

REDUÇÃO DA ABSORÇÃO DE COBRE E MANGANÊS EM SOLUÇÃO, POR TRIGO INFECTADO COM *PSEUDOMONAS* SP

MARCIO VOSS² e ROBERT WAYNE STEPHEN PHILLIP THOMAS³

RESUMO - A capacidade de diversos microorganismos em adsorver metais em solução foi demonstrada, mas o significado desse fenômeno sobre a nutrição das plantas não tem sido avaliado. O presente estudo foi feito com esse objetivo, observando a absorção dos íons cobre e manganês por trigo (*Triticum aestivum* L.), cultivares Anahuac e BR 35 na presença de uma *Pseudomonas* isolada de rizosfera de trigo. A concentração desses metais no tecido do trigo foi determinada por digestão nitroperclórica e espectrofotometria de absorção atômica, em plantas com 18 dias da germinação, após dois dias em contato com solução exclusiva de CuCl_2 ou MnCl_2 . A inoculação de *Pseudomonas* sp. diminuiu a concentração de Cu^{2+} e Mn^{2+} no tecido das plântulas em cerca de 70% e 35%, respectivamente, nas duas cultivares. Esse efeito foi atribuído à competição das bactérias com as plantas por esses metais, através de processos de sorção desses metais, especialmente pela adsorção à parede bacteriana.

Termos para indexação: interação planta x microorganismo, micronutrientes, toxidez, hidroponia, adsorção de metais.

REDUCTION IN THE ABSORPTION OF COPPER AND MANGANESE IN SOLUTION BY WHEAT CULTIVARS INOCULATED WITH A *PSEUDOMONAS* SP.

ABSTRACT - The capacity of several microorganisms to adsorb metals from solution was demonstrated, but the implication of these phenomenon on the wheat nutrition hasn't been evaluated. The present study had this objective, observing the absorption of copper and manganese ions by wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars Anahuac and BR 35 in the presence of a *Pseudomonas* isolated from wheat rhizosphere. The concentration of these metals in the tissue of wheat was determined by nitroperchloric and spectrophotometry of atomic absorption, in the above-ground parts of 18-day old wheat plants, after 2 days in contact with an exclusive solution of CuCl_2 or MnCl_2 . The inoculation with *Pseudomonas* sp. reduced the concentrations of Cu^{2+} and Mn^{2+} in the tissue of seedlings by 70% and 35%, respectively, in the two cultivars. Such effect was attributed to the competition of the bacteria with the plants for these metals, through sorption process, specially by the adsorption to the bacterial wall.

Index terms: plant x microorganism interaction, micronutrients, toxicity, hidropony, metal adsorption.

INTRODUÇÃO

As formas mais conhecidas de interferência dos microorganismos sobre a disponibilidade de nutri-

Aceito para publicação em 25 de fevereiro de 1998.

Realizado com o apoio financeiro da FAPERGS.

² Eng. Agr., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), Caixa Postal 451, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: voss@cnpt.embrapa.br

³ Biólogo, Prof. visitante, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS.

entes para as plantas são a incorporação de nutrientes na sua biomassa e a liberação de nutrientes excedentes à sua demanda, durante os processos de decomposição da matéria orgânica. Entre as outras formas de interferência, está a adsorção de cátions em radicais das paredes microbianas. Esse fenômeno tem dois tipos de expressão: o estequiométrico e o de precipitação (Beveridge, 1989). Quantidades apreciáveis de cátions, especialmente os metálicos, têm sido encontradas em envoltórios celulares de microorganismos, e a importância da adsorção tem

sido realçada pelas evidências de seu papel na formação de depósitos geológicos de metais e pelo emprego de microorganismos em filtros biológicos.

O efeito desse fenômeno sobre a disponibilidade de macronutrientes para as plantas não deve ser relevante, em consequência da quantidade desses elementos no solo. Porém, com cátions presentes em pequena quantidade na solução do solo, tanto a adsorção quanto a imobilização na biomassa microbiana podem provocar deficiências desses minerais nas plantas (Tan & Loutit, 1976; Stevenson, 1982). A imobilização e especialmente a adsorção devem ser mais intensas em determinados sítios em que ocorrem mais microorganismos, como em resíduos orgânicos facilmente decomponíveis (Gray & Williams, 1971), e na rizosfera (Dommerges, 1978). Em solo salino, foi obtida a diminuição de Na^+ , mediante o emprego de condicionadores, e, dentre esses, o composto orgânico foi o mais efetivo, proporcionando melhoria no índice de germinação de sementes (Shokohifard et al., 1990). Estes autores testaram e comprovaram a hipótese de que o principal agente causal da diminuição de Na^+ fora a biomassa microbiana existente nesse composto. A capacidade de adsorção de Na^+ foi três a quatro vezes maior do que a de outros materiais orgânicos ou inorgânicos. Um caso em que a ação dos microorganismos rizosféricos implicou deficiência de micronutrientes para plantas foi estudado por Loutit & Brooks (1970) e por Tan & Loutit (1976), que determinaram a adsorção do molibdênio nos exopolissacarídeos de organismos rizosféricos de plantas deficientes nesse nutriente. Pela literatura existente, verifica-se que pouco se tem estudado sobre o efeito da adsorção de metais em microorganismos na disponibilidade de nutrientes para as plantas.

O presente ensaio teve como objetivo determinar a possível competição por Cu e Mn entre a absorção por plantas de trigo e a sorção por *Pseudomonas* sp. obtida da rizosfera de trigo.

MATERIALE MÉTODOS

A possibilidade de que a sorção de metais pela *Pseudomonas* sp. possa concorrer na absorção desses metais pelas plantas foi testada nas cultivares de trigo

Anahuac e BR 35, em condições assépticas em casa de vegetação, na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, em Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

Depois de duas semanas de desenvolvimento em solução nutritiva, as plântulas foram transferidas para tubos com soluções exclusivas de Cu^{2+} ou de Mn^{2+} , e mantidas aí, infectadas ou não com *Pseudomonas* sp., por dois dias. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para verificar o carreamento de Cu ou de Mn pelas plantas ou pelas bactérias, os tratamentos foram comparados a controles em água, com e sem inoculação.

Obtenção das plântulas

As sementes utilizadas pesavam entre 38 e 42 miligramas. A desinfestação foi feita por um minuto de imersão em álcool 95%, seguida por imersão, durante três minutos em hipoclorito de sódio (2%) e seis enxágües com água destilada, deionizada e esterilizada. As sementes foram semeadas para a germinação em papel germiteste autoclavado e mantidas em ambiente a $19^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro.

O desenvolvimento das plântulas ocorreu em casa de vegetação, onde cerca de 150 plântulas de cada cultivar foram inseridas em malha de plástico, sustentada no nível da solução nutritiva por estrutura tubular de vidro, dentro de copo de béquer de 2 L de capacidade. A solução nutritiva A, de Hoagland & Arnon (1938), foi adicionada ao copo até volume de 1.800 mL, e foi renovada 7 e 11 dias após o plantio. Incluiu-se, a cada vez, ferro complexado com Na₂EDTA para obter-se concentração final de Fe de 1 mg g^{-1} . A aeração da solução foi feita por dois tubos de vidro interligados por mangueira de silicone a um compressor de ar. Uma mecha apertada de algodão estéril foi colocada na ponta de vidro fora de contato com a solução, para filtrar microorganismos e poeira do ar.

A solução nutritiva e todo o material que entrou em contato com ela foram autoclavados. Dois conjuntos, como o descrito acima, foram preparados para cada cultivar de trigo. O conjunto de copos ficou coberto a 50 cm de altura por plástico transparente, para evitar gotas de condensação e poeira. A parede do copo foi recoberta com papel para diminuir a incidência de luz nas raízes. A iluminação solar foi completada por quatro lâmpadas de luz fluorescente branca (Phillips 40 W/75RS), que permaneceram ligadas constantemente.

Plantio definitivo

Após 14 dias de crescimento, três plântulas de trigo foram transplantadas assepticamente para cada tubo de

ensaio, de 20 mm x 200 mm, contendo 30 mL de água destilada, deionizada e esterilizada. As plântulas da cultivar Anahuac apresentavam 51 cm de comprimento das três folhas e 97 cm das raízes, e as da BR 35, 47,5 cm de comprimento das três folhas, e 90,5 cm das raízes.

Após 19 horas, aproximadamente, substituiu-se a água por 30 mL de solução 0,165 mmol.L⁻¹ de Cu²⁺ ou de Mn²⁺ esterilizada, ou renovou-se a água, conforme os tratamentos.

A aeração foi feita através de borracha de silicone com ponteira de vidro, imersa até o fundo do tubo de ensaio. A entrada de ar na ponta superior do tubo, na junção com a mangueira de silicone, foi forçada por mecha de algodão. Através de temporizador, foram intercalados turnos de 15 minutos de aeração vigorosa e 45 minutos sem aeração.

Inoculante e inoculação

O inoculante constituiu-se da bactéria *Pseudomonas* sp., obtido por incubação em caldo tripton-aitona (CTS), com 10 g de tripton e 2 g de aitona, por 14 horas, a 23°C ± 1°C, pH inicial de 6,5 e final de 7,6. Mediante centrifugação, por três vezes, para retirar o caldo de cultura conforme descrito em Voss (1993), obteve-se a suspensão bacteriana, com 9,6 mg.mL⁻¹, com base em peso seco, mantida à temperatura de 4 a 7°C, por cerca de 18 horas antes de ser usada. Adicionaram-se 2 mL da suspensão bacteriana a cada parcela dos tratamentos com inoculação, fornecendo uma concentração final de 0,6 mg de biomassa de *Pseudomonas*, com base em peso seco, para cada mL de solução.

Determinações nas plantas

Após a colheita, determinou-se o peso da parte aérea da raiz, tomando-se por base a massa seca (72 horas a 60°C). As quantidades de Cu²⁺ e de Mn²⁺ da parte aérea foram obtidas por digestão nitroperclórica e leitura de absorção atômica, conforme descrito em Tedesco et al. (1985). O volume de solução remanescente nos tubos com três plântulas foi medido com proveta e o consumo de solução obtido por diferença do volume inicial.

Controle de pH, temperatura e umidade relativa

O ajuste do pH inicial das parcelas a 5,5, bem como o acompanhamento e retificação durante os dois dias do teste, foram feitos em repetições adicionais de cada tratamento, para evitar contaminações nos tratamentos. O monitoramento foi feito a cada 5 horas com peagômetro

manual, e, na retificação, usou-se solução 0,001 N de HCl esterilizada, até obter o retorno ao pH 5,5.

A temperatura e a umidade relativa foram registradas, durante o experimento, em termogrômetro. Nos dias do teste de sorção de Cu²⁺ e Mn²⁺, 9, 10 e 11 de julho de 1992, as temperaturas máximas foram 27°C, 32°C e 29°C, e as mínimas 8°C, 10°C e 12°C, respectivamente; a umidade relativa do ar oscilou entre 90% e 48%, 92% e 40%, e 92% e 45%, respectivamente, e a insolação, obtida no Posto Meteorológico da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, em Passo Fundo, foi de 5,5; 9,4 e 9,5 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos tratamentos com inoculação da bactéria, observou-se redução da absorção de Cu ou de Mn pelo trigo, em ambas as cultivares (Tabelas 1 e 2). O trigo infectado absorveu cerca de 31% do Cu em relação à concentração detectada no trigo não infectado. No tratamento com Mn e em presença da bactéria, a absorção desse cátion foi de 73% na cv. Anahuac, e de 55% na cv. BR 35, em relação às concentrações de Mn encontradas nas plântulas sem inoculação. No ensaio em branco, verificou-se que não houve alteração do teor de Cu ou de Mn na parte aérea das plântulas em virtude da inclusão da bactéria. O cobre, nos tratamentos sem esse metal, não foi detectado no tecido de trigo, pelo método analítico empregado. Mas o Mn, nos tratamentos sem adição desse metal, foi encontrado em concentração média de 25,3 mg.g⁻¹, indicando a sua presença prévia nas plântulas empregadas para os testes. Esse teor inicial de manganês nas plântulas não afetou a demonstração de competição observada nos tratamentos com Mn, nos quais a parte aérea das plântulas apresentou concentrações superiores em mais de dez vezes a esse teor inicial.

As cultivares Anahuac e BR 35 foram escolhidas por suas características de tolerância ao complexo de acidez do solo, sendo a Anahuac sensível, e a BR 35 mais tolerante. Os resultados obtidos não significam que o Mn, que faz parte desse complexo, seja igualmente absorvido pelas duas cultivares, e sim que o experimento não pôde discriminar essa característica.

A diminuição de absorção de Cu^{2+} e Mn^{2+} pelo trigo infectado pode ser atribuída, em grande parte, aos processos de sorção e, especialmente, ao de adsorção de metais pelos polímeros da parede celular das bactérias. O fenômeno de adsorção de metais nas paredes de microorganismos foi estudado por vários pesquisadores, que demonstraram substancial subtração de diversos metais em solução, inclusive de Cu^{2+} e Mn^{2+} , em quantidades variáveis com o tipo do microorganismo. Revisão sobre o tema pode ser encontrada em Beveridge (1989). A bactéria empregada neste ensaio possui capacidade de sorção de Cu^{2+} e de Mn^{2+} , conforme demonstrado por Voss (1993).

Os teores de Cu encontrados nos tecidos do trigo não infectado atingiram níveis considerados tóxicos.

TABELA 1. Efeito da inoculação de *Pseudomonas* sp. nas cultivares de trigo Anahuac e BR 35, nos teores de cobre na parte aérea de plântulas crescidas por 2 dias (entre 19 e 20 dias após germinação) em solução com 0,165 mmol.L⁻¹ de cobre. Média de quatro repetições¹.

Tratamento	Teor de cobre na parte aérea (µg.g ⁻¹)
Anahuac + cobre	134 a
Anahuac + cobre + inoculação	41 b
BR 35 + cobre	121 a
BR 35 + cobre + inoculação	39 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; C.V. = 23,85%.

TABELA 2. Efeito da inoculação de *Pseudomonas* sp. nas cultivares de trigo Anahuac e BR 35, nos teores de manganês na parte aérea de plântulas crescidas por 2 dias (entre 19 e 20 dias após germinação) em solução com 0,165 mmol.L⁻¹ de manganês. Média de quatro repetições¹.

Tratamento	Teor de manganês na parte aérea (µg.g ⁻¹)
Anahuac + manganês	450 a
Anahuac + manganês + inoculação	328 b
BR 35 + manganês	473 a
BR 35 + manganês + inoculação	261 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; C.V. = 8,69%.

Segundo Stevenson (1982), o teor normal de Cu se encontra entre 3 e 40 mg.g⁻¹. A inoculação de *Pseudomonas* manteve o teor de Cu na parte aérea dentro dos limites da normalidade, embora próximo ao limite superior. No período experimental, a toxidez em forma sintomática não foi manifestada, mas observou-se menor atividade metabólica pela menor evapotranspiração das plântulas tratadas com CuCl_2 . O consumo de solução ou água no tratamento cobre + inoculação foi maior do que no não inoculado (Tabela 3).

Os teores de Mn na parte aérea estão dentro da faixa considerada normal em trigo (Löhnis, 1960), embora próximos do limite superior quanto à toxidez que, segundo Stevenson (1982), começa acima de 500 mg.g⁻¹. Deve-se atentar, porém, que a inoculação manteve o teor de Mn 30 a 45% menor do que o tratamento não inoculado.

A flutuação do pH no experimento, 5,5 a 6,5, pode ter alterado a atividade de Cu e Mn na solução. No entanto, como o pH foi semelhante no tratamento inoculado e no não inoculado, é válida a comparação da absorção de metais pelo trigo na presença ou ausência de inoculante. Além disso, com a retificação da solução metálica a cada 5 horas, pode-se esperar que, durante boa parte dos dias do teste, os cátions Cu e Mn tenham permanecido solúveis.

No presente ensaio, não foi feita determinação de Cu ou Mn na raiz. Considerou-se suficiente a determinação na parte aérea para discriminar o efeito da bactéria na disponibilidade desses metais em relação ao trigo.

No solo, a sorção bacteriana de metais, embora mais eficiente do que a de argilas, atinge valores menores do que os desses colóides em virtude da proporção muito maior de argila no solo (Walker et al., 1989). A expectativa de relevância da sorção de cátions por bactérias na disponibilidade de oligoelementos é maior na rizosfera pela maior representatividade de biomassa bacteriana entre os sorventes encontrados nesse hábitat.

Outro aspecto do fenômeno de sorção metálica bacteriana em relação à disponibilidade para as plantas é o da quantidade do metal na solução do solo. Levantamentos de Mn^{2+} na solução de solos agrícolas do Paraná (Borkert, 1991) e de Cu^{2+} trocável em solos agrícolas do Rio Grande do Sul (Luchese &

TABELA 3. Consumo de solução aquosa por plântulas de trigo durante dois dias, em função da presença de Cu^{2+} ou Mn^{2+} ($0,165 \text{ mmol.L}^{-1}$) e inoculação de *Pseudomonas* sp. Média de 3 repetições¹.

Tratamento	Consumo de solução (mL.3 pl^{-1})					
	H_2O	$\text{H}_2\text{O, inoc.}$	Cu^{2+}	$\text{Cu}^{2+, inoc.}$	Mn^{2+}	$\text{Mn}^{2+, inoc.}$
Anahuac	10,0 a	9,6 ab	2,5 c	6,0 bc	8,9 ab	9,5 ab
BR 35	10,0 a	9,2 ab	3,0 c	6,5 b	10,1 a	10,5 a

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; C.V. = 11,43%.

Bohnen, 1987) mostraram ocorrência esporádica de teores insuficientes para as necessidades das plantas. Nesses casos, a sorção bacteriana desses cátions acentuaria sua deficiência nas plantas.

A proporção de Cu^{2+} e Mn^{2+} como cátions livres na solução do solo é pequena em comparação com os mesmos cátions complexados por compostos orgânicos (Stevenson, 1982; Barber, 1984; Marschner, 1990). Quando solúveis, os complexos contribuem para a disponibilidade dos metais às plantas. Se a ocorrência da quase totalidade do Cu^{2+} e Mn^{2+} na solução do solo estiver na forma de complexos e os microorganismos não puderem competir por esses metais, pouca relevância terá o fenômeno de sorção microbiana desses metais para a nutrição das plantas.

O significado do presente trabalho reside mais na demonstração direta da ocorrência de competição por metais entre a sorção microbiana e a absorção pelas plantas. As ilações sobre a significância dele para condições mais complexas do solo e para todo o ciclo da planta carecem de estudos de outros fatores intervenientes, tais como: interação com outros microorganismos, efeitos de quelantes e competição com outros colóides e cátions do solo.

CONCLUSÃO

1. Na rizosfera do trigo, *Pseudomonas* sp. compete por cobre ou por manganês em solução, diminuindo em 70% e 35%, respectivamente, o seu teor na parte aérea da planta.

2. A competição de uma *Pseudomonas* sp. por cobre ou por manganês é igual nas cultivares Anahuac ou BR 35 de trigo.

REFERÊNCIAS

- BARBER, S.A. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. New York: John Wiley, 1984. 398p.
- BEVERIDGE, T.J. Role of cellular design in bacteria-metal accumulation and mineralization. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.43, p.147-171, 1989.
- BORKERT, C.M. Manganês. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. (Eds.). *Micronutrientes na agricultura*. Piracicaba: POTAFOS, 1991. p.173-190.
- DOMMERGES, Y.R. The plant-microorganism system. In: DOMMERGES, Y.R.; KRUPA, S.V. (Eds.). *Interaction between nonpathogenic soil microorganisms and plants*. New York: Elsevier, 1978. p.1-38.
- GRAY, T.R.C.; WILLIAMS, S.T. *Soil microorganisms*. Edinburg: Oliver & Boyd, 1971. 240p.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. *The method for growing plants without soil: water-culture*. Berkeley: Univ. of California, 1938. 32p. (Circular of the Agricultural Experimentation Station, 347).
- LÖHNIS, M.P. Effect of magnesium and calcium supply on the uptake of manganese by various crop plants. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.12, p.339-376, 1960.
- LOUTIT, J.M.; BROOKS, R. Rhizosphere organisms and molybdenum concentrations in plants. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v.2, p.131-135, 1970.
- LUCHESE, E.B.; BOHNEN, H. Levantamento dos teores de cobre no Rio Grande do Sul. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.30, p.607-613, 1987.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press, 1990. 674p.

- SHOKOHIFARD, G.; HAMADA, R.; SAKAGAMI, K. Ion-(Na)-holding capacity of microbial biomass under saline conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v.22, n.7, p.993-994, 1990.
- STEVENSON, F.J. *Cycles of soil-carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. New York: John Wiley, 1982. 380p.
- TAN, E.L.; LOUTIT, M.W. Concentration of molybdenum by extracellular material produced by rhizosphere bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v.8, p.461-464, 1976.
- TEDESCO, M.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia, 1985. 188p. (Boletim Técnico, 5).
- VOSS, M. *Sorção de cobre e manganês por bactérias rizosféricas de trigo (*Triticum aestivum* L.)*. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia, 1993. 104p. Tese de Doutorado.
- WALKER, S.G.; FLEMMING, C.A.; FERRIS, F.G.; BEVERIDGE, T.J.; BAILEY, G. Physicochemical interaction of *Escherichia coli* cell envelopes and *Bacillus subtilis* cell walls with composite to immobilize heavy metals from solution. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.55, n.11, p.2976-2984, 1989.