012). Mecanismos indiretos ocorrem quando micro-organismos benéficos impedem que patógenos ou substâncias tóxicas, como os metais em elevada concentração, causem prejuízo a planta (FRAILE *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que bactérias associadas a *S. auriculata* promovam o crescimento da

planta em ambientes contaminados por cobre. No entanto, ainda pouco se conhece sobre a resposta da interação dessa planta aquática com bactérias benéficas em condições de estresse por metal. Neste sentido, o trabalho apresentado a seguir foi organizado e dividido em duas partes: Revisão Bibliográfica e Capítulo 1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à *S. auriculata* Aublet e resistentes a cobre com potencial de promover a biorremediação deste metal em áreas contaminadas.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Isolar bactérias associadas à *Salvinia auriculata*;
- 2) Caracterizar a morfologia das colônias e das células bacterianas isoladas de *S. auriculata*;
- 3) Identificar as bactérias isoladas através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- 4) Avaliar os isolados quanto à fixação biológica de nitrogênio, produção de compostos indólicos e solubilização de fosfato inorgânico;
- 5) Determinar a capacidade da promoção de crescimento vegetal da bactéria selecionada através da sua inoculação em *S. auriculata*;
- 6) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cobre nos isolados bacterianos a fim de encontrar aqueles resistentes ao metal;
- 7) Avaliar o crescimento da planta aquática *S. auriculata* inoculada com a bactéria resistente na presença de cobre.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O metal cobre

O cobre é um metal de coloração vermelha com brilho levemente opaco, localizado no grupo I-B da tabela periódica. O seu número atômico é 29 e tem massa atômica igual 63,55 u. É um metal macio, maleável e dúctil. O símbolo químico é Cu, que tem origem do latim “*cuprum*”. É um elemento natural da crosta terrestre, que pode ser encontrado naturalmente em rochas, sedimentos e corpos hídricos (RUSSEL 2004; DELMAIL *et al.*, 2011).

Em baixa concentração, o cobre é um micronutriente essencial para os organismos. Os seres humanos consomem cerca de 0,9 mg de cobre por dia, uma quantidade adequada para a maioria das suas necessidades (ANVISA 2005; ALTARELLI *et al.*, 2019). A importância biológica e funcional do cobre nos organismos vivos está relacionada com as funções metabólicas de enzimas cobre-dependentes chamadas cuproenzimas, como a citocromo c oxidase. Esta enzima catalisa reações fisiológicas importantes relacionadas com fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, coagulação sanguínea e metabolismo de ferro (SOMA *et al.*, 2018; ALTARELLI *et al.*, 2019). Nas plantas, o cobre também é um micronutriente importante no metabolismo, pois está associado com proteínas envolvidas em reações redox. Um exemplo é a plastocianina, que participa no transporte de elétrons durante as reações fotoquímicas (SHAHBAZ & PILON 2019; MIGOCKA & MALAS 2018; BOSNIĆ *et al.*, 2019). No entanto, o cobre pode ser tóxico quando em excesso, podendo induzir alterações no DNA, na integridade da membrana celular, na respiração, na fotossíntese e na atividade enzimática, o que coloca em risco a sobrevivência e causa inibição do crescimento dos seres vivos (ZVEZDANOVIC *et al.* 2007; ZHAO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2016; SAGRIPANTI 2018).

Altas concentrações de metais no meio aquático causam contaminação dos ecossistemas de água doce, que fornecem a maioria dos recursos para a vida no planeta, incluindo alimentação, meio de transporte e habitat para muitos organismos como peixes e plantas (RAO & PRABHAKAR 2011). Um dos grandes problemas enfrentados pela humanidade está relacionado à quantidade e qualidade da água prontamente disponível para abastecimento (ORGAN, 2009). Uma vez nos corpos hídricos, os metais podem ser

depositados no sedimento, absorvidos pelos organismos e acumulados nos níveis tróficos superiores (BENSON *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2013).

De acordo com órgão brasileiro responsável pela adoção de parâmetros ambientais, o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, os níveis de poluentes permissíveis no ambiente foram estabelecidos, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida. Dessa forma, a resolução CONAMA nº 357 estabelece que não se deva exceder o limite de 0,009 mg L<sup>-1</sup> de cobre dissolvido na água doce de Classe 1, que é destinada: a) ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário; d) à irrigação de hortaliças; e) e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

No Brasil, a contaminação hídrica por metal vem chamando atenção após os eventos de rompimento de barragem de rejeito de mineradoras ocorridos em Brumadinho/MG (2019) e Mariana/MG (2015). Nestas ocasiões, quilômetros de rios foram afetados, gerando um prejuízo ambiental incalculável. Estudando o rio Doce em Mariana/MG, de CARVALHO *et al.*, 2017 mostraram que as concentrações de cobre encontradas após o acidente foram 124 maiores que o valor máximo permitido pelo CONAMA para água doce de Classe 1. Neste sentido, é preciso buscar formas de tratar o ambiente e uma das alternativas é o emprego de métodos biológicos utilizando plantas aquáticas.

### **3.2. Plantas aquáticas**

Plantas aquáticas frequentemente são chamadas de macrófitas aquáticas. Nos corpos hídricos, essas plantas desempenham papéis ecológicos importantes. Podemos citar: a sua alta produtividade primária, são refúgios para animais invertebrados e peixes, realizam absorção e liberação de nutrientes na coluna d'água e reforçam o sedimento, reduzindo a erosão (POMPÊO, 2008; GIBBS *et al.*, 2012 ).

*Salvinia auriculata* Aublet. (Figura 1) é uma pteridófita pertencente à ordem Salviniales, cujas plantas apresentam tamanho reduzido e flutuam na superfície da água. O gênero *Salvinia* possui aspecto morfológico caracterizado por folhas com filotaxia verticilada. Na planta, em cada nó ocorrem três folhas, sendo duas flutuantes com longos

e abundantes tricomas e a terceira folha é submersa, assemelhando-se a uma raiz. Nessa folha submersa são encontradas pequenas bolsas (esporocarpos), que contém vários leptosporângios, permitindo classificá-las como folhas e não raízes (GONÇALVES 2007; RAVEN 2007).



**Figura 1:** A planta aquática *Salvinia auriculata* Aublet. Adaptado de Nachtrieb, J. G. (2012).

Com ampla distribuição geográfica, *Salvinia auriculata* é comumente encontrada em águas doces (HENRY-SILVA *et al.*, 2008). Em condições favoráveis, a planta rapidamente se dissemina por propagação vegetativa, podendo duplicar sua biomassa em 3 a 5 dias e colonizar extensas superfícies de água doce em tempo reduzido (ESTEVES, 2011; POTT e POTT, 2000).

As plantas do gênero *Salvinia* têm sido estudadas quanto à resistência para vários metais (Tabela 1). Trabalhos recentes têm mostrado que a planta é resistente a cobre, podendo ser empregada na remoção deste metal. Segundo FREITAS *et al.*, (2018), *Salvinia biloba* apresentou potencial fitorremediador em ambientes aquáticos contaminados com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Cu. DAS *et al.*, (2016) observaram que *S. cucullata* também apresentou atividade fitorremediadora  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  de Cu. e BIZZO *et al.*, (2014), estudando *S. auriculata*, mostraram que a planta tem um mecanismo eficiente contra o estresse causado por Cu, que parece ser mediado por respostas antioxidantes.

**Tabela1.** Resistência a metais em *Salvinia*.

| <b>Espécies</b>              | <b>Metais</b>          | <b>Referências</b>  |
|------------------------------|------------------------|---|
| <i>Salvinia biloba Raddi</i> | Pb, Cu, Hg             | LORÍA <i>et al.</i> (2019); de FREITAS <i>et al.</i> (2018); CASAGRANDE <i>et al.</i> (2018); ZEVALLOS <i>et al.</i> (2018).                              |
| <i>Salvinia rotundifolia</i> | Cr                     | PONCE <i>et al.</i> (2019).   |
| <i>Salvinia molesta</i>      | Hg, Cu, Cr, Cd, Pb, As | IRAWANTO (2018); da SILVA <i>et al.</i> (2018).   |
| <i>Salvinia minima Baker</i> | Pb, Cd, Ni, Pb, Zn, Cr | PONCE <i>et al.</i> (2019); LEAL-ALVARADO <i>et al.</i> (2018); IHA & BIANCHINI (2015); PRADO <i>et al.</i> (2015).                                       |
| <i>Salvinia auriculata</i>   | Cu, Cd, Cr, Pb, Zn     | PANFILI <i>et al.</i> (2017); BIZZO <i>et al.</i> (2014); WOLFF <i>et al.</i> (2012); ESPINOZA-QUIÑONES <i>et al.</i> (2009); WOLFF <i>et al.</i> (2009). |

Estudos de interação entre plantas e micro-organismos têm demonstrado o papel de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na proteção contra estresses abióticos, incluindo o estresse causado por metais (JIAN *et al.*, 2019; SHAMEER & PRASAD 2018; ROJAS *et al.*, 2014). No entanto, a maioria dos estudos é em solo, no ambiente terrestre. A interação entre BPCV e plantas aquáticas ainda é pouco conhecida (SAHA *et al.*, 2016; ISHIZAWA *et al.*, 2017). Mas poderia a sobrevivência de plantas aquáticas em ambientes contaminados estar também relacionada à presença desses micro-organismos, melhorando o desenvolvimento vegetal e auxiliando na resistência a metais.

### **3.3. Bactérias benéficas**

Na interação entre planta e micro-organismos, a planta oferece um ambiente protegido para as bactérias subsistirem. Ao mesmo tempo, esses micro-organismos produzem e liberam compostos que podem estimular o crescimento, anulando ou diminuindo os efeitos nocivos de substâncias tóxicas nas plantas. No entorno das raízes, as plantas também liberam exsudados que atraem as bactérias, podendo ainda ser utilizados como fonte de energia pelos micro-organismos (MESA *et al.*, 2017; GLICK *et al.*, 2014).

As Bactérias Promotoras Crescimento Vegetal (BPCV) são assim chamadas porque dispõem de mecanismos que ajudam no desenvolvimento da planta. Elas se destacam, principalmente, pelo seu potencial agrícola, promovendo o crescimento vegetal e reduzindo o uso de fertilizantes e pesticidas (De ANDRADE *et al.*, 2019).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um mecanismo de promoção do crescimento vegetal que possibilita a biossíntese de macromoléculas essenciais como proteínas e ácidos nucleicos (BALDANI *et al.*, 2014). A maior fonte de nitrogênio na natureza está na forma de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), que não é assimilado diretamente pelas plantas. Bactérias chamadas de diazotróficas são capazes de realizar a FBN, que é o processo biológico pelo qual o  $N_2$  é convertido em amônia ( $NH_3$ ) através da enzima nitrogenase, permitindo que este elemento seja assimilado pelos vegetais (GLICK *et al.*, 2012).

A produção de fitormônios é mais uma característica das Bactérias Promotoras Crescimento Vegetal (BPCV). O grupo das auxinas, por exemplo, representa um hormônio vegetal de extrema importância para o desenvolvimento da planta, pois está envolvido em diferentes fases do crescimento, tais como: iniciação das raízes, alongamento e divisão celular, diferenciação de tecidos vasculares, dominância apical, senescência em frutos e no florescimento (DAVIES *et al.*, 2010).

O fósforo (P) é um elemento essencial para as plantas, a deficiência deste elemento pode causar a restrição do crescimento das plantas (WEI *et al.*, 2016). As bactérias solubilizadoras de fósforo podem transformar o P insolúvel em formas solúveis por meio da acidificação, quelação e a formação de substâncias poliméricas, o que pode estar relacionado com a produção de ácidos orgânicos (DELVASTO *et al.*, 2006).

No âmbito dos mecanismos indiretos, que não influenciam diretamente no crescimento do vegetal, têm-se as bactérias com ação contra fitopatógenos (PANDEY *et al.*, 2019; MISHRA *et al.*, 2018) e as bactérias biorremediadoras. De modo respectivo, estas bactérias atuam promovendo o crescimento, ao reduzirem a ação do patógeno e a biodisponibilidade de compostos tóxicos ao vegetal (MA *et al.*, 2016).

Recentemente, estudos têm descrito a microbiota de plantas aquáticas. Alguns trabalhos envolvendo isolamento e inoculação de bactérias em macrófitas aquáticas já constataram a promoção do crescimento vegetal mediado por micro-organismos

(ISHIZAWA *et al.*, 2017; SAHA *et al.*; 2016) . Isolados produtores de compostos indólicos foram, inclusive, recomendados para o uso como biofertilizantes (ORTEGA-ACOSTA *et al.*, 2015).

Alguns estudos avaliaram mecanismos indiretos das BPCV em macrófitas (EL-DEEB *et al.*, 2012). Para biorremediação de metais, por exemplo, CHAKRABORTY *et al.*, (2013) verificaram que a remoção de Cr (VI) na planta aquática *Pistia* em associação com *Bacillus calcis* GXBC foi superior ao controle não inoculado. Dessa forma, tem sido observado que a associação de BPCV resistentes a metais com plantas aquáticas remediadoras pode trazer novas alternativas para a descontaminação de ambientes.

### 3.4. Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia “amiga” do ambiente (do inglês, *ecofriendly*), que utiliza seres vivos para degradar, transformar, remover ou imobilizar contaminantes (MANI & KUMAR., 2014). Plantas remediadoras de metais possuem alta resistência ao poluente, boa capacidade de absorção de metais, apresentam elevada taxa de crescimento, rápida produção de biomassa, têm capacidade de desenvolverem-se em diferentes ambientes e são de fácil amostragem (REZANIA *et al.*, 2016). *S. auriculata* é, portanto, uma candidata a fitorremediação.

Para desempenharem tais funções, as plantas interagem com os metais do ambiente por diferentes mecanismos. São exemplos: a fitoextração, onde as raízes das plantas absorvem os metais, podendo translocá-los para as outras partes da planta (MAHAR *et al.*, 2016); a fitoestabilização, que reduz a biodisponibilidade dos metais, de modo que as plantas conseguem imobilizá-los (KHALID *et al.*, 2017); a fitovolatilização, quando o composto é absorvido pela planta, translocado e liberado pela superfície do tronco e das folhas (LIMMER & BURKEN, 2016; SAKAKIBARA *et al.*, 2010).

A biorremediação também pode ser classificada em dois tipos: *in situ* ou *ex situ*. Na biorremediação *in situ*, os contaminantes são tratados diretamente no local, enquanto na biorremediação *ex situ* os contaminantes são coletados e tratados em outra área (WADGAONKAR *et al.*, 2019; BALSEIRO-ROMERO *et al.*, 2019; SHAHNAWAZ *et al.*, 2019). Neste contexto tem-se a bioaugmentação, quando micro-organismos são adicionados para melhorar o metabolismo de substâncias tóxicas, como os metais. Esta

técnica pode ser utilizada em estações de tratamento de águas residuais industriais melhorando a eficiência de remoção destes compostos (RAPER *et al.*, 2018).

Os micro-organismos da mesma forma que as plantas exibem mecanismos de remediação e podem auxiliar nesse processo. Dentre esses mecanismos, tem-se: a bioissorção, a adsorção, o efluxo, o influxo e a bioacumulação (ETESAMI 2018). Na bioissorção ocorre o sequestro extracelular de metais na parede celular da bactéria, com a finalidade de restringir a entrada dos compostos no interior da célula. Isso se dá pela presença de grupos específicos carregados negativamente que se associam aos elementos, imobilizando-os na parede celular (CHOÍNSKA-PULIT *et al.*, 2018). Outro mecanismo é a adsorção, que tem o sequestro extracelular de metais dado por ligação ao EPS, uma camada composta de expolissacarídeos, proteínas, lipídios e outros constituintes de baixo peso molecular, que neutralizam os efeitos tóxicos dos metais fora da célula (KUSHWAHA *et al.*, 2017). O efluxo ocorre por meio da manutenção da homeostase intracelular controlada por ATPases de membrana envolvidas no transporte do metal para fora da membrana celular bacteriana (SOLIOZ., 2018). O influxo refere-se ao acúmulo de metais no citoplasma para evitar a exposição de compostos celulares essenciais, onde as bactérias podem tornar os elementos tóxicos não biodisponíveis através da ligação desses com metalotioneínas (MTs) (NAIK *et al.*, 2012), por exemplo.

Assim, o uso de BPCV resistentes a metais constitui uma tecnologia importante para fitorremediação, pois permite ganhos na produção de biomassa, bem como na tolerância das plantas aos contaminantes. Isto pode ser feito em estações de tratamento de efluentes através de inoculantes aplicados em espécies de plantas acumuladoras de metais para melhorar tanto o crescimento quanto fornecer proteção às plantas, garantindo maior eficiência no processo de remoção dos metais (BABU *et al.*, 2015; IRAWATI *et al.*, 2017; WANG, *et al.*, 2018).

#### 4. Referências bibliográficas

- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Altarelli, M., Ben Hamouda, N., Schneider, A., & Berger, M. M. (2019). Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. *Nutrition in Clinical Practice*.
- Babu, A. G., Shea, P. J., Sudhakar, D., Jung, I. B., & Oh, B. T. (2015). Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*, 151, 160-166.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384 (1-2), 413-431.
- Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., Kidd, P. S., Lu-Chau, T. A., Gkorezis, P., Vangronsveld, J., & Casares, J. J. (2019). Modelling the *ex situ* bioremediation of diesel-contaminated soil in a slurry bioreactor using a hydrocarbon-degrading inoculant. *Journal of Environmental Management*, 246, 840-848.
- Benson, R., Conerly, O. D., Sander, W., Batt, A. L., Boone, J. S., Furlong, E. T., & Simmons, J. E. (2017). Human health screening and public health significance of contaminants of emerging concern detected in public water supplies. *Science of The Total Environment*, 579, 1643-1648.
- Bizzo, A. L. T., Intorne, A. C., Gomes, P. H., Suzuki, M. S., & Esteves, B. D. S. (2014). Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26(3), 268-277.
- Bosnić, D., Nikolić, D., Timotijević, G., Pavlović, J., Vaculík, M., Samardžić, J., & Nikolić, M. (2019). Silicon alleviates copper (Cu) toxicity in cucumber by increased Cu-binding capacity. *Plant and Soil*, 1-13.
- Brunetto, G., Miotto, A., Ceretta, C. A., Schmitt, D. E., Heinzen, J., de Moraes, M. P., & Girotto, E. (2014). Mobility of copper and zinc fractions in fungicide amended vineyard sandy soils. *Archives of Agronomy and Soil Science* 60(5), 609-624.
- Casagrande, G. C. R., dos Reis, C., Arruda, R., de Andrade, R. L. T., & Battirola, L. D. (2018). Bioaccumulation and Biosorption of Mercury by *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(5), 166.
- Chakraborty, R., Mitra, A. K., & Mukherjee, S. (2013). Synergistic chromium bioremediation by Water Lettuce *Pistia* and bacteria (*Bacillus cereus* GXBC-1) interaction. *J Biol Chem Res*, 30(2), 421-431.
- Choińska-Pulit, A., Sobolczyk-Bednarek, J., & Łaba, W. (2018). Optimization of copper, lead and cadmium biosorption onto newly isolated bacterium using a Box-Behnken design. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 275-283.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE CONAMA. (2005). Resolução nº 357/05. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. *Diário Oficial da União*, (53).
- d'Halluin, M., Rull-Barrull, J., Bretel, G., Labrugère, C., Le Grogneq, E., & Felpin, F. X. (2017). Chemically modified cellulose filter paper for heavy metal remediation in water. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(2), 1965-1973.
- da Silva, A. A., de Oliveira, J. A., de Campos, F. V., Ribeiro, C., dos Santos Farnese, F., & Costa, A. C. (2018). Phytoremediation potential of *Salvinia molesta* for arsenite contaminated water: role of antioxidant enzymes. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 30(4), 275-286.
- Das, S., & Goswami, S. (2017). Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1363-1371.

de Andrade, F. M., de Assis Pereira, T., Souza, T. P., Guimarães, P. H. S., Martins, A. D., Schwan, R. F., & Dória, J. (2019). Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. *Microbiological Research*, 223, 120-128.

de Carvalho, M. S., Ribeiro, K. D., Moreira, R. M., & de Almeida, A. M. (2017). Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis*, 1(3), 37-41.

de Freitas, F., Battirola, L. D., & de Andrade, R. L. T. (2018). Adsorption of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> ions by *Pontederia rotundifolia* (Lf)(Pontederiaceae) and *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae) Biomass. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229 (11), 349.

Delmail, D., Labrousse, P., Hourdin, P., Larcher, L., Moesch, C., & Botineau, M. (2011). Differential responses of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae) organs to copper: physiological and developmental approaches. *Hydrobiologia*, 664(1), 95-105.

Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Igual, J. M., Muñoz, J. A., González, F., & García, C. (2006). Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2645-2654.

El-Deeb, B., Gherbawy, Y., & Hassan, S. (2012). Molecular characterization of endophytic bacteria from metal hyperaccumulator aquatic plant *Eichhornia crassipes* and its role in heavy metal removal. *Geomicrobiology Journal*, 29(10), 906-915.

Espinoza-Quiñones, F. R., Módenes, A. N., Thomé, L. P., Palácio, S. M., Trigueros, D. E. G., Oliveira, A. P., & Szymanski, N. (2009). Study of the bioaccumulation kinetic of lead by living aquatic macrophyte *Salvinia auriculata*. *Chemical Engineering Journal*, 150(2-3), 316-322.

Esteves, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

Estrella-Gómez, N. E., Sauri-Duch, E., Zapata-Pérez, O., & Santamaría, J. M. (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb<sup>2+</sup> damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 188-194.

Etesami, H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 175-191.

Freitas, F., Lunardi, S., Souza, L. B., Von der Osten, J. S. C., Arruda, R., Andrade, R. L. T., & Battirola, L. D. (2018). Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(1), 133-139.

Gao, J., Zhao, J., Dong, C., Wu, L., & Hu, P. (2018). Remediation of metal contaminated paddy soils by chemical washing with FeCl<sub>3</sub> and citric acid. *Journal of Soils and Sediments*, 18(3), 1020-1028.

Gibbs, H., Gurnell, A., Heppell, K., & Spencer, K. (2012, April). Macrophytes: ecosystem engineers in UK urban rivers. In *EGU General Assembly Conference Abstracts* (Vol. 14, p. 490).

Glick, B. R. (2012). *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica, 2012.

Gonçalves, E. G., & Lorenzi, H. J. (2007). *Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

Henry-Silva, G. G., Camargo, A. F., & Pezzato, M. M. (2008). Growth of free-floating aquatic macrophytes in different concentrations of nutrients. *Hydrobiologia*, 610(1), 153.

Iaccarino, M. (2019). Water, population growth and contagious diseases. *Water*, 11(2), 386.

Iha, D. S., & Bianchini Jr, I. (2015). Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 929-935.

Irawanto, R. (2018, October). Phytomonitoring of heavy metal from aquatic plants collected in Purwodadi Botanic Garden. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2019, No. 1, p. 040015). AIP Publishing.

Irawati, W., Parhusip, A. J. N., Sopiah, N., & Tnunay, J. A. (2017). The Role of Heavy Metals-Resistant Bacteria *Acinetobacter* sp. in Copper Phytoremediation using *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *KnE Life Sciences*, 3(5), 208-220.

Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., & Ike, M. (2017). Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 62.

Jacob, J. M., Karthik, C., Saratale, R. G., Kumar, S. S., Prabakar, D., Kadirvelu, K., & Pugazhendhi, A. (2018). Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *Journal of Environmental Management*, 217, 56-70.

Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., & Li, Z. (2019). Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. *PeerJ*, 7, e 6875.

Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247-268.

Kushwaha, A., Rani, R., Kumar, S., Thomas, T., David, A. A., & Ahmed, M. (2017). A new insight to adsorption and accumulation of high lead concentration by exopolymer and whole cells of lead-resistant bacterium *Acinetobacter junii* L. Pb1 isolated from coal mine dump. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 10652-10661.

Leal-Alvarado, D. A., Estrella-Maldonado, H., Sáenz-Carbonell, L., Ramírez-Prado, J. H., Zapata-Pérez, O., & Santamaría, J. M. (2018). Genes coding for transporters showed a rapid and sharp increase in their expression in response to lead, in the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 1056-1064.

Limmer, M., & Burken, J. (2016). Phytovolatilization of organic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 50 (13), 6632-6643.

Lizieri, C., Aguiar, R., & Kuki, K. N. (2011). Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrrhiza*. *Rodriguésia*, 62(4), 909-917.

Loría, K. C., Emiliani, J., Bergara, C. D., Herrero, M. S., Salvatierra, L. M., & Pérez, L. M. (2019). Effect of daily exposure to Pb-contaminated water on *Salvinia biloba* physiology and phytoremediation performance. *Aquatic Toxicology*, 210, 158-166.

Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q. & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 111-121.

Mani, D., & Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 843-872.

Mesa, V., Navazas, A., González-Gil, R., González, A., Weyens, N., Lauga, B., & Peláez, A. I. (2017). Use of endophytic and rhizosphere bacteria to improve phytoremediation of arsenic-contaminated industrial soils by autochthonous *Betula celtiberica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(8), e 03411-16.

Migocka, M., & Malas, K. (2018). Plant responses to copper: molecular and regulatory mechanisms of copper uptake, distribution and accumulation in plants. In *Plant Micronutrient Use Efficiency* (pp. 71-86). Academic Press.

Mishra, A., Singh, S. P., Mahfooz, S., Bhattacharya, A., Mishra, N., Shirke, P. A., & Nautiyal, C. S. (2018). Bacterial endophytes modulates the withanolide biosynthetic pathway and physiological performance in *Withania somnifera* under biotic stress. *Microbiological Research*, 212, 17-28.

- Nachtrieb, J. G. (2014). Mass-rearing *Cyrtobagous salviniae* for biological control of giant *Salvinia*: field release implications. *J. Aquat. Plant Manage*, 52, 22-26.
- Naik, M.M., Shamim, K., Dubey, S.K., 2012. Biological characterization of lead resistant bacteria to explore role of bacterial metallothionein in lead resistance. *Current Science* 103, 1-3.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Obregón, P. L., Quiñones, F. R. E., da Silva, E. B., & Junior, C. C. (2019). Elevadas concentrações de metais em águas do córrego São José, Cascavel (PR), e possíveis riscos à saúde. *Saúde e Pesquisa*, 12(1), 51-61.
- Organ, U. E. S. C. (2009). The United Nations world water development report 3: Water in a Changing World.
- Ortega-Acosta, O., Rodriguez-Tovar, A. V., López-López, E., & Rodríguez-Tovar, A. (2015). Characterization of indole acetic acid endophyte producers in autochthonous *Lemna gibba* plants from Xochimilco Lake. *African Journal of Biotechnology*, 14(7), 604-611.
- Pandey, P. K., Samanta, R., & Yadav, R. N. S. (2019). Inside the plant: addressing bacterial endophytes in biotic stress alleviation. *Archives of Microbiology*, 201(4), 415-429.
- Panfili, I., Bartucca, M. L., Ballerini, E., & Del Buono, D. (2017). Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. *Science of the Total Environment*, 601, 1263-1270.
- Pinaffi, C. D., & Santos, C. H. (2019). Volatilization of ammonia in systems of treatment of swine manure with aquatic macrophytes. *Brazilian Journal of Biology*, 79(3), 423-431.
- Pombo, F. R., Dutra, A. J. B., Motta, A., Duek, E., Dias, T., & Souza, D. (2008). Eletrorecuperação de cobre e oxidação de cianeto de efluentes cianídricos diluídos gerados por unidade de galvanoplastia. *Revista Matéria* vol, 13 (2).
- Pompêo, M. (2008). Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), 5.
- Pompêo, M. (2017). O Controle da Flora e Fauna Aquáticas pela Resolução CONAMA 467: Considerações Sobre a Normativa Brasileira. *Revista do Departamento de Geografia*, 33, 24-35.
- Ponce, S. C., Prado, C., Pagano, E., Prado, F. E., & Rosa, M. (2019). Effect of pH on Cr (III) accumulation, biomass production, and phenolic profile in 2 *Salvinia* species. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(1), 167-176.
- Prado, C., Prado, F. E., Pagano, E., & Rosa, M. (2015). Differential effects of Cr (VI) on the ultrastructure of chloroplast and plasma membrane of *Salvinia minima* growing in summer and winter. Relationships with lipid peroxidation, electrolyte leakage, photosynthetic pigments, and carbohydrates. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226 (2), 8.
- Rajeshkumar, S., Liu, Y., Zhang, X., Ravikumar, B., Bai, G., & Li, X. (2018). Studies on seasonal pollution of heavy metals in water, sediment, fish and oyster from the Meiliang Bay of Taihu Lake in China. *Chemosphere*, 191, 626-638.
- Ramos, P., B., Boina, R. F., & Paiano, M. S. (2019). Casca de maracujá como adsorvente de íons metálicos em efluente de galvanoplastia. *Brazilian Journal of Development*, 5(6), 6076-6091.
- Rao, L. N., & Prabhakar, G. (2011). Removal of heavy metals by biosorption-an overall review. *J Eng Res Stud*, 2(4), 17-22.
- Raper, E., Stephenson, T., Anderson, D. R., Fisher, R., & Soares, A. (2018). Industrial wastewater treatment through bioaugmentation. *Process Safety and Environmental Protection*, 118, 178-187.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2007). *Biologia Vegetal*, 7ª edição, Rio de Janeiro.
- Rezania, S., Taib, S. M., Din, M. F. M., Dahalan, F. A., & Kamyab, H. (2016). Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 587-599.

- Rojas-Tapias, D. F., Bonilla, R., & Dussán, J. (2014). Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(12), 2232.
- Rubio, A. J., Bergamasco, R., & Yamaguchi, N. U. (2016). Remoção do herbicida glifosato utilizando carvão ativado impregnado com compostos metálicos de prata e cobre para a melhoria da qualidade da água. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 20(1), 450-455.
- Russel, J. B. (2004). *Química Geral*, 2<sup>a</sup> Edição, Vol. 1 e 2.
- Sagripani, J. L. (2018). DNA damage mediated by metal ions with special reference to copper and iron. In *Metal ions in biological systems* (pp. 179-209). Routledge.
- Saha, C., Mukherjee, G., Agarwal-Banka, P., & Seal, A. (2016). A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. *Plant Biology*, 18(6), 938-946.
- Sakakibara, M., Watanabe, A., Inoue, M., Sano, S., & Kaise, T. (2010, January). Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from As contaminated soils by *Pteris vittata*. In *Proceedings of the annual international conference on soils, sediments, water and energy* (Vol. 12, No. 1, p. 26).
- Schwantes, D., Gonçalves Jr, A. C., Schiller, A. D. P., Manfrin, J., Campagnolo, M. A., & Veiga, T. G. (2019). *Salvinia auriculata* in post-treatment of dairy industry wastewater. *International Journal of Phytoremediation*, 1-7.
- Shahbaz, M., & Pilon, M. (2019). Conserved Cu-MicroRNAs in *Arabidopsis thaliana* Function in Copper Economy under Deficiency. *Plants*, 8(6), 141.
- Shahnawaz, M., Sangale, M. K., & Ade, A. B. (2019). Ex Situ Bioremediation Technology for Plastic Degradation. In *Bioremediation Technology for Plastic Waste* (pp. 77-83). Springer, Singapore.
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant growth Regulation*, 84(3), 603-615.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2(1), 587.
- Sharma, S., Tiwari, S., Hasan, A., Saxena, V., & Pandey, L. M. (2018). Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *3 Biotech*, 8(4), 216.
- Solioz, M. (2018). Copper Homeostasis in Gram-Negative Bacteria. In *Copper and Bacteria* (pp. 49-80). Springer, Cham.
- Solioz, M., & Stoyanov, J. V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 183-195.
- Soma, S., Latimer, A. J., Chun, H., Vicary, A. C., Timbalia, S. A., Boulet, A., & Gitlin, J. D. (2018). Elesclomol restores mitochondrial function in genetic models of copper deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(32), 8161-8166.
- Tello Zevallos, W., Matías Salvatierra, L., Loureiro, D. B., Morató Farreras, J., & Martín Pérez, L. (2018). Evaluation of the autochthonous free-floating macrophyte *Salvinia biloba* Raddi for use in the phytoremediation of water contaminated with lead. *Desalination and Water Treatment*, 103, 282-289.
- Wadgaonkar, S. L., Ferraro, A., Nancharaiah, Y. V., Dhillon, K. S., Fabbricino, M., Esposito, G., & Lens, P. N. (2019). *In situ* and *ex situ* bioremediation of seleniferous soils from northwestern India. *Journal of Soils and Sediments*, 19(2), 762-773.

- Wang, L., Lin, H., Dong, Y., He, Y., & Liu, C. (2018). Isolation of vanadium-resistance endophytic bacterium PRE01 from *Pteris vittata* in stone coal smelting district and characterization for potential use in phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 341, 1-9.
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., & Wei, Z. (2016). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*, 247, 190-199.
- Wolff, G., Assis, L. R., Pereira, G. C., Carvalho, J. G., & Castro, E. M. (2009). Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. *Planta Daninha*, 27(1), 133-137.
- Wolff, G., Pereira, G. C., Castro, E. M., Louzada, J., & Coelho, F. F. (2012). The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 71-77.
- Yang, Y., Ma, T., Ding, F., Ma, H., Duan, X., Gao, T., & Yao, J. (2017). Interactive zinc, iron, and copper-induced phytotoxicity in wheat roots. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 395-404.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y., & Duo, L. (2010). Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2), 7-11.
- Zvezdanović, J., Marković, D., & Nikolić, G. (2007). Different possibilities for the formation of complexes of copper and zinc with chlorophyll inside photosynthetic organelles: chloroplasts and thylakoids. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(11).

## CAPÍTULO 1

### 5.1. Introdução

A poluição do ambiente aquático causada por metais tem sido considerada um grave problema ambiental. Os metais são elementos estáveis e não biodegradáveis, que podem se bioacumular ao longo da cadeia trófica, causando sérios danos aos organismos (DIEZ *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2016). O cobre é um micronutriente essencial para eucariotos e procariotos, que possui importância biológica relacionada às funções metabólicas (ALTARELLI *et al.*, 2019). Todavia, em altas concentrações é um elemento tóxico, que afeta negativamente a saúde humana, as plantas e o ambiente, induzindo alterações no DNA, na integridade da membrana celular e na fotossíntese (SAGRIPANTI 2018; YANG *et al.*, 2016). Por ser um metal muito consumido, é fonte recorrente de contaminação dada através de aplicações de fungicidas, algicidas, fertilizantes, pela lixiviação da mineração e pelo lançamento de águas residuais não tratadas (de CARVALHO *et al.*, 2018; BRUNETTO *et al.*, 2014; FABRIZIO *et al.*, 2012; KABATA-PENDIAS 2011; ALLOWAY 2008).

Algumas espécies de plantas aquáticas acumulam metais, sendo conhecidas como fitorremediadoras. Devido às características naturais, determinadas macrófitas aquáticas também têm a capacidade de aumentar a biomassa em um curto período de tempo, sendo eficientes na remoção de nutrientes e de metais da água. Logo, tais espécies de planta têm potencial de aplicação para o tratamento de água (de SOUZA *et al.*, 2019; TATAR *et al.*, 2019; FAVAS *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2018). Macrófitas aquáticas do gênero *Salvinia* (Família Salvinaceae) fazem parte desse grupo de plantas e são descritas como resistentes a cobre (FREITAS *et al.* 2018; LIU *et al.*, 2018; PANFILI *et al.*, 2017; DAS *et al.*, 2016; DONATUS., 2016; BIZZO *et al.* 2014) e a outros metais, como manganês, chumbo, cádmio, níquel, cromo e mercúrio (LORÍA *et al.*, 2019; CASAGRANDE *et al.*, 2018; FILYAROVSKAYA *et al.*, 2017; SITARSKA *et al.*, 2016; PRADO *et al.*, 2015; ESTRELLA-GÓMEZ *et al.*, 2012; WOLFF *et al.*, 2012; LIZIERI *et al.*, 2011).

Algumas aplicações têm sido descritas para *Salvinia*. Recentemente, a planta foi estudada como matéria-prima para produção de biogás (SYAICHURROZI, 2018; BHUI *et al.*, 2018; SYAICHURROZI *et al.*, 2018), de bioetanol (GUPTA *et al.*, 2018; MUBARAK, *et*

al. 2017) e como fertilizante orgânico (HUSSAIN *et al.*, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2017). Somado a isso, tem sido utilizada em sistemas de tratamento de águas residuais, que são destaque pelo baixo custo, menor agressão ao ambiente e, eficiente na mitigação de contaminantes no ecossistema aquático (da SILVA *et al.*, 2018; NG *et al.*, 2017; CHANDANSHIVE *et al.*, 2016; DAS & MAZUMDAR, 2016; IHA & BIANCHINI *et al.*, 2015).

*Salvinia auriculata* é uma espécie de pequenas plantas aquáticas flutuantes que crescem muito rápido, principalmente, sob condições favoráveis de nitrogênio e fósforo (JAMPEETONG *et al.*, 2012; ESTEVES *et al.*, 1999). Por seu tamanho reduzido e facilidade de cultivo, as plantas do gênero *Salvinia* vêm se tornando modelos de estudos de macrófitas aquáticas. Inclusive, análises genômicas de caracterização molecular dessas plantas têm avançado (LEAL-AVARADO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2016).

Como a maioria dos organismos pluricelulares, *S. auriculata* deve ser colonizada por micro-organismos, apesar de não haver estudos de isolamento bacteriano a partir dessa planta. Possivelmente, esses micro-organismos têm efeito significativo no crescimento vegetal como ocorre no ambiente terrestre, onde são amplamente reconhecidas interações simbióticas entre plantas e micro-organismos (ROSIER *et al.*, 2018; SANTOYO *et al.*, 2016; FRAILE *et al.*, 2015). Um exemplo são bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), que estimulam o desenvolvimento da planta hospedeira, aumentando a aquisição de nutrientes e/ou aliviando estresses bióticos e abióticos (SHAMEER *et al.*, 2018; PANDE *et al.*, 2017; NAQQASH *et al.*, 2016; VURUKONDA *et al.*, 2015).

Muitos trabalhos já foram realizados para isolar e caracterizar bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) de importantes culturas agrícolas (SHABANAMOL *et al.*, 2018; DÍAZ *et al.*, 2016; MANZLOOR *et al.*, 2016; MAJEED *et al.*, 2015; QAISRANI *et al.*, 2014). Todavia, o estudo de BPCV associadas às plantas aquáticas é recente. Os experimentos de ISHIZAWA *et al.* (2017), por exemplo, mostraram que houve aumento na produção de biomassa vegetal da macrófita aquática *Lemna minor* quando as comunidades bacterianas foram co-cultivadas com a planta. SAHA *et al.* (2016) estudaram *Typha angustifolia* e isolaram micro-organismos endofíticos da macrófita. Quando inoculados em arroz, estes isolados promoveram o crescimento vegetal. No trabalho de ORTEGA-ACOSTA *et al.* (2015) foram isoladas bactérias de *Lemna gibba* e a maioria dos isolados foi caracterizada como produtora de compostos indólicos. Todos

esses trabalhos mostram que isolados microbianos de plantas aquáticas apresentam características de promoção do crescimento e quando inoculados no vegetal exercem efeitos positivos no crescimento dos hospedeiros, semelhante ao observado nas culturas terrestres.

O estresse abiótico causado por metais em plantas pode ser minimizado ou eliminado quando BPCV resistentes a metais reduzem a biodisponibilidade desses elementos tóxicos, fazendo com que a absorção pela planta seja diminuída (GUPTA *et al.*, 2019; LAL *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2016). As bactérias apresentam vários mecanismos de resistência aos metais, incluindo sistemas de efluxo, transformação de compostos tóxicos em formas menos danosas e a imobilização ou mobilização de metais (extra ou intracelular) (ETESAMI *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2017; KIRAN *et al.*, 2017). Dessa forma, bactérias promotoras do crescimento resistentes a metais associadas com plantas aquáticas fitoremediadoras podem trazer novas alternativas para a descontaminação de efluentes contaminados por cobre.

Tecnologias de biorremediação para tratamento de metal são alternativas eficazes para remediar corpos d'água contaminados (SAN JUAN *et al.*, 2018). A remediação de metais por métodos convencionais físicos e químicos não é econômica e gera uma grande quantidade de resíduos secundários. Já os agentes biológicos como plantas e micro-organismos oferecem maneiras fáceis e ecológicas de remover metais do ambiente (JACOB *et al.*, 2018). Sistemas de fitorremediação aquática utilizando macrófitas estão cada vez mais sendo estudados e indicados para reduzir as concentrações de metais da água (GHANEM *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2018; REZANIA *et al.*, 2016; RADZALI *et al.* 2015).

## **5.2. Materiais e Métodos**

### **5.2.1. Local de coleta**

A planta aquática *S. auriculata* foi coletada na Lagoa do Jacú, em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil (21° 43' 33,8" S e 41° 20' 22,4" W). Esta lagoa foi formada em uma área de várzea do rio Paraíba do Sul, onde foi construída uma estrada, que impediu a conexão da lagoa com o rio. Tinha área de 0,072 km<sup>2</sup> com 1,3 km de perímetro, localizada próxima à região urbana, apresentando regularmente características de eutrofização, devido ao vazamento de esgoto doméstico e redução da área por aterramento (VILAÇA *et al.*, 2011).

### **5.2.2. Cultivo da planta**

As plantas foram transportadas ao laboratório, lavadas em água corrente e mantidas em casa de vegetação em solução nutritiva com ¼ da força iônica e pH 5,8 ± 0,1 (HOAGLAND & ARNON, 1950), durante todo o período de experimentação. As condições médias de fotoperíodo variaram de 12 h diurno e 12 h noturno, com temperaturas de 25 °C durante o dia e 18 °C durante a noite. A umidade relativa do ar foi de aproximadamente 70%. O Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) forneceu os dados da Estação Meteorológica de Campos dos Goytacazes – RJ. Para os experimentos, as plantas foram aclimatadas por 7 dias em solução nutritiva, selecionando-se indivíduos saudáveis para a experimentação (BIZZO *et al.*, 2014).

### **5.2.3. Isolamento de bactérias**

Amostras de plantas adultas com folhas verdes, sem sintoma de doença, com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de folha e 1 cm de comprimento de raiz, foram trazidas da casa de vegetação para o laboratório. O excesso de água das plantas foi retirado colocando-as por 10 min sobre papel toalha. Plantas (0,5 g) foi adicionado a 10 mL de água destilada estéril por 1 min, duas vezes. E em seguida, as plantas foram transferidas para 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e incubadas por 10 min em ultrassom. Posteriormente, as plantas foram maceradas nessa mesma solução e o extrato

obtido foi plaqueado em meio DYGS (RODRIGUES NETO, 1986). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por até 72 h.

Após o crescimento das colônias, as bactérias foram isoladas com base nas diferenças morfológicas, avaliando: cor, elevação (presente ou ausente), borda (regular ou irregular), superfície (lisa ou rugosa) e detalhe óptico (brilhante, translúcida ou opaca) (PERÍN, 2003). Dessa forma, as colônias que apresentaram características distintas foram incubadas em 5 mL de meio DYGS líquido a 175 rpm em agitador orbital a 30 °C por 16 h e os isolados foram purificados através de estrias cruzadas. As células foram ainda observadas no microscópio óptico para observação do formato: bacilo ou cocos e para análise da coloração de Gram (PELCZAR *et al.*, 1993).

#### **5.2.4. Micro-organismos e condições de cultivo**

Após serem isoladas as bactérias foram rotineiramente cultivados em meio DYGS (RODRIGUES NETO, 1986) com temperatura de 30°C. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h para o cultivo em meio sólido. Para o cultivo em meio líquido, os tubos foram vedados e colocados em agitador orbital a 175 rpm por 24 h.

#### **5.2.5. Identificação molecular dos isolados**

O DNA genômico foi extraído com reagente *Plant DNAzol* (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi feita pelo NanoDrop (NanoDrop/2000c Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific). Para amplificação da região do gene 16S rRNA foram utilizados os iniciadores para o domínio Eubacteria fD1 (27F 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (1429R 5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (WEISBURG *et al.*, 1991). A reação de amplificação continha 2,5 µL do tampão da Taq 10x (Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, KCl 500 mM, 1% Triton- X 100), 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cada iniciador (10 pmol), 0,25 µL da Taq DNA polimerase (2,5 U), 100 ng de DNA e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µL. A programação utilizada foi: 1) 95 °C por 5 min; 3 pré-ciclos de amplificação de 2) 95 °C por 30 s; 3) 55 °C por 30 s e 4) 72 °C por 2 min. Em seguida, sucedeu-se mais 40 ciclos de amplificação 5)

95 °C por 30 s; 6) 55 °C por 30 s, 7) 72 °C por 2 min e 8) 72 °C por 10 min. Ao final, as amostras foram resfriadas a 4 °C ainda no termociclador.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados pela empresa Ludwig Biotecnologia LTDA – ACTGene Serviço de seqüenciamento (Rio Grande do Sul, Brasil), que preparou as reações de sequenciamento com o kit Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 - Life Technologies, USA, seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI modelo 3130 (Applied Biosystems).

A análise e edição das seqüências foi realizada no programa BioEdit 7.0, o alinhamento das seqüências consenso foi realizado com Mafft Online e BLAST Nucleotides dentro da aplicação web BLAST. Para análise da distribuição filogenética dos isolados foi utilizado o método de *Maximum Likelihood* no programa MEGA. Foi utilizado bootstrap valor de 500.

#### **5.2.6. Fixação biológica de nitrogênio**

As bactérias foram cultivadas em meio DYGS até atingir densidade ótica - D.O. (600 nm) equivalente a 1,0. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) para retirada do meio de cultura e de possíveis fontes de nitrogênio. Alíquotas de 20 µL da cultura foram inoculadas em frascos de 10 mL contendo 5 mL dos meios de cultura semi-sólidos NFb e JNFb (BALDANI, 1996; DOBEREINER *et al.*, 1976). O ensaio foi realizado em triplicata e os frascos foram mantidos por 10 dias a 30 °C em estufa bacteriológica. Após esse período foi analisado a ausência ou presença da película aerotóxica formada pelos isolados que apresentaram nitrogenase ativa, portanto, diazotróficos. As culturas foram repicadas para novos meios três vezes e as bactérias que permaneceram formando película foram consideradas positivas para FBN.

#### **5.2.7. Produção de compostos indólicos**

Para avaliar a produção de compostos indólicos, foi utilizado o método de Salkowsky (SARWAR & KREMER, 1995). Os isolados foram cultivados até atingir D.O. (600 nm) igual 1,0 e alíquotas do cultivo de 100 µL foram inoculados em 2 mL de meio DYGS, com

e sem adição de triptofano ( $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ), sendo mantidos no escuro por 72 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação de 175 rpm. Para avaliação de síntese de compostos indólicos, 1 mL da cultura foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para microplaca. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Salkowsky e a placa foi incubada no escuro por 30 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 544 nm e a quantificação de compostos indólicos produzidos foi dosada por meio de curva de calibração com ácido indol-3-acético, relacionando absorvância e concentração de indóis. O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado com três experimentos independentes.

### **5.2.8. Solubilização de fosfato**

Os isolados foram cultivados até atingir D.O. (600 nm) igual a 1,0. Posteriormente, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de inóculo foi depositada sobre a placa de Petri contendo meio Basal (VERMA et al., 2001) acrescido de  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . As placas foram incubadas em estufa por 72 h e após esse período foi observada a formação do halo de solubilização (INTORNE et al., 2009). O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado em três experimentos independentes.

### **5.2.9. Ensaio de promoção do crescimento vegetal**

Com base nas características de promoção do crescimento vegetal estudadas, uma bactéria foi selecionada para inóculo em *S. auriculata*. Neste sentido, as plantas foram aclimatadas por 7 dias em casa de vegetação usando solução nutritiva de Hoagland com  $\frac{1}{4}$  da força (BIZZO et al., 2014; HOAGLAND & ARNOD, 1950). Após esse período, amostras de plantas sem sintoma de doença, com em torno de 0,5 cm de diâmetro de folha e 1 cm de comprimento de raiz, foram trazidas para o laboratório, onde foi retirado o excesso de água e as plantas foram pesadas. Então, 1 g de planta foi transferido para potes contendo 500 mL de solução nutritiva e 1 mL de inóculo da bactéria selecionada em D. O. igual 1,0. Na condição controle não foi adicionada a bactéria. As plantas foram mantidas por 4 dias em casa de vegetação. Os tratamentos foram distribuídos em cinco repetições inteiramente causalizados, sendo os experimentos repetidos três vezes no

tempo. Ao final de cada experimento, foram avaliadas biomassa fresca e biomassa seca após secagem das amostras a 60 °C por 4 dias. Os resultados foram analisados e expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados pelo teste T ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa Graph Prism, versão 5.0.

#### **5.2.10. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima**

A solução estoque de cobre foi preparada segundo BIZZO *et al.* (2014). Para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizou-se  $\text{CuSO}_4$  em concentrações crescentes (1, 3, 5, 7 e 9 mmol). Para realização do experimento, a partir de uma alçada de colônia, cada um dos isolados foi inoculado em 5 mL de meio DYGS líquido, aliquotados e colocados no agitador orbital até atingir densidade ótica ( $D.O_{600 \text{ nm}}$ ) igual a 1. Então, foram inoculadas 3 alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada cultura individualmente nas placas de Petri contendo o metal em concentrações crescentes. Na condição controle não foi adicionado  $\text{CuSO}_4$ . Todas as placas foram incubadas em estufa por 72 h. A CIM considerada foi a menor concentração testada que inibiu o crescimento bacteriano (COOKSEY *et al.*, 1990). Ao final deste ensaio, foram selecionados os isolados mais resistentes a cobre para serem testados em meio líquido contendo  $\text{CuSO}_4$ .

Para o ensaio de CIM em meio líquido, os isolados foram cultivados em tubos contendo 3 mL de meio de cultura DYGS líquido com concentrações crescentes de  $\text{CuSO}_4$  (0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mmol). As bactérias foram colocados em agitador orbital por 36 h. Posteriormente, foi realizada leitura no espectrofotômetro em 600 nm.

#### **5.2.11. Inoculação da bactéria na planta com metal**

Para o ensaio, 1 g da planta *S. auriculata* foi transferido para potes contendo 500 mL de solução Hoagland, que foram expostos a 4 tratamentos: T1. Planta (controle); T2. Planta + bactéria resistente sem adição de Cu; T3. Planta + 0,01 mmol  $\text{CuCl}_2$  e T4. Planta + bactéria resistente + 0,01  $\text{mmol}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ . Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, por um período de 8 dias. Os 4 primeiros dias foram para estabelecer a interação da bactéria com a planta, após esses 4 dias foi realizada a troca da solução nutritiva adicionando-se o  $\text{CuCl}_2$ . Então, o ensaio foi mantido em casa de vegetação por

mais 4 dias, totalizando oito dias de experimentação. O experimento foi repetido três vezes. A bactéria selecionada foi cultivada em meio DYGS líquido, nas condições descritas anteriormente (Item 2.4). Em seguida, 1 mL do inóculo correspondente a  $10^8$  células foi adicionado a solução nutritiva nos tratamentos 2 e 4 contendo *S. auriculata*.

#### **5.2.12. Desenvolvimento da planta**

Encerrado os dias de exposição ao metal, as plantas foram recolhidas e secas em papel toalha por 10 min, sendo determinado a biomassa fresca (BF). Em seguida, o material vegetal foi colocado em estufa a 60 °C por 4 dias para determinação de biomassa seca (BS) (BIZZO *et al.*, 2014). Os dois procedimentos foram realizados utilizando-se balança analítica.

#### **5.2.13. Extravasamento de eletrólitos**

Foi avaliado o extravasamento de eletrólitos como descrito por BEN HAMED *et al.*, (2007), que são íons presentes no meio intracelular extravasados a partir da perda da integridade das membranas sob estresse. Para tanto, as amostras de plantas (300 mg de BF) foram colocadas em tubos contendo 15 mL de água ultrapura incubados em banho-maria a 25 °C por 3 h, resfriados e depois mensurada a condutividade elétrica inicial (CE1). Então, as amostras foram aquecidas por 20 min a 96 °C para liberação de todos os eletrólitos. Após o resfriamento, a condutividade elétrica final (CE2) foi mensurada. O extravasamento de eletrólitos (EE) foi calculado de acordo com a equação:  $EE = (CE1/CE2) \times 100$ .

#### **5.2.14. Determinação de pigmentos fotossintéticos**

O teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*) e carotenóides foi determinada de acordo com WELLBURN (1994). Plantas (50 mg de BF) foram colocadas em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas no escuro por 4 dias, quando foi realizada a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm.

### **5.2.15. Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi apresentada como média  $\pm$  desvio padrão e analisados por ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) seguido pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) a fim de determinar as diferenças entre os tratamentos. Os testes foram realizados com o programa Graph Prism, versão 5.0.

## 6. Resultados

### 6.1. Bactérias associadas à *Salvinia auriculata*

Visando conhecer a microbiota cultivável de *S. auriculata*, foi realizado o isolamento de bactérias a partir dos tecidos da planta. Como resultado, foram encontradas 18 bactérias distintas com base em características morfológicas da colônia. A descrição do formato da célula e a coloração de Gram também foram observadas. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

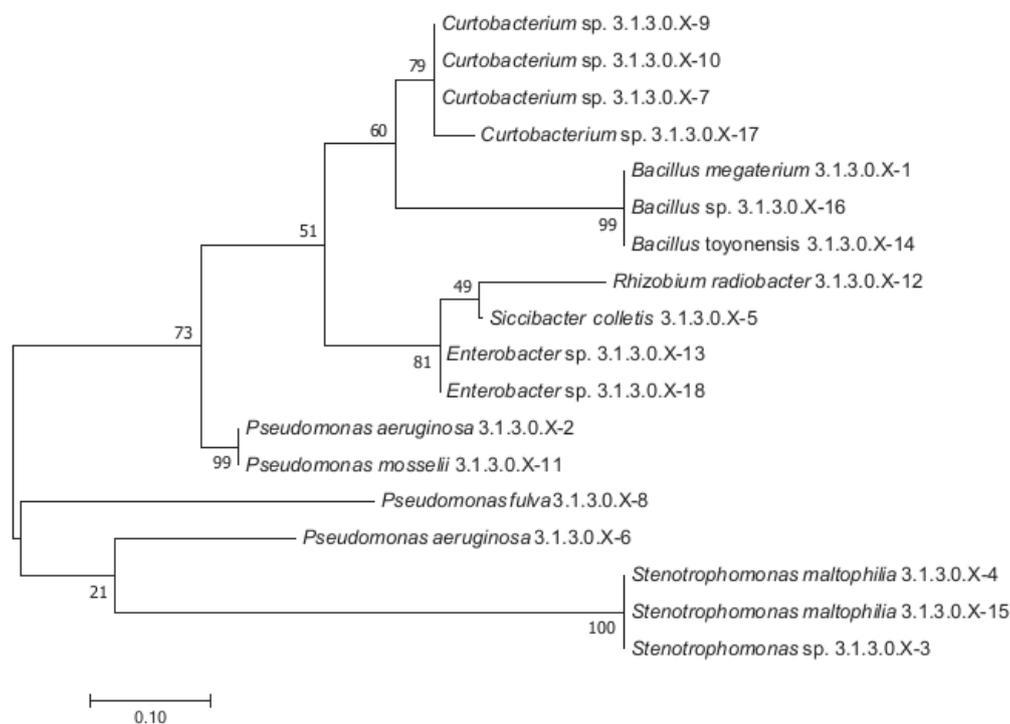
**Tabela 1.** Características morfológicas das colônias e das células dos isolados de *S. auriculata*.

| Cepa          | Cor     | Elevação | Borda     | Superfície | Detalhe Ótico | Gram | Forma  |
|---------------|---------|----------|-----------|------------|---------------|------|--------|
| 3.1.3.0. X.1  | Creme   | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.2  | Verde   | Ausente  | Irregular | Rugosa     | Opaca         | -    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.3  | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.4  | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.5  | Branca  | Presente | Irregular | Lisa       | Translúcida   | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.6  | Verde   | Ausente  | Irregular | Rugosa     | Opaca         | -    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.7  | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.8  | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | -    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.9  | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | -    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.10 | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.11 | Verde   | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.12 | Branca  | Presente | Regular   | Lisa       | Translúcida   | -    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.13 | Branca  | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Coco   |
| 3.1.3.0. X.14 | Branca  | Ausente  | Irregular | Rugosa     | Opaca         | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.15 | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.16 | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.17 | Amarela | Presente | Regular   | Lisa       | Brilhante     | +    | Bacilo |
| 3.1.3.0. X.18 | Branca  | Presente | Regular   | Lisa       | Translúcida   | -    | Bacilo |

Os 18 isolados foram submetidos à análise molecular através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para determinação taxonômica. As sequências obtidas tiveram de 481 a 1579 nucleotídeos, com cobertura de 94 a 99% (Tabela 2). Dentre os 18 isolados, foi possível identificar sete gêneros bacterianos e pelo menos nove espécies distintas. Para analisar a proximidade genética desses isolados, a sequência parcial do gene 16S rRNA também foi utilizada para montar uma árvore filogenética das cepas obtidas no isolamento (Figura 1).

**Tabela 2.** Identificação molecular dos isolados de *S. auriculata*. Nt: nucleotídeos; Ident: identidade.

| Identificação                                     | Nt   | Ident (%) | Acesso NCBI |
|---|------|-----------|-------------|
| <i>Bacillus megaterium</i> 3.1.3.0. X.1           | 1479 | 98        | MK558237    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.2        | 760  | 99        | MK558246    |
| <i>Stenotrophomonas</i> sp 3.1.3.0. X.3           | 818  | 97        | MK558253    |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.4  | 960  | 98        | MK558251    |
| <i>Siccibacter colletis</i> 3.1.3.0. X.5          | 1459 | 99        | MK558250    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.6        | 1499 | 94        | MK558247    |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.7            | 1449 | 94        | MK558240    |
| <i>Pseudomonas fulva</i> 3.1.3.0. X.8             | 1112 | 97        | MK558248    |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.9            | 691  | 99        | MK558241    |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.10           | 1453 | 97        | MK558242    |
| <i>Pseudomonas mosselii</i> 3.1.3.0. X.11         | 670  | 96        | MK558249    |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> 3.1.3.0. X.12        | 1410 | 98        | MK558236    |
| <i>Enterobacter</i> sp 3.1.3.0. X.13              | 979  | 97        | MK558244    |
| <i>Bacillus toyonensis</i> 3.1.3.0. X.14          | 1461 | 98        | MK558239    |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.15 | 797  | 97        | MK558252    |
| <i>Bacillus</i> sp. 3.1.3.0. X.16                 | 481  | 99        | MK558238    |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.17           | 517  | 98        | MK558243    |
| <i>Enterobacter</i> sp. 3.1.3.0. X.18             | 1460 | 98        | MK558245    |



**FIGURA 1:** Distribuição filogenética dos isolados de *S. auriculata* a partir do gene 16S rRNA. O método utilizado foi *Maximum Likelihood*.

## 6. 2. Potencial de promoção do crescimento vegetal das bactérias

No sentido de estudar BPCV associadas com *Salvinia auriculata*, foi avaliada a capacidade dos isolados em fixar nitrogênio atmosférico, produzir compostos indólicos e solubilizar fosfato (Tabela 3). Como resultado, 12 bactérias foram positivas para a formação da película aerotóxica sob a superfície de pelo menos um dos dois meios de cultura testados para FBN, mostrando-se, portanto, com nitrogenase ativa. A análise de compostos indólicos revelou que os isolados foram positivos para a produção de indóis, tendo quatro cepas apresentado compostos indólicos no meio de cultura numa concentração próxima ou superior a 20,00 µg mL<sup>-1</sup>. Sobre a capacidade de solubilizar fosfato, somente duas bactérias não apresentaram a característica, sendo incapazes de formar o halo de solubilização.

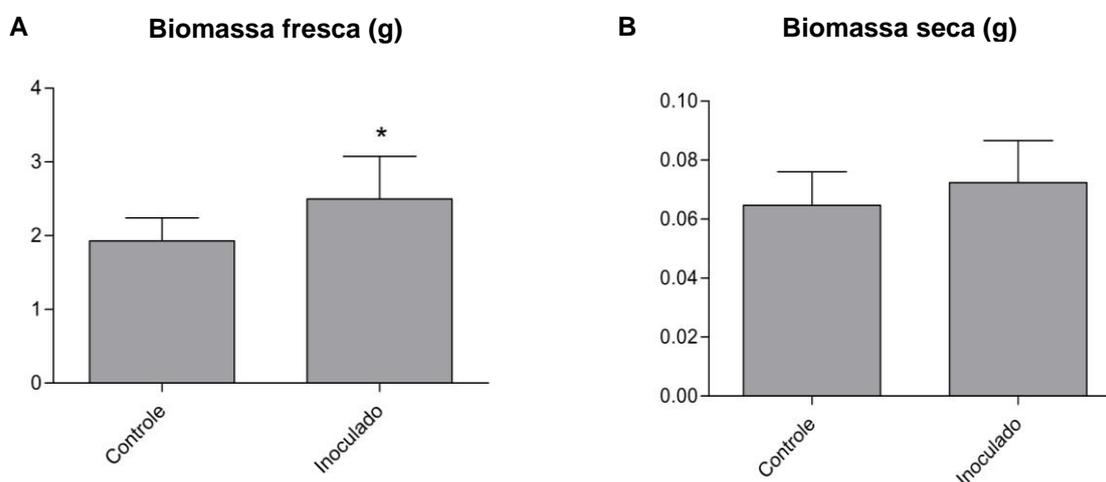
**Tabela 3.** Características promotoras do crescimento vegetal em isolados de *S. auriculata* Aubl. + Presença da característica; - Ausência da característica.

| Identificação                                     | NFb | JNFb | Indóis (µg mL <sup>-1</sup> ) | Solubilização P |
|---|-----|------|-------------------------------|-----------------|
| <i>Bacillus megaterium</i> 3.1.3.0. X.1           | -   | -    | 2,89                          | +               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.2        | -   | +    | 24,00                         | +               |
| <i>Stenotrophomonas</i> sp 3.1.3.0. X.3           | +   | -    | 4,70                          | +               |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.4  | -   | +    | 6,97                          | +               |
| <i>Siccibacter colletis</i> 3.1.3.0. X.5          | +   | +    | 7,90                          | +               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.6        | -   | -    | 0,70                          | +               |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.7            | -   | -    | 3,62                          | +               |
| <i>Pseudomonas fulva</i> 3.1.3.0. X.8             | -   | +    | 6,01                          | +               |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.9            | -   | -    | 4,81                          | +               |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.10           | +   | +    | 1,91                          | +               |
| <i>Pseudomonas mosselii</i> 3.1.3.0. X.11         | +   | +    | 1,44                          | +               |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> 3.1.3.0. X.12        | +   | -    | 19,63                         | +               |
| <i>Enterobacter</i> sp 3.1.3.0. X.13              | -   | -    | 22,72                         | +               |
| <i>Bacillus toyonensis</i> 3.1.3.0. X.14          | -   | -    | 1,05                          | +               |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.15 | +   | +    | 2,63                          | -               |
| <i>Bacillus</i> sp. 3.1.3.0. X.16                 | +   | +    | 6,45                          | +               |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.17           | -   | +    | 2,66                          | -               |
| <i>Enterobacter</i> sp. 3.1.3.0. X.18             | +   | +    | 28,18                         | +               |

Como pode ser observado na Tabela 3, nove isolados apresentaram todas as características de promoção do crescimento avaliadas. Dentre esses, aquele que apresentou maior produção de compostos indólicos, que foi a cepa *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 (28,18 µg mL<sup>-1</sup>), foi selecionado para teste de promoção do crescimento vegetal *in vivo*.

### 6.3 Promoção do crescimento de *S. auriculata* por *Enterobacter* sp.

No sentido de avaliar efetivamente a promoção do crescimento da planta aquática *S. auriculata* mediada por BPCV, foi realizado ensaio de interação com a bactéria selecionada. Dessa forma, 4 dias após a inoculação de *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 em *S. auriculata* em casa de vegetação, foi observado incremento de biomassa fresca das plantas inoculadas comparado às plantas não inoculadas de 29,6% (Figura 2). Na biomassa seca não foi observada diferença significativa, apesar dos dados apresentarem uma tendência de aumento de biomassa seca no tratamento inoculado. Então, é possível concluir que *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 promove o crescimento de *S. auriculata* com incremento de quase 30% de biomassa fresca em apenas 4 dias após a inoculação.



**Figura 2:** Efeito da inoculação de *Enterobacter* sp. em *S. auriculata* sobre a biomassa vegetal. A bactéria promoveu aumento de biomassa fresca das plantas (A), não havendo diferença significativa na biomassa seca após 4 dias de inoculação (B). Médias seguidas de \* diferem entre si na mesma análise, segundo o Teste t ( $p \leq 0,05$ ). Controle (somente plantas de *Salvinia auriculata*). Inoculado (*Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 + plantas de *Salvinia auriculata*).

### 6. 4. Bactérias resistentes a cobre associadas à *S. auriculata*

Ao avaliar as BPCV quanto à resistência, foi observado que à medida que a concentração de cobre no meio aumentou, o tamanho das colônias diminuiu. Das 18 BPCV, 17 foram capazes de crescer em pelo menos uma das concentrações testadas. A cepa *B. megaterium* 3.1.3.0.X.1 foi sensível mesmo na concentração mais baixa, 1 mmol. Treze bactérias cresceram somente nesta concentração mais baixa, apresentando CIM de 3 mmol. Quatro isolados bacterianos conseguiram sobreviver em concentrações

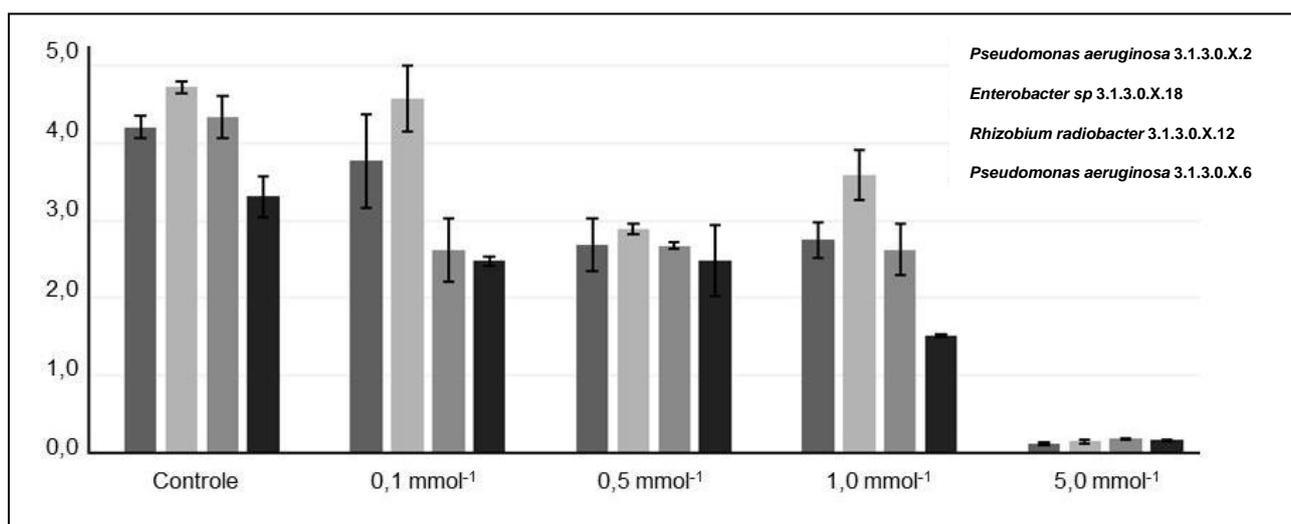
elevadas, que foram: uma bactéria do gênero *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 (CIM: 9 mmol), duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 3.1.3.0.X.2 e 3.1.3.0.X.6 (CIM: 7 mmol) e uma espécie de *Rhizobium radiobacter* 3.1.3.0.X.12 (CIM: 5 mmol). A CIM para cada uma das 18 BPCV associadas à planta aquática *S. auriculata* são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Concentração Inibitória Mínima de cobre em bactérias promotoras dos crescimento vegetal associadas a *Salvinia auriculata* Aublet.

| Bactéria  | CIM de CuSO <sub>4</sub> (mmol <sup>-1</sup> ) |
|---|--|
| <i>Bacillus megaterium</i> 3.1.3.0. X.1           | 1  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0.X.2*        | 7  |
| <i>Stenotrophomonas</i> sp 3.1.3.0. X.3           | 3  |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.4  | 3  |
| <i>Siccibacter colletis</i> 3.1.3.0. X.5          | 3  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3.1.3.0.X.6*        | 7  |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.7            | 3  |
| <i>Pseudomonas fulva</i> 3.1.3.0. X.8             | 3  |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.9            | 3  |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.10           | 3  |
| <i>Pseudomonas mosselii</i> 3.1.3.0. X.11         | 3  |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> 3.1.3.0.X.12*        | 5  |
| <i>Enterobacter</i> sp 3.1.3.0. X.13              | 3  |
| <i>Bacillus toyonensis</i> 3.1.3.0. X.14          | 3  |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3.1.3.0. X.15 | 3  |
| <i>Bacillus</i> sp. 3.1.3.0. X.16                 | 3  |
| <i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.17           | 3  |
| <i>Enterobacter</i> sp. 3.1.3.0.X.18*             | 9  |

\*Bactérias selecionadas como mais resistentes  
CIM: Concentração Inibitória Mínima

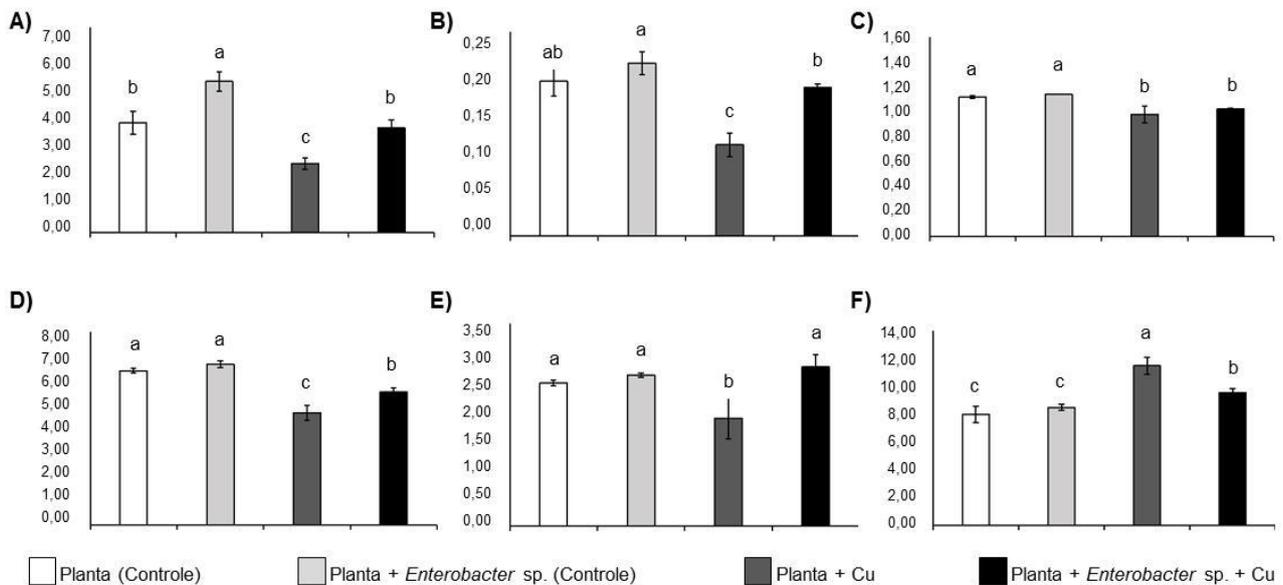
As quatro BPCV mais resistentes a cobre foram selecionadas para avaliar o efeito do cobre no crescimento bacteriano em meio líquido. Dessa forma, após 36 h de cultivo na presença e ausência de concentrações crescentes do metal, apesar da redução da quantidade de células no tratamento com cobre, identificamos as quatro cepas bacterianas são altamente resistentes ao metal, tendo crescimento até 1 mmol de CuSO<sub>4</sub> (Figura 3). *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 manteve um crescimento superior em comparação com as outras bactérias, corroborando os dados obtidos em meio sólido (Tabela 4). Na concentração de 5 mmol todas as bactérias tiveram o crescimento inibido.



**Figura 3:** Menor concentração de cobre testada que inibiu o crescimento bacteriano. A densidade óptica (600 nm) foi utilizada como medida indireta do crescimento bacteriano aferida após 36 h de cultivo.

### 6.5. Efeito de *Enterobacter sp.* em *Salvinia auriculata* sob o estresse por cobre

A partir dos ensaios de CIM, *Enterobacter sp.* 3.1.3.0.X.18 foi selecionada para co-cultivo com a planta aquática. Após 8 dias de experimento, o efeito da inoculação de *Enterobacter sp.* em *S. auriculata* sobre os diferentes atributos (Figura 4), pode ser observado em A e B, os parâmetros de crescimento: Biomassa Fresca (BF), e Biomassa Seca (BS) foram reduzidos em T3 comparando-se com os demais tratamentos. Em T2, as plantas inoculadas tiveram um aumento significativo de BF de 37% comparada a T1 na ausência de metal. Na presença de cobre, as plantas em T4 tiveram um aumento significativo de BF (51%) e BS (62%) comparando-se com T3, que não teve a adição de BPCV resistente ao metal. Sintomas visuais de toxicidade de cobre, como retardo de crescimento e necrose ocorreram apenas em plantas do T3. Dessa forma, é possível concluir que *Enterobacter sp.* 3.1.3.0.X.18 promove o crescimento da planta na ausência de metal e alivia o estresse de *S. auriculata* quando na presença de cobre.



**Figura 4:** Efeito protetor da inoculação de *Enterobacter* sp. em *S. auriculata* sob estresse por cobre. Em A) biomassa fresca em g, B) biomassa seca em g, C) teor de carotenóides, D) teor de clorofila a, E) teor de clorofila b, F) e extravasamento de eletrólitos (%). As barras verticais indicam média e desvio padrão. As letras indicam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Também foi avaliado o aparato fotossintético da planta através dos teores de pigmentos: carotenóides, clorofila a e clorofila b (Figura 4C, 4D e 4E, respectivamente). Como pode ser observado, o estresse por cobre em T3 e T4 diminuiu significativamente o teores de clorofila a na planta comparado aos tratamentos T1 e T2, todavia, a BPCV consegue minimizar a perda desse pigmento em T4 (Figura 4D). A ação da bactéria é ainda mais proeminente quanto à clorofila b na planta sob estresse por cobre (T4), restaurando o teor do pigmento as condições sem adição de metal (T1 e T2) (Figura 4E). A análise dos carotenóides não encontrou diferenças sinificativas quanto à presença da BPCV. Foi encontrada diferença somente quanto à presença de cobre, que reduziu os teores desse pigmento na planta (Figura 4C).

No sentido de avaliar a extensão do dano causado por cobre na planta, a integridade das membranas celulares foi analisada através do ensaio de extravasamento de eletrólitos. O resultado dessa análise pode ser observado na Figura 4F. É verificado que a toxicidade do Cu causou lise das membranas biológicas, levando ao extravasamento de eletrólitos nas plantas de *S. auriculata*. Já a presença da BPCV não causou estresse na

célula vegetal (T2), ao contrário, amenizou o dano causado por cobre nas membranas (T4).

## 7. Discussão

Há décadas o uso de micro-organismos promotores do crescimento tem se mostrado valioso na agricultura. Associações com *Rhizobium*, por exemplo, são muito exploradas (SHEN *et al.*, 2019; REHAN *et al.*, 2018; NYOKI *et al.*, 2018; MORAD *et al.*, 2013; GIRI *et al.*, 2010). Recentemente, com o avanço das técnicas moleculares, os estudos de microbioma têm trazido à luz conhecimentos da interação, mostrando inúmeros benefícios dos micro-organismos aos hospedeiros (SASSE *et al.*, 2018; FITZPATRICK *et al.*, 2018). No entanto, no ambiente aquático muito pouco dessas relações é conhecido. Diante da crise hídrica e da contaminação das águas, explorar as interações entre micro-organismos e plantas aquáticas pode ser uma alternativa interessante para remediar um ambiente degradado. Vários estudos são desenvolvidos sobre plantas aquáticas no que se refere à distribuição das espécies e aplicações para fitorremediação, o que é fundamental para revelar aspectos ecológicos, que contribuem para a sobrevivência dessas plantas em diferentes ambientes (ZHANG *et al.*, 2019; O'HARE *et al.*, 2018; TELLO *et al.*, 2018). Todavia, é preciso estudar a fundo a associação dos micro-organismos com plantas aquáticas, principalmente, daqueles micro-organismos envolvidos em processos de promoção do crescimento vegetal (ISHIZAWA *et al.*, 2017; SUZUKI *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos recentes têm trazido o isolamento bacteriano a partir de plantas aquáticas e a caracterização de BPCV. GILBERT *et al.*, (2018) isolaram 47 bactérias endofíticas dos tecidos de *Lemna minor* e avaliaram a produção de compostos indólicos. ISHIZAWA *et al.* (2017) isolaram e caracterizaram 22 bactérias da rizosfera de *Lemna gibba*. SHEHZADI *et al.* (2016) obtiveram 41 bactérias endofíticas isoladas de três plantas aquáticas, tendo encontrado oito isolados associados com *Eichhornia crassipes*, 24 com *Typha domingensis* e nove com *Pistia stratiotis*. Todavia, é a primeira vez que são isoladas BPCV associadas a *S. auriculata*. A análise das sequências de DNA dos 18 isolados revelou que a maioria das linhagens pertence a espécies e gêneros diferentes.

*Curtobacterium* já é descrita como promotora do crescimento vegetal. DÍEZ-MÉNDEZ *et al.* (2017) mostraram a melhoria da produção de açafraão utilizando *Curtobacterium herbarum* Cs10. VIMAL *et al.* (2018) examinaram a inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas sob diferentes condições de salinidade e o isolado *Curtobacterium albidum* SRV4 foi avaliada como diazotrófico e

produtor de compostos indólicos. Plantas de arroz inoculadas com essa cepa mostraram ganhos significativos de biomassa vegetal mesmo sob estresse salino. Dessa forma, os dados corroboram nossos resultados. As cepas de *Curtobacterium* isoladas a partir de *S. auriculata* também são diazotróficas e produzem compostos indólicos, podendo ter ainda potencial para a proteção das plantas contra estresses ambientais.

*Pseudomonas* é um micro-organismo encontrado em vários ambientes, principalmente, água, solo e plantas. Estas bactérias possuem alta capacidade de adesão e habilidade de formar biofilme, sendo utilizadas na produção de biossurfactantes, no controle biológico e como promotora do crescimento de plantas (ZHAO *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2018; UZAIR *et al.*, 2018). Em *Pseudomonas aeruginosa*, já foi verificada a produção de ácido indol-3-acético e solubilização de fosfato (NDEDDY AKA *et al.*, 2015). Tais resultados vão de encontro aos dados obtidos para os isolados do gênero *Pseudomonas* no presente trabalho.

Recentemente, *Bacillus megaterium* foi testado como promotor do crescimento de plantas. A cepa exibiu produção de indol, porém não apresentou atividade de solubilização de fosfato, nem foi capaz de crescer em meio livre de N (CHINNASWAMY *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, *B. megaterium* 3.1.3.0.X.1 produziu compostos indólicos e não fixou N, mas solubilizou fosfato. Isso pode ser justificado pelas condições distintas de cultivo que foram empregadas, já que ZHAO *et al.*, (2015) estudando uma cepa de *Bacillus megaterium*, também observaram produção de compostos indólicos e solubilização fosfato.

Embora várias espécies de *Bacillus* sejam reconhecidas como BPCV, a associação entre *Bacillus toyonensis* e plantas parece não ter sido explorada, apesar das análises genômicas sugerirem potencial antimicrobiano contra fitopatógenos (LOPES *et al.*, 2017). Dessa forma, seria interessante estudar a cepa encontrada 3.1.3.0.X.14 no biocontrole desses patógenos de planta.

Outra espécie encontrada na microbiota de *S. auriculata*, *Stenotrophomonas maltophilia*, já foi inoculada em plantas de tomate, promovendo aumento do comprimento de parte aérea e radicular, teor de clorofila e biomassa total fresca da planta (ROJAS-SOLÍS *et al.*, 2018). A bactéria também foi identificada como produtora de indóis (NAZ & BANO 2012), da mesma forma que os isolados 3.1.3.0.X.4 e 3.1.3.0.X.14.

*Agrobacterium tumefaciens* foi reclassificada como *Rhizobium radiobacter* (YOUNG *et al.*, 2001) e foi encontrada na microbiota de *S. auriculata*. A cepa 3.1.3.0.X.12 mostrou-se diazotrófica, produtora de compostos indólicos e solubilizadora de fosfato, como observado em trabalhos anteriores (WIDAWATI, 2019; BANACH *et al.*, 2019; KHANGHAHI *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2014).

*Siccibacter colletis* foi identificada pela primeira vez em um isolamento de sementes de papoula. JACKSON *et al.* (2015) não observaram a produção de compostos indólicos pela bactéria. No presente trabalho, a cepa isolada de planta aquática 3.1.3.0.X.5 é produtora de compostos indólicos, fixadora de nitrogênio e solubilizadora de fosfato. Como já colocado, tais diferenças podem decorrer de condições de cultivo distintas.

Dessa forma, é possível observar que cada isolado obtido tem potencial para ser explorado como produto biotecnológico em cultivos puros ou mesmo em consórcios microbianos, se aproximando daquilo que é encontrado na natureza. No presente estudo, isolamos 18 bactérias cultiváveis associadas à *S. auriculata* Aublet com características promotoras do crescimento vegetal e selecionamos a cepa *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 para fazer o co-cultivo com a macrófita aquática. De fato, o efeito da bactéria aumentou significativamente a biomassa fresca de *S. auriculata* em apenas 4 dias após a inoculação, de modo que os resultados em casa de vegetação mostraram a viabilidade do emprego da BPCV endógena para bioaugmentação, podendo ser utilizada em processos de remediação.

BANACH *et al.* (2019) isolaram bactérias da rizosfera da planta aquática *Azolla filiculoides* e identificaram alguns gêneros comuns aos encontrados em *S. auriculata* como *Bacillus* e *Agrobacterium*. ISHIZAWA *et al.* (2019) examinaram a dinâmica de colonização e competição de uma bactéria promotora do crescimento de plantas (BPCV) e duas bactérias inibidoras do crescimento de plantas (BICV) inoculadas na planta aquática *Lemna minor* durante sete dias. Os resultados mostraram que a BPCV excluiu consistentemente as bactérias BICV, de modo que o combate a fitopatógenos também pode ser explorado nesses micro-organismos.

Após encontrar BPCV em *S. auriculata*, foi avaliada a característica de resistência a cobre nos isolados, isso porque os metais têm sido encontrados em excesso no ambiente e uma forma de reduzir os danos causados é a biorremediação, que tem se mostrado um

processo rentável, seguro e ecológico (FERNANDES *et al.*, 2018), diferente dos métodos físicos e químicos, que também podem ser muito caros (JUNED e AHMARUZZAMAN 2016; GUNATILAKE 2015; YARO *et al.*, 2015). No presente trabalho, quatro bactérias foram capazes de resistir a concentrações elevadas de cobre no meio de cultura: *R. radiobacter* 3.1.3.0.X.12, *P. aeruginosa* 3.1.3.0.X.2 e 3.1.3.0.X.6, e *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18. O efeito do crescimento bacteriano em meio líquido na presença do cobre foi analisado e observou-se que o crescimento bacteriano é dependente da concentração de metal, uma vez que houve diminuição na densidade óptica de acordo com a concentração crescente de cobre. Isto já foi verificado em outros trabalhos, sendo avaliado também o tempo de exposição ao metal, um aspecto relevante que deve ser analisado no futuro (GAO *et al.*, 2008).

Alguns estudos com bactérias do gênero *Pseudomonas* corroboram nossos resultados quanto a resistência a cobre nesta bactéria. COLONNELLA *et al.* (2018), estudando *Pseudomonas extremaustralis*, encontraram CIM de 4 mmol<sup>-1</sup> para cobre. No trabalho de LIANG *et al.*, (2018), uma cepa de *Pseudomonas* foi isolada de solo contaminado por mina de cobre, apresentando CIM de 12,37 mg para este metal. MANZLOOR *et al.* (2019) indicaram em seu estudo que as bactérias isoladas da rizosfera de *Pteris vittata* apresentaram capacidade para resistir a múltiplos metais. *Pseudomonas* sp. PG-12 teve os melhores resultados, obtendo CIM de 8 mmol<sup>-1</sup> para cobre.

*A. tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) isolada de nódulos radiculares de plantas *Lespedeza cuneata* coletadas em mina de rejeito de ouro da China foram resistentes até 2 mmol<sup>-1</sup> de cobre, sendo verificada também a resistência para outros metais, como zinco e cádmio. Os resultados de WEI *et al.* (2009) mostraram que *A. tumefaciens* possui um mecanismo que exporta cobre para fora da célula, fazendo com que a bactéria sobreviva em ambientes com alta concentração do metal. NAWAPAN *et al.* (2009) verificaram que a bactéria possui operon *copARZ*, que é crucial para a resistência a cobre. CHAOPRASID *et al.* (2015) mostraram que *A. tumefaciens* também possui um mecanismo específico para exportar cádmio, cobalto e zinco da célula. Neste sentido, seria interessante avaliar a resistência da cepa 3.1.3.0.X.12 para outros metais.

*Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 foi a BPCV mais resistente a cobre encontrada no trabalho, apresentando CIM de 9 mmol<sup>-1</sup> para cobre. A bactéria já é descrita na literatura

como resistente ao metal. No trabalho de CORAL *et al.* (2005), 15 bactérias do gênero *Enterobacter* foram isoladas de um sistema de drenagem de água e testadas quanto a resistência a cobre, alcançando CIM de até 25 mmol<sup>-1</sup>. Uma das cepas, Ent-5, foi utilizada como doadora do plasmídeo de resistência ao cobre para *Escherichia coli* AB3505, tornando tal bactéria capaz de resistir a altas concentrações de cobre. NAZ *et al.* (2015) encontraram três cepas de *Enterobacter* sp. resistentes a cobre: NCCP-835 (14 mg L<sup>-1</sup>), NCCP-838 (11 mg L<sup>-1</sup>) e NCCP-839 (16 mg L<sup>-1</sup>). Uma *Enterobacter* sp. também isolada de planta (raízes de sorgo) apresentou CIM de 3 mmol<sup>-1</sup> para cobre e foi aplicada com inoculante promovendo o crescimento da planta em solo contendo o metal (LI *et al.*, 2016). No trabalho de SHARAFF *et al.* (2017) foi observado que *Enterobacter* sp. P36 isolada de solo contaminado foi capaz de crescer nas concentrações de 1 mmol<sup>-1</sup> de cobre. Todos estes trabalhos corroboram nossos dados.

No âmbito das plantas aquáticas, ZHANG *et al.* (2008) isolaram uma bactéria Enterobacteriaceae da rizosfera de *Eichornia crassipes* e inocularam em outra planta aquática, *Potamogeton crispus* L., sendo verificado com 8 dias aumento de peso fresco das plantas inoculadas na presença do cobre (0,5; 3,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>). IRAWATI *et al.* (2017) isolaram bactérias *Acinetobacter* spp de efluente industrial e mostraram que as cepas IrC1 e IrC2 aumentaram a eficiência da fitorremediação utilizando *E. crassipes*. A inoculação potencializou a remoção do cobre pela planta, ocorrendo acúmulo do metal nos tecidos vegetais seis vezes maior em comparação com os controles não inoculados. Dessa forma, é esperado que *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 aumente a remoção de cobre por *S. auriculata*.

No presente trabalho, a resposta fisiológica e os sintomas de toxicidade do cobre foram determinados pela avaliação de pigmentos fotossintéticos e carotenóides. Foi observada redução no teor de clorofila a e b das plantas sob estresse por cobre como relatado em outros estudos com plantas aquáticas expostas a metais (PANFILI *et al.*, 2017; BIZZO, *et al.*, 2014). LI *et al.* (2015) verificaram que o conteúdo de clorofila está intimamente relacionado com a fotossíntese da planta e é um sintoma visível que pode ser utilizado para monitorar se o crescimento das plantas é danificado por metal. Em altas concentrações, o cobre pode alterar os pigmentos e as proteínas da membrana fotossintética, causando diminuição nos teores de clorofila e dificultando o

desenvolvimento de cloroplastos, membranas tilacóides e do fotossistema (LIU *et al.*, 2018). Este estudo mostrou que na presença de cobre, *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 aumentou o teor desses pigmentos.

A integridade e a funcionalidade da membrana plasmática são utilizadas como indicadores de tolerância a metal em plantas. O extravasamento de eletrólitos é uma forma de medir esse dano à membrana, normalmente desencadeado por estresse oxidativo causado pelo excesso de metal. Valores aumentados de extravasamento de eletrólitos na presença de metais também foram vistos no trabalho de BIZZO *et al.*, (2014) com *S. auriculata* sob estresse com  $0,01 \text{ mmol}^{-1}$  de cobre. PRADO *et al.* (2016) analisaram o extravasamento de eletrólitos em duas espécies, *Salvinia rotundifolia* e *Salvinia minima*, nas concentrações de 5 e  $20 \text{ mgL}^{-1}$  Cr (VI). Em ambas, houve aumento de extravasamento de eletrólitos. No presente estudo, foram observados aumentos significativos de extravasamento de eletrólitos na presença de cobre. Todavia, *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 reduziu esse dano quando comparado ao tratamento planta + cobre. Neste sentido, é possível que um dos mecanismos utilizados pela bactéria para proteger a planta na condição de estresse abiótico por cobre seja a produção de substâncias antioxidantes.

A interação entre plantas aquáticas e bactérias, apesar de pouco estudada, ocorre nos corpos hídricos e tem papel ecológico relevante para a manutenção do ecossistema. Os sistemas de tratamento de efluentes baseados em plantas têm se mostrado altamente eficientes na remoção de contaminantes, especialmente metais. A eficiência desse processo pode ser melhorada pela interação com BPCV. O presente estudo mostra que a cepa *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 usada na forma de inoculante protege a planta *S. auriculata* do estresse causado por cobre, tendo potencial para otimizar processos de fitorremediação. Com isso, é possível vislumbrar a aplicação das BPCV isoladas de *S. auriculata* em áreas contaminadas, buscando um tratamento eficiente, de baixo custo e menos oneroso ao ambiente.

## 8. Conclusão

A partir do presente estudo, foram isoladas e caracterizadas 18 bactérias associadas à planta aquática *S. auriculata* com características benéficas para o crescimento vegetal. Foi demonstrado nos experimentos de inoculação única de *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18, que houve aumento significativo de biomassa fresca de *S. auriculata*, indicando a possibilidade de melhorar a produtividade dessa planta através de co-cultivo com bactérias. Também foi identificado que as BPCV isoladas de *S. auriculata* apresentaram resistência a cobre. A cepa *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 foi a que cresceu na maior concentração de cobre testada, amenizando a toxicidade do metal em plantas de *S. auriculata* quando inoculada. Na presença da bactéria, foi observado efeitos protetores da *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 sobre os pigmentos fotossintéticos e a integridade de membrana, resultando em manutenção das condições de crescimento da planta na presença do metal.

## 9. Referências bibliográficas

- Abraham, J., & Silambarasan, S. (2015). Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7), 3336-3348.
- Alloway, B. J. (2008). Copper and Zinc in soils: Too little or too much. In NZ Trace Elements Group Conference, Waikato University, Hamilton.
- Altarelli, M., Ben Hamouda, N., Schneider, A., & Berger, M. M. (2019). Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. *Nutrition in Clinical Practice*.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1-2), 413-431.
- Banach, A., Kuźniar, A., Mencfel, R., & Wolińska, A. (2019). The Study on the Cultivable Microbiome of the Aquatic Fern *Azolla Filiculoides* L. as New Source of Beneficial Microorganisms. *Applied Sciences*, 9(10), 2143.
- Bhui, I., Mathew, A. K., Chaudhury, S., & Balachandran, S. (2018). Influence of volatile fatty acids in different inoculum to substrate ratio and enhancement of biogas production using water Hyacinth and *Salvinia*. *Bioresource Technology*, 270, 409-415.
- Bhutani, N., Maheshwari, R., Negi, M., & Suneja, P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Israel Journal of Plant Sciences*, 65(01-02), 83-96.
- Biswas, J. K., Mondal, M., Rinklebe, J., Sarkar, S. K., Chaudhuri, P., Rai, M., Rizwan, M. (2017). Multi-Metal Resistance and Plant Growth Promotion Potential of a Wastewater Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and Its Synergistic Benefits. *Environmental Geochemistry and Health*, 39(6), 1583–1593. Doi:10.1007/S10653-017-9950-5.
- Bizzo, A. L. T., Intorne, A. C., Gomes, P. H., Suzuki, M. S., & Esteves, B. D. S. (2014). Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26(3), 268-277.
- Brunetto, G., Miotto, A., Ceretta, C. A., Schmitt, D. E., Heinzen, J., de Moraes, M. P., & Girotto, E. (2014). Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(5), 609-624.
- Casagrande, G. C. R., Dos Reis, C., Arruda, R., De Andrade, R. L. T., & Battirola, L. D. (2018). Bioaccumulation and Biosorption Of Mercury by *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(5). Doi:10.1007/S11270-018-3819-9.
- Chakraborty, S., Mishra, A., Verma, E., Tiwari, B., Mishra, A. K., & Singh, S. S. (2019). Physiological mechanisms of aluminum (Al) toxicity tolerance in nitrogen-fixing aquatic macrophyte *Azolla microphylla* Kaulf: phytoremediation, metabolic rearrangements, and antioxidative enzyme responses. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 9041-9054.
- Chandanshive, V. V., Rane, N. R., Gholave, A. R., Patil, S. M., Jeon, B. H., & Govindwar, S. P. (2016). Efficient decolorization and detoxification of textile industry effluent by *Salvinia molesta* in lagoon treatment. *Environmental Research*, 150, 88-96.
- Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2015). Roles of *Agrobacterium tumefaciens* C58 ZntA and ZntB and the transcriptional regulator ZntR in controlling Cd<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> resistance and the peroxide stress response. *Microbiology*, 161(9), 1730-1740.

Chen, L., Cai, Y., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Hou, W. (2017). Soybean Hairy Roots Produced in Vitro by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Transformation. *The Crop Journal*, 6(2), 162–171. Doi:10.1016/J.Cj.2017.08.006.

Chen, W. M., Tang, Y. Q., Mori, K., & Wu, X. L. (2012). Distribution of culturable endophytic bacteria in aquatic plants and their potential for bioremediation in polluted waters. *Aquatic biology*, 15(2), 99-110.

Chhabra, G., Chaudhary, D., Sainger, M., & Jaiwal, P. K. (2011). Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(2), 129-136.

Chinnaswamy, A., Coba De La Peña, T., Stoll, A., De La Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., Pueyo, J. J. (2018). A Nodule Endophytic *Bacillus megaterium* Strain Isolated from *Medicago Polymorpha* Enhances Growth, Promotes Nodulation by Ensifer Medicae And Alleviates Salt Stress in Alfalfa Plants. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 295–308. Doi:10.1111/Aab.12420.

Colonnella, M. A., Lizarraga, L., Rossi, L., Díaz Peña, R., Egoburo, D., López, N. I., & Iustman, L. J. R. (2018). Effect of copper on diesel degradation in *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*. doi:10.1007/s00792-018-1063-2.

Coral, M. U., Korkmaz, H., Arikan, B., & Coral, G. (2005). Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. *Annals of Microbiology*, 55(3), 175.

Costa, L. E. de O., Queiroz, M. V. de, Borges, A. C., Moraes, C. A. de, & Araújo, E. F. de. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562–1575. doi:10.1590/s1517-83822012000400.

da Silva, A. A., de Oliveira, J. A., de Campos, F. V., Ribeiro, C., dos Santos Farnese, F., & Costa, A. C. (2018). Phytoremediation potential of *Salvinia molesta* for arsenite contaminated water: role of antioxidant enzymes. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 30(4), 275-286.

Das, S., & Goswami, S. (2017). Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1363-1371.

Das, S., & Mazumdar, K. (2016). Phytoremediation potential of a novel fern, *Salvinia cucullata*, Roxb. Ex Bory, to pulp and paper mill effluent: Physiological and Anatomical Response. *Chemosphere*, 163, 62-72.

de Carvalho, M. S., Ribeiro, K. D., Moreira, R. M., & de Almeida, A. M. (2017). Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis*, 1(3), 37-41.

de Freitas, F., Battirola, L. D., & de Andrade, R. L. T. (2018). Adsorption of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> Ions by *Pontederia rotundifolia* (Lf)(Pontederiaceae) and *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae) Biomass. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229 (11), 349.

de Souza, T. D., Borges, A. C., Braga, A. F., Veloso, R. W., & de Matos, A. T. (2019). Phytoremediation of arsenic-contaminated water by *Lemna valdiviana*: an optimization study. *Chemosphere*.

Demarco, C. F., Afonso, T. F., Pieniz, S., Quadro, M. S., Camargo, F. A. D. O., & Andreazza, R. (2019). Phytoremediation of heavy metals and nutrients by the *Sagittaria montevidensis* into an anthropogenic contaminated site at Southern of Brazil. *International Journal of Phytoremediation*, 1-8.

- Díez, E. G., Corella, J. P., Adatte, T., Thevenon, F., & Loizeau, J. L. (2017). High-resolution reconstruction of the 20th century history of trace metals, major elements, and organic matter in sediments in a contaminated area of Lake Geneva, Switzerland. *Applied Geochemistry*, 78, 1-11.
- Díez-Méndez, A., & Rivas, R. (2017). Improvement of saffron production using *Curtobacterium herbarum* as a bioinoculant under greenhouse conditions. *Aims Microbiol*, 3, 354-364.
- Döbereiner Johana. (1999). Protocolos Para Preparo De Meios De Cultura Da Embrapa Agrobiologia. Documento N O 110 P. 38.0104-6187.
- Dolkar, D., Dolkar, P., Angmo, S., Chaurasia, O. P., & Stobdan, T. (2018). Stress tolerance and plant growth promotion potential of *Enterobacter ludwigii* PS1 isolated from Seabuckthorn rhizosphere. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 438443. doi:10.1016/j.bcab.2018.04.012.
- Donatus, M. (2016). Removal of heavy metals from Industrial Effluent using *Salvinia molesta*. *Int. J. Chem. Tech. Res*, 9-608.
- Esteves, F. D. A. (2011). *Fundamentos de Limnologia*. 3ª edição. Interciência, Rio de Janeiro.
- Estrella-Gómez, N. E., Sauri-Duch, E., Zapata-Pérez, O., & Santamaría, J. M. (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb<sup>2+</sup> damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 188-194.
- Etesami, H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 175-191.
- Fabrizio, F., & Rodolfo, C. (2012). The response of benthic foraminiferal assemblages to copper exposure: a pilot mesocosm investigation. *Journal of Environmental Protection*, 3 (04), 342.
- Favas, P. J., Pratas, J., Rodrigues, N., D'Souza, R., Varun, M., & Paul, M. S. (2018). Metal (loid) accumulation in aquatic plants of a mining area: Potential for water quality biomonitoring and biogeochemical prospecting. *Chemosphere*, 194, 158-170.
- Fernandes, K. D., Cañote, S. J. B., Ribeiro, E. M., Thiago Filho, G. L., & Fonseca, A. L. (2018). Can we use Cd-contaminated macrophytes for biogas production? *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.
- Filyarovskaya, V., Sitarska, M., Traczewska, T., & Wolf, M. (2017). Microbiological stimulation of phytoremediation process using *Salvinia natans* to mercury contaminated water. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 22, p. 00047). EDP Sciences.
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), E1157-E1165.
- Fraile, García Menéndez, Paula; Esther; Rivas, Raúl. (2015) Role of Bacterial Biofertilizers. In *Agriculture and Forestry*. *Aims Bioengineering* V. 2, N. 3, P. 183– 205.
- Freitas, F., Lunardi, S., Souza, L. B., Von der Osten, J. S. C., Arruda, R., Andrade, R. L. T., & Battirola, L. D. (2018). Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(1), 133-139.

Gao, S., Yan, R., Cao, M., Yang, W., Wang, S., & Chen, F. (2008). Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant Soil Environment*, 54(3), 117-122.

Gelvin, A.B. (2003). *Agrobacterium* and Plant Genes Involved In T-Dna Transfer and Integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, V. 51, P. 223-256.

Ghanem, H., Chalak, L., & Baydoun, S. (2019). Phytoremediation of Lebanese polluted waters: a review of current initiatives. In *MATEC Web of Conferences* (Vol. 281, p. 03007). EDP Sciences.

Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S., & Lam, E. (2018). Bacterial Production of Indole Related Compounds Reveals Their Role in Association Between Duckweeds and Endophytes. *Frontiers in Chemistry*, 6. Doi:10.3389/Fchem.2018.00265.

Giri, N., & Joshi, N. C. (2010). Growth and yield response of chick pea (*Cicer arietinum*) to seed inoculation with *Rhizobium* sp. *Nature and Science*, 8(9), 232-236.

Gunatilake S (2015) Methods of removing heavy metals from industrial wastewater. *J Multidiscip Eng Sci Stud* 1:2912–1309.

Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71.

Gupta, P., Kumar, V., Usmani, Z., Rani, R., Chandra, A., & Gupta, V. K. (2019). A comparative evaluation towards the potential of *Klebsiella* sp. and *Enterobacter* sp. in plant growth promotion, oxidative stress tolerance and chromium uptake in *Helianthus annuus* (L.). *Journal of Hazardous Materials*. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.05.054.

Gupta, P., Protim Das, P., Mubarak, M., & Shaija, A. (2018). Performance and Emission Analysis of Single Cylinder Si Engine Using Bioethanol Gasoline Blend Produced from *Salvinia molesta*. *Iop Conference Series: Materials Science and Engineering*, 297, 012005. Doi:10.1088/1757-899x/297/1/012005.

Herrera, S. D., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M. D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 186, 37-43.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit).

Hussain, N., Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2016). Vermiremediation of an invasive and pernicious weed salvinia (*Salvinia molesta*). *Ecological Engineering*, 91, 432-440.

Hussain, N., Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2017). Generation of Highly Potent Organic Fertilizer from *Pernicious Aquatic Weed Salvinia molesta*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(5), 4989–5002. Doi:10.1007/S11356-017-0826-0.

Iha, D. S., & Bianchini Jr, I. (2015). Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 929-935.

Intorne, A. C., de Oliveira, M. V. V., Lima, M. L., da Silva, J. F., Olivares, F. L., & de Souza Filho, G. A. (2009). Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*, 191(5), 477-483.

Irawati, W., Parhusip, A. J. N., Sopiha, N., & Trunay, J. A. (2017). The Role of Heavy Metals-Resistant Bacteria *Acinetobacter* sp. in Copper Phytoremediation using *Eichhornia crasippes* [(Mart.) Solms]. *KnE Life Sciences*, 3(5), 208-220.

Ishizawa, H., Kuroda, M., Inoue, K., Inoue, D., Morikawa, M., & Ike, M. (2019). Colonization and Competition Dynamics of Plant Growth-Promoting/Inhibiting Bacteria in the Phytosphere of the Duckweed *Lemna minor*. *Microbial Ecology*, 77(2), 440-450.

Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., & Ike, M. (2017). Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnology for Biofuels*, 10 (1), 62.

Jackson, E. E., Masood, N., Ibrahim, K., Urvoy, N., Hariri, S., & Forsythe, S. J. (2015). Description of *Siccibacter colletis* sp. nov., a novel species isolated from plant material, and emended description of *Siccibacter turicensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(4), 1335-1341.

Jampeetong, A., Brix, H., & Kantawanichkul, S. (2012). Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (*Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*). *Aquatic Botany*, 97(1), 10-16.

Jha, C. K., Patel, B., & Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 891-899. doi:10.1007/s11274-011-0886-0.

Juned M, Ahmaruzzaman M (2016) A review on potential usage of industrial waste materials for binding heavy metal ions from aqueous solutions. *J Water Process Eng* 10:39-47.

Kabata-Pendias, A. (2000). Trace elements in soils and plants. CRC press.

Khalifa, A. Y., Alsyeeh, A. M., Almalki, M. A., & Saleh, F. A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23 (1), 79-86.

Khanghahi, M. Y., Ricciuti, P., Allegretta, I., Terzano, R., & Crecchio, C. (2018). Solubilization of insoluble zinc compounds by zinc solubilizing bacteria (ZSB) and optimization of their growth conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-018-2638-2.

Kiran, M. G., Pakshirajan, K., & Das, G. (2017). Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: mechanism and cell surface characterization. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 62-70.

Kiran, M. G., Pakshirajan, K., & Das, G. (2018). Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: mechanism and process optimization. *Journal of Environmental Management*, 218, 486-496.

La Torre-Ruiz, D., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rincón-Molina, C. I., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Gutiérrez-Miceli, F. A., & Rincón-Rosales, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 587-596.

Lal, S., Kumar, R., Ahmad, S., Dixit, V. K., & Berta, G. (2019). Exploring the survival tactics and plant growth promising traits of root-associated bacterial strains under Cd and Pb stress: A modelling based approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 267-277.

Leal-Alvarado, D. A., Estrella-Maldonado, H., Sáenz-Carbonell, L., Ramírez-Prado, J. H., Zapata-Pérez, O., & Santamaría, J. M. (2018). Genes coding for transporters showed a rapid and sharp increase in their expression in response to lead, in the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 1056-1064.

Lee, J. H., Kim, Y. G., Baek, K. H., Cho, M. H., & Lee, J. (2015). The multifaceted roles of the interspecies signalling molecule indole in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1234-1244.

Li, C., Wang, M., Luo, X., Liang, L., Han, X., & Lin, X. (2019). Accumulation and effects of uranium on aquatic macrophyte *Nymphaea tetragona* Georgi: Potential application to phytoremediation and environmental monitoring. *Journal of Environmental Radioactivity*, 198, 43-49.

Li, H., Zhang, G.C., Xiew, H.C., Li, K., Zhang, S.Y., (2015). The effects of the phenol concentrations on photosynthetic parameters of *Salix babylonica* L. *Photosynthetica* 53, 430-435.

Li, Y., Wang, Q., Wang, L., He, L.-Y., & Sheng, X.-F. (2016). Increased growth and root Cu accumulation of *Sorghum sudanense* by endophytic *Enterobacter* sp. K3-2: Implications for *Sorghum sudanense* biomass production and phytostabilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 163-168. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.10.012.

Liang, Y., Chen, J. Q., Mei, J., Chang, J. J., Wang, Q. Y., Wan, G. S., & Yin, B. Y. (2018). Characterization of Cu and Cd biosorption by *Pseudomonas* sp. strain DC-B3 isolated from metal mine soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. doi:10.1007/s13762-018-2011-5.

Liu, N., Zhong, G., Zhou, J., Liu, Y., Pang, Y., Cai, H., & Wu, Z. (2018). Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All. *Science of The Total Environment*, 655, 1448-1456.

Lizieri, C., Aguiar, R., & Kuki, K. N. (2011). Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrhiza*. *Rodriguésia*, 62(4), 909-917.

Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G. S., Ruiz, J. C., Blom, J., Horácio, E. C., & de Queiroz, M. V. (2017). Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 185.

Loría, K. C., Emiliani, J., Bergara, C. D., Herrero, M. S., Salvatierra, L. M., & Pérez, L. M. (2019). Effect of daily exposure to Pb-contaminated water on *Salvinia biloba* physiology and phytoremediation performance. *Aquatic Toxicology*, 210, 158-166.

Lu, B., Xu, Z., Li, J., & Chai, X. (2018). Removal of water nutrients by different aquatic plant species: An alternative way to remediate polluted rural rivers. *Ecological Engineering*, 110, 18-26.

Lu, D., Huang, Q., Deng, C., & Zheng, Y. (2018). Phytoremediation of Copper Pollution by Eight Aquatic Plants. *Polish Journal of Environmental Studies*, 27(1).

Ma, L., Zhang, H.-Y., Zhou, X.-K., Yang, C.-G., Zheng, S.-C., Duo, J.-L., & Mo, M.-H. (2018). Biological control tobacco bacterial wilt and black shank and root colonization by bio-organic fertilizer containing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29. *Applied Soil Ecology*, 129, 136-144. doi:10.1016/j.apsoil.2018.05.011.

Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.

Machado, S. A., Oliveira, A. V., Fabrin, T. M. C., Prioli, S. M. A. P., & Prioli, A. J. (2016). Molecular characterization of the species *Salvinia* (Salviniaceae) from the upper Paraná River floodplain. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15(3).

Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria From Wheat Rhizosphere and Their Effect On Plant Growth Promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6. Doi:10.3389/Fmicb.2015.00198.

Manzoor, M., Abbasi, M. K., & Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*, 34(1), 81-95.

Manzoor, M., Abid, R., Rathinasabapathi, B., De Oliveira, L. M., da Silva, E., Deng, F., Ma, L. Q. (2019). Metal tolerance of arsenic resistant bacteria and their ability to promote plant growth of *Pteris vittata* in Pb contaminated soil. *Science of The Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.013.

Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P. K., Soren, T., & Maiti, T. K. (2018). Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 183-196. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.001.

Morad, M., Sara, S., Alireza, E., Reza, C. M., & Mohammad, D. (2013). Effects of seed inoculation by *Rhizobium* strains on yield and yield components in common bean cultivars *Phaseolus vulgaris* L.. *Int. J. Biosci*, 3, 134-141.

Mubarak, M. Gupta, Priyank, Shailja, A. Suchithra T. V. (2017). Production of bioethanol from *Salvinia molesta* and its utilization in single cylinder si engine. *Journal of Advanced Engineering Research* Issn: 2393-8447 Volume 4, Issue 1, Pp.67-72.

Muthusaravanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1339-1359.

Nahampun, H. N., López-Arredondo, D., Xu, X., Herrera-Estrella, L., & Wang, K. (2016). Assessment of ptxD gene as an alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. *Plant Cell Reports*, 35(5), 1121-1132.

Naqqash, T., Hameed, S., Imran, A., Hanif, M. K., Majeed, A., & van Elsas, J. D. (2016). Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 7, 144.

Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* Ps JN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30-39.

Nawapan, S., Charoenlap, N., Charoenwuttitam, A., Saenkham, P., Mongkolsuk, S., & Vattanaviboon, P. (2009). Functional and expression analyses of the cop operon, required for copper resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 191(16), 5159-5168.

Naz, I., & Bano, A. (2012). Assessment of phytohormones producing capacity of *Stenotrophomonas maltophilia* ssa and its interaction with *Zea mays* L. *Pak. J. Bot*, 44(1), 465-469.

Naz, T., Khan, M. D., Ahmed, I., Rehman, S. ur, Rha, E. S., Malook, I., & Jamil, M. (2016). Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. *Toxicology and Industrial Health*, 32(9), 1619-1627. doi:10.1177/0748233715569900.

Ndeddy Aka, R. J., & Babalola, O. O. (2015). Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, 18(2), 200-209.

Ng, Y. S., & Chan, D. J. C. (2017). Phytoremediation capabilities of *Spirodela polyrhiza*, *Salvinia molesta* and *Lemna* sp. in synthetic wastewater: a comparative study. *International Journal of Phytoremediation*, 20(12), 1179-1186.

Nyoki, D., & Ndakidemi, P. A. (2018). *Rhizobium* inoculation reduces P and K fertilization requirement in corn-soybean intercropping. *Rhizosphere*, 5, 51-56.

O'Hare, M. T., Baattrup-Pedersen, A., Baumgarte, I., Freeman, A., Gunn, I. D., Lázár, A. N., & Bowes, M. J. (2018). Responses of aquatic plants to eutrophication in rivers: a revised conceptual model. *Frontiers in Plant Science*, 9, 451.

Ortega-Acosta, O., Rodríguez-Tovar, A. V., López-López, E., & Rodríguez-Tovar, A. (2015). Characterization of indole acetic acid endophyte producers in autochthonous *Lemna gibba* plants from Xochimilco Lake. *African Journal of Biotechnology*, 14(7), 604-611.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391.

Panfili, I., Bartucca, M. L., Ballerini, E., & Del Buono, D. (2017). Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. *Science of the Total Environment*, 601, 1263-1270.

PELCZAR Jr, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R.; *Microbiology: concepts and applications*. Mc Graw Hill; 1993; 75-76 pp.

Perin, L. (2007). Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*.

Pietrangolo, L., Bucci, A., Maiuro, L., Bulgarelli, D., & Naclerio, G. (2018). Unraveling the Composition of The Root-Associated Bacterial Microbiota of *Phragmites Australis* and *Typha Latifolia*. *Frontiers in Microbiology*, 9. Doi:10.3389/Fmicb.2018.01650.

Pokojska-Burdziej A, Strzelczyk E, Dahm H, Li Cy. Effect of Endophytic Bacterium *Pseudomonas fulva* on Growth of Pine Seedlings *Pinus Sylvestris*, Formation of Mycorrhizae and Protection Against Pathogens. *Phytopatol Pol* 2004; 32:33–47.

Prado, C., Ponce, S. C., Pagano, E., Prado, F. E., & Rosa, M. (2016). Differential physiological responses of two *Salvinia* species to hexavalent chromium at a glance. *Aquatic Toxicology*, 175, 213-221.

Prado, C., Prado, F. E., Pagano, E., & Rosa, M. (2015). Differential Effects of Cr (VI) On the Ultrastructure of Chloroplast and Plasma Membrane of *Salvinia mimima* Growing in Summer and Winter. Relationships With Lipid Peroxidation, Electrolyte Leakage, Photosynthetic Pigments, and Carbohydrates. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226 (2). Doi:10.1007/S11270-014- 2284-3.

Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., and Lebsky, V. K. (2004). Microbial Populations and Activities in The Rhizoplane of Rock-Weathering Desert Plants. I. Root Colonization and Weathering of Igneous Rocks. *Plant Biol. (Stuttg.)* 6, 629–642. Doi: 10.1055/S-2004-821100.

Qaisrani, M.M., Mirza, M.S., Zaheer A. Malik, K.A. (2014). Isolation and Identification By 16s Rrna Sequence Analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* Strains from The Rhizosphere of Maize And Screening For The Beneficial Effect On Plant Growth. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 51(1), 91-99; Issn (Print) 0552-9034, Issn (Online) 2076-0906

Radzali, N. R. S. M., Kadir, W. R. W. A., Shariff, S. M., Nawahwi, M. Z., Wakid, S. A., Jaafar, Z., & Rahim, M. I. (2015). Phytoremediation: environmental-friendly clean up method. *World*, 5(2), 16-22.

- Rehan, W., Jan, A., Liaqat, W., Jan, M. F., Ahmadzai, M. D., Ahmad, H., & Ali, N. (2018). 5. Effect of phosphorous, rhizobium inoculation and residue types on chickpea productivity. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 7(4), 1203-1213.
- Rezania, S., Taib, S. M., Din, M. F. M., Dahalan, F. A., & Kamyab, H. (2016). Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 587-599.
- Rodrigues Neto, J. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol*, 12, 16.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M. Del C., Macías-Rodríguez, L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas Stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* Cr71 Endophytes Produce Antifungal Volatile Organic Compounds and Exhibit Additive Plant Growth-Promoting Effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 46–52. Doi:10.1016 /J. Bcab.2017.11.007.
- Rosier, A., Medeiros, F. H. V., & Bais, H. P. (2018). Defining Plant Growth Promoting Rhizobacteria Molecular and Biochemical Networks in Beneficial Plant-Microbe Interactions. *Plant and Soil*, 428(1-2), 35–55. Doi:10.1007/S11104-018-3679-5.
- Sagripanti, J. L. (2018). DNA damage mediated by metal ions with special reference to copper and iron. In *Metal ions in biological systems* (pp. 179-209). Routledge.
- Samain, E., Van Tuinen, D., Jeandet, P., Aussenac, T., & Selim, S. (2017). Biological Control of Septoria Leaf Blotch and Growth Promotion In *Wheat* By *Paenibacillus* sp. Strain B2 and *Curtobacterium Plantarum* Strain Eds. *Biological Control*, 114, 87-96. Doi:10.1016 /J.Biocontrol. 2017.07.012.
- San Juan, M. R. F., Albornoz, C. B., Larsen, K., & Najle, R. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in *Limnobium laevigatum* and *Ludwigia peploides*: their phytoremediation potential in water contaminated with heavy metals. *Environmental Earth Sciences*, 77(11), 404.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. Doi:10.1016 /J.Micres. 2015.11.008.
- Sarkar, A., Ghosh, P. K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S. Maiti, T. K. (2018). A Halotolerant *Enterobacter* sp. Displaying Acc Deaminase Activity Promotes Rice Seedling Growth Under Salt Stress. *Research In Microbiology*, 169(1), 20-32. Doi:10.1016 /J. Resmic.2017.08.005.
- Sarwar, M.; Kremer, R.J. (1995). Enhanced Suppression of Plant Growth Through Production Of L-Tryptophan-Derived Compounds by Deleterious Rhizobacteria. *Plant and Soil*, V.172, N.2, P.261–269.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1), 25-41.
- Shabanamol, S., Divya, K., George, T. K., Rishad, K. S., Sreekumar, T. S., & Jisha, M. S. (2018). Characterization and In Planta Nitrogen Fixation of Plant Growth Promoting Endophytic Diazotrophic *Lysinibacillus Sphaericus* Isolated from Rice (*Oryza Sativa*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 46–54. Doi:10.1016 /J.Pmpp. 2017.11.003.
- Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S., And Van Elsas, J. D. (2012). Root Colonization and Growth Promotion of Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) By Phosphate Solubilizing *Enterobacter* Sp. Fs-11. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2749–2758. Doi: 10.1007/S11274-012-1086-2.

Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria For Sustainable Agricultural Practices With Special Reference To Biotic And Abiotic Stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 603-615. Doi:10.1007/S10725-017-0365-1.

Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 603-615.

Sharaff, M., Kamat, S., & Archana, G. (2017). Analysis of copper tolerant rhizobacteria from the industrial belt of Gujarat, western India for plant growth promotion in metal polluted agriculture soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 113–121. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.12.023

Shehzadi, M., Fatima, K., Imran, A., Mirza, M. S., Khan, Q. M., & Afzal, M. (2015). Ecology of bacterial endophytes associated with wetland plants growing in textile effluent for pollutant-degradation and plant growth-promotion potentials. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(6), 1261-1270.

Shen, G., Ju, W., Liu, Y., Guo, X., Zhao, W., & Fang, L. (2019). Impact of Urea Addition and *Rhizobium* Inoculation on Plant Resistance in Metal Contaminated Soil. *International journal of environmental research and public health*, 16(11), 1955.

Sitarska, M., Traczewska, T., & Filyarovskaya, V. (2016). Removal of mercury (II) from the aquatic environment by phytoremediation. *Desalination and Water Treatment*, 57(3), 1515-1524.

Sivamani, E., Li, X., Nalapalli, S., Barron, Y., Prairie, A., Bradley, D., & Que, Q. (2015). Strategies to improve low copy transgenic events in *Agrobacterium* mediated transformation of maize. *Transgenic research*, 24(6), 1017-1027.

Subrahmanyam, G., Sharma, R. K., Kumar, G. N., & Archana, G. (2018). *Vigna Radiata* Var. Gm4 Plant Growth Enhancement and Root Colonization by A Multi-Metal-Resistant Plant Growth-Promoting Bacterium *Enterobacter* sp. C1d in Cr (VI) Amended Soils. *Pedosphere*, 28(1), 144-156. Doi:10.1016/S1002-0160(17)60448-X.

Sun, S., Kang, X.-P., Xing, X.-J., Xu, X.-Y., Cheng, J., Zheng, S.-W., & Xing, G.-M. (2015). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*l. Cv. Hezuo

Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., & Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 41-44.

Syaichurrozi, I. (2018). Biogas production from co-digestion *Salvinia molesta* and rice straw and kinetics. *Renewable Energy*, 115, 76-86.

Syranidou, E., Christofilopoulos, S., & Kalogerakis, N. (2017). *Juncus* spp. The helophyte for all (phyto) remediation purposes?. *New biotechnology*, 38, 43-55.

Tang, J., Zhang, Y., Cui, Y., & Ma, J. (2015). Effects of a *rhizobacterium* on the growth of and chromium remediation by *Lemna minor*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 9686-9693.

Tatar, S., Obek, E., Arslan Topal, E. I., & Topal, M. (2019). Uptake of Some Elements with Aquatic Plants Exposed to the Effluent of Wastewater Treatment Plant Pollution, 5(2), 377-386.

Tello Zevallos, W., Matías Salvatierra, L., Loureiro, D. B., Morató Farreras, J., & Martín Pérez, L. (2018). Evaluation of the autochthonous free-floating macrophyte *Salvinia biloba* Raddi for use in the phytoremediation of water contaminated with lead. *Desalination and Water Treatment*, 103, 282-289.

- Uzair, B., Kausar, R., Bano, S. A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U., & Fasim, F. (2018). Isolation and molecular characterization of a model antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging in vitro plant growth promoting characteristics. *BioMed Research International*, 2018.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 127-141.
- Vilaça, D., Jacob, I. S. V. Alves, S. G. (2011). Diagnóstico Ambiental Preliminar De Oito Lagoas De Tabuleiro Da Região Norte Fluminense. *Boletim Do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos Dos Goytacazes/Rj*, V. 5 N. 1, P. 131-145, Jan/ Jun 2011.
- Vimal, S. R., Patel, V. K., & Singh, J. S. (2018). Plant Growth Promoting *Curtobacterium albidum* Strain Srv4: An Agriculturally Important Microbe to Alleviate Salinity Stress in Paddy Plants. *Ecological Indicators*. Doi:10.1016/J.Ecolind.2018.05.014.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR533-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 50–56. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.05.040.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16s Ribosomal Dna Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. Doi:10.1128/Jb.173.2.697-703.1991.
- Widawati, S. (2019, August). The application of *Klebsiella* sp. and *Rhizobium radiobacter* as biofertilizer and Palm Oil Mills Effluent (POME) as organic fertilizer on growth of *Paraserianthes falcataria*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 308, No. 1, p. 012057). IOP Publishing.
- Yamakawa, Y., Jog, R., & Morikawa, M. (2018). Effects of co-inoculation of two different plant growth-promoting bacteria on duckweed. *Plant growth Regulation*, 86(2), 287-296.
- Yang, Y., Ma, T., Ding, F., Ma, H., Duan, X., Gao, T., & Yao, J. (2017). Interactive zinc, iron, and copper-induced phytotoxicity in wheat roots. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 395-404.
- Yaro, A. S., Al-Hassani, M. H., & Rasheed, H. A. (2015). Copper biosorption using local Iraqi natural agents. *Desalination and Water Treatment*, 54(2), 533-539.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium Frank* 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.
- Zhang, L. M., Alpert, P., Si, C., & Yu, F. H. (2019). Interactive effects of fragment size, nutrients, and interspecific competition on growth of the floating, clonal plant *Salvinia natans*. *Aquatic Botany*, 153, 81-87.

Zhang, L., Hu, C., Ye, W., Zhu, D., Yu, Z., Zhuo, R., & Sun, M. (2008). The copper resistant bacterium ACU isolated from the rhizosphere of *Eichhornia crassipes* (Mart.) increased the endurance of *Potamogeton crispus* L. to copper toxicity. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1034-1.

Zhao, F., Li, P., Guo, C., Shi, R. J., & Zhang, Y. (2018). Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection. *Bioresource Technology*, 251, 295-302.

Zhao, L., Xu, Y., Lai, X. H., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 977-989.