

## ADIÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE NO CRESCIMENTO, NODULAÇÃO E ABSORÇÃO DE NUTRIENTES EM SOJA

### HEXAVALENT CHROMIUM EFFECTS ON SOYBEANS GROWTH, NITROGEN FIXATION AND NUTRIENTS ABSORPTION

Danilo Dufech Castilhos<sup>1</sup> Claudia das Neves Costa<sup>2</sup> Caio César Passianoto<sup>2</sup>  
Ana Claudia Rodrigues de Lima<sup>3</sup> Claudia Liane Rodrigues de Lima<sup>3</sup> Valberto Muller<sup>3</sup>

#### RESUMO

Foram avaliados os efeitos de doses crescentes de  $Cr^{6+}$  sobre a produção de matéria seca, absorção de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja. Antes da semeadura, as sementes foram tratadas com inóculo turfoso contendo *Bradyrhizobium japonicum*. As plantas foram cultivadas durante 40 dias em vasos "Leonard" que continha areia na parte superior e solução nutritiva sem nitrogênio na parte inferior. Os tratamentos constaram das seguintes doses de  $Cr^{6+}$  ( $K_2Cr_2O_7$ ) na solução nutritiva: 0, 5, 10, 20 e 40mg  $\ell^{-1}$ . Foi constatado que concentrações de  $Cr^{6+}$  maiores que 5mg  $\ell^{-1}$  diminuíram a produção de matéria seca da parte aérea e radicular da soja, o número e peso de nódulos secos de *Bradyrhizobium*, como também a fixação biológica de nitrogênio e a absorção de P, K, Ca e Mg. Teores de Cr na parte aérea de plantas de soja superiores a 3,4mg  $Kg^{-1}$  podem ser considerados fitotóxicos.

**Palavras-chave:** cromo hexavalente, soja, *Bradyrhizobium japonicum*, fixação simbiótica- $N_2$ .

#### SUMMARY

This study was carried out to evaluate the effect of hexavalent chromium on dry matter production, nutrient uptake and nitrogen fixation in soybeans (*Glycine max*). The seeds were inoculated with commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 587 and 5019) and the plants were grown in "Leonard Jars" containing washed sand in the upper portion and nutrient solution (without N) in the lower. Five  $Cr^{6+}$  concentrations were used: 0, 5, 10, 20 e 40mg  $\ell^{-1}$  in the nutrient solution. Concentrations of  $Cr^{6+}$  above 5mg  $\ell^{-1}$  decreased plants and nodules dry matter production, number of nodules, nitrogen fixation and P, K, Ca e Mg uptake. Chromium concentrations in soybean tops above 3,4mg  $kg^{-1}$  were considered phytotoxic.

**Key words:** Hexavalent chromium, soy bean, *Bradyrhizobium japonicum*, Symbiotic nitrogen fixation.

#### INTRODUÇÃO

O cromo é um metal que ocorre no ecossistema como resultado da intemperização do material de origem dos solos e que pode ser introduzido através de deposições de resíduos de origem industrial como curtumes e siderurgia. A disposição no solo pode causar uma significativa poluição de aquíferos e do próprio solo quando os efluentes dessas indústrias são depositados ou utilizados na irrigação e/ou como insumo agrícola.

O cromo na forma trivalente ( $Cr^{3+}$ ) tem sido considerado um elemento estável no solo. Entretanto, alguns estudos com amostras de solo coletadas e mantidas com umidade natural indicam que o  $Cr^{3+}$  pode ser oxidado a  $Cr^{6+}$  (BARTLETT & JAMES, 1979; MILACIC & STUPAR, 1995). Esses autores atribuem essa oxidação à presença de manganês na forma oxidada ( $Mn^{4+}$ ), o qual atua como receptor de elétrons, havendo a transformação do  $Cr^{3+}$  para  $Cr^{6+}$ , com permanência de vários meses.

Na natureza, o cromo ocorre tanto na forma trivalente como na forma hexavalente. Devido à sua maior solubilidade, o  $Cr^{6+}$  apresenta maior toxicidade do que o  $Cr^{3+}$ . A presença de algumas dessas formas em quantidades prejudiciais para as

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), 96001-970, Pelotas/RS. E-mail: danilodc@ufpel.tche.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Pós-graduando em Ciência do Solo, FAEM, UFPEL, bolsista CNPq.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrícola, Pós-graduando em Ciência do Solo, FAEM, UFPEL, bolsista CNPq.

plantas pode resultar em danos como clorose, redução de crescimento foliar e radicular e morte (MERTZ, 1969). Devido ao alto poder de oxidação do  $\text{Cr}^{6+}$ , danos à membrana de células das plantas e de microrganismos tem sido observada (HUNTER & VERGNANO, 1953; BARCELO *et al.*, 1985; SHARMA *et al.*, 1995). OGAWA *et al.* (1989) observaram que a presença de  $\text{Cr}^{6+}$  causou a inativação da enzima DNA polimerase e conseqüente decréscimo da divisão celular em *Bacillus subtilis*. Os efeitos tóxicos do  $\text{Cr}^{6+}$  nas plantas são causados por alterações no conteúdo de nutrientes essenciais e decréscimo da taxa de fotossíntese como conseqüência do fechamento de estômatos, alteração de cloroplastos e redução do espaço intercelular (VASQUES *et al.*, 1987).

O presente trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos de doses crescentes de  $\text{Cr}^{6+}$  sobre a produção de matéria seca, absorção de nutrientes e fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos da FAEM/UFPel. Para o cultivo da soja, foi utilizado areia pura, peneirada (<2,0mm) e lavada com  $\text{HCl}$  0,25Mol  $\ell^{-1}$  e água destilada, acondicionada em vasos "Leonard" previamente esterilizados em autoclave por 30 minutos. A parte inferior do vaso recebeu 400ml de solução nutritiva, específica para a cultura da soja, cuja composição é apresentada na tabela 1.

O nitrogênio foi suprimido da solução nutritiva para não causar interferência no processo de fixação biológica deste elemento. Antes da semeadura da soja as sementes foram peletizadas utilizando-se inóculo turfoso específico, açúcar

como adesivo e calcário. O inóculo continha um mínimo de  $10^8$  cél.  $\text{g}^{-1}$  de *Bradyrhizobium japonicum* composto de um consórcio das estirpes "SEMIA" 587 e "SEMIA" 5019 selecionadas pelo Serviço de Microbiologia da FEPAGRO /RS. Em cada vaso foram plantadas 6 sementes de soja da variedade "Embrapa 48". Após 7 dias da emergência foi feito o desbaste para 3 plantas por vaso.

Foram utilizadas 5 doses de  $\text{Cr}^{6+}$  adicionado à solução nutritiva na forma de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . As doses foram de 0, 5, 10, 20 e 40mg de  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$ , com 3 repetições, sendo os vasos dispostos em um delineamento completamente casualizado. A solução nutritiva bem como os tratamentos de  $\text{Cr}^{6+}$  foram repostos a cada 4 dias de cultivo para que fossem mantidas as concentrações de nutrientes da tabela 1 e do  $\text{Cr}^{6+}$ . Após 40 dias da emergência, as plantas foram colhidas separando-se a parte aérea do sistema radicular. Após a lavagem das raízes os nódulos foram destacados, coletados e secos em estufa ( $65^\circ\text{C}$ ) durante 72h, juntamente com a parte vegetal.

O número de nódulos foi determinado logo após a coleta. Após a secagem foi determinado o peso seco da parte aérea, do sistema radicular e dos nódulos das plantas. Na parte aérea determinaram-se os teores de N, P, K, Ca e Mg conforme metodologia descrita em TEDESCO *et al.* (1995). Os teores de Cr foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite. Com base no peso seco das plantas e na concentração de nutrientes calculou-se a quantidade de cada elemento absorvida por planta. Os dados foram estudados pela análise da variância, comparação de médias pelo teste Tukey (5%) e regressão polinomial com utilização do programa "Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas" (SAEG 6.0), da Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 14 dias após a emergência das plantas, foram observados sintomas de clorose e podridão apical nas plantas cultivadas nos tratamentos contendo 10, 20 e 40mg  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$ . Na dose 40mg de  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$ , ocorreu a morte das plantas aos 19 dias de cultivo. Esta tolerância da soja a pequenas concentrações de  $\text{Cr}^{6+}$  também foi observada em cultivos hidropônicos com feijão (BONET *et al.*, 1991) e trigo (SHARMA *et al.*, 1995). A redução no crescimento foliar, pela presença de cromo, somente foi observada em concentrações superiores a 13mg de  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$ . No presente trabalho, a produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de soja bem como o número e o peso seco dos nódulos não foram afetados pela

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva para o cultivo da soja em areia.

Elemento	Forma de suprimento	Concentração do elemento
		mg $\ell^{-1}$
P	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	36
K	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	45
Ca	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Mo	$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,001
B	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,25
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
Fe	Fe-EDTA	5,0

presença de 5mg de  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$  na solução nutritiva, cujos valores foram estatisticamente semelhantes aos obtidos com a ausência de  $\text{Cr}^{6+}$  (Tabela 2).

Alguns mecanismos microbianos de tolerância ao  $\text{Cr}^{6+}$  têm sido estudados, como a bioacumulação de metais na forma aniônica em quantidades de até 2% do peso celular. A acumulação intracelular de  $\text{CrO}_4^{2-}$  pode ocorrer pelo mesmo sistema de transporte do  $\text{SO}_4^{2-}$  (ROSSI, 1990). A adaptação microbiana a  $\text{Cr}^{6+}$  através da sua redução para  $\text{Cr}^{3+}$ , forma considerada de baixa toxicidade, foi também observada em isolados de amostras de solo (WANG & XIAO, 1995), água (LULI *et al.*, 1983), sedimentos (DE LEO & EHRlich, 1994) e lodo de esgoto (WANG *et al.*, 1989). A redução biológica pode ocorrer em nível radicular, pela ação da enzima cromato redutase, sendo o íon cromato ( $\text{Cr}^{6+}$ ) receptor de elétrons oriundos de substratos como a glicose (LOVLEY, 1993), comum em raízes de plantas como a soja, comumente associada a microrganismos diazotróficos.

A redução do número de nódulos nas raízes de soja com o aumento das doses de  $\text{Cr}^{6+}$  indica o efeito tóxico deste metal sobre os microrganismos, principalmente a bactéria do gênero *Bradyrhizobium* responsável pela fixação do  $\text{N}_2$ . Tem sido observado que quantidades excessivas de  $\text{Cr}^{6+}$  provocam menor divisão celular, aumento do tempo de geração e inibição da síntese de DNA, devido à inativação da enzima DNA polimerase (OGAWA, 1989).

O aumento da concentração de  $\text{Cr}^{6+}$  na solução nutritiva provocou um aumento nos teores desse metal no tecido da soja (Tabela 3); o aumento nos teores dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg no tecido podem ser devidos ao efeito de concentração, à medida que a produção de matéria seca foi reduzida pela presença do cromo.

Tabela 2 - Matéria seca produzida e número de nódulos de plantas de soja cultivadas na presença de  $\text{Cr}^{6+}$ .

$\text{Cr}^{6+}$ Adicionado	Matéria seca		Nódulos	
	Parte aérea	Raízes	Número	Peso seco
mg $\ell^{-1}$	----- g vaso <sup>-1</sup> -----			mg
0	1,08a	0,26a	10a	27a
5	0,87a	0,22a	7a	12ab
10	0,52 b	0,14 b	6a	3 b
20	0,23 c	0,081 b	1 b	2 b

Médias seguidas de letras distintas entre si na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5%.

Tabela 3 - Teores de macronutrientes e de cromo no tecido foliar de soja cultivada na presença de  $\text{Cr}^{6+}$ .

$\text{Cr}^{6+}$ Adicionado	N	P	K	Ca	Mg	Cr
mg $\ell^{-1}$	-----g kg <sup>-1</sup> -----					mg kg <sup>-1</sup>
0	26,3 c	1,6 c	14,2a	14,1 c	7,4 b	0,0
5	33,5 c	1,4 c	13,2a	16,2 b	7,4 b	3,4 c
10	40,1 b	2,2 b	16,4a	21,2a	7,9 b	14,5 b
20	66,1a	2,9a	16,7a	22,5a	9,8a	34,5a

Médias seguidas de letras distintas entre si na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5%.

A análise de regressão entre as concentrações de  $\text{Cr}^{6+}$  na solução nutritiva e os teores de cromo no tecido foliar da soja mostrou um coeficiente  $r^2=0,98$ , significativo ao nível de 1%, o que demonstra a alta relação entre a absorção deste metal e a sua disponibilidade. A toxicidade do  $\text{Cr}^{6+}$  para as plantas varia conforme a capacidade de tolerância das diversas espécies. CHANG *et al.* (1992) verificaram que teores no tecido acima de 5,9mg kg<sup>-1</sup> causaram 50% de retardamento no crescimento de plantas de milho. LOSI *et al.* (1994) afirmam que efeitos tóxicos para a maioria das plantas são comuns quando a concentração nas folhas é superior a 18mg kg<sup>-1</sup>. No presente trabalho foi observado uma redução de 49% na produção de matéria seca total das plantas de soja no tratamento com adição de 10mg de  $\text{Cr}^{6+}$  na solução, sendo a concentração de  $\text{Cr}^{6+}$  no tecido das plantas igual a 14,5mg kg<sup>-1</sup>.

A menor fixação biológica de nitrogênio e absorção dos macronutrientes pela presença do  $\text{Cr}^{6+}$  provocou significativa redução das quantidades de N, P, K, Ca e Mg e aumento de cromo, absorvidos pelas plantas de soja, principalmente nas dosagens superiores a 5,0mg de  $\text{Cr}^{6+}$   $\ell^{-1}$  (Tabela 4).

BISHNOI *et al.* (1993) também observaram maiores danos ao sistema radicular e redução na absorção de nutrientes em plantas de ervilha cultivadas com doses crescentes de  $\text{Cr}^{6+}$ .

## CONCLUSÕES

A produção de matéria seca da parte aérea e radicular da soja, o número e peso de nódulos de *Bradyrhizobium*, como também a fixação biológica de nitrogênio e a absorção de P, K, Ca e Mg decresceram em cultivos com concentrações de  $\text{Cr}^{6+}$  superiores a 5mg  $\ell^{-1}$ . Teores de Cr na parte aérea de plantas de soja maiores que 3,4mg kg<sup>-1</sup> podem ser considerados fitotóxicos.

Tabela 4 - Quantidades de macronutrientes e de cromo absorvidos por planta de soja cultivada na presença de Cr<sup>6+</sup>.

Cr <sup>6+</sup> Adicionado	N	P	K	Ca	Mg	Cr
mg ℓ <sup>-1</sup>	-----mg-----					μg
0	9,47a	0,58a	5,11a	5,07a	2,66a	0,0
5	9,71a	0,41 b	3,83 b	4,70ab	2,15a	0,98 b
10	6,95 b	0,38 b	2,84 b	3,67 b	1,37b	2,51a
20	5,06 b	0,22 c	1,28 c	1,72 c	0,75c	2,64a

Médias seguidas de letras distintas entre si na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELO, J., POSCHENRIEDER C., GUNSE, B. Effect of chromium (VI) on mineral element composition of bush beans. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.8, p.211-217, 1985.
- BARTLETT, R.J., JAMES, B.R. Behavior of chromium in soils.III. Oxidation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.8, n.11, p.31-35, 1979.
- BISHNOI, N.R., DUA, A., GUPTA, V.K., *et al.* Effects of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. **Agricultural Ecosystem Environmental**, Amsterdam, v.47, n.1, p.47-57, 1993.
- BONET, A., POSCHENRIEDER, C., BARCELO, J. Chromium III-ion interaction in Fe-deficient an Fe-sufficient bean plants. I Growth and nutrient content. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.14, p.403-414, 1991.
- CHANG, A.C., GRANATO, T.C., PAGE, A.L. A methodology for establishing phytotoxicity criteria for chromium, copper, nickel and zinc in agricultural land application of municipal sewage sludge. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.21, n.4, p.521-536, 1992.
- DE LEO, C.P., EHRLICH, H.L. Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB 300 in batch and continous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.40, p.756-759, 1994.
- HUNTER, J.G., VERGNANO, O. Trace element toxicities in oat plant. **Annals Applied Biology**, New York, v.40, p.761-777, 1953.
- LOSI, M.E., AMRHEIN, C., FRANKENBERGER, W.T. Environmental biochemistry of chromium. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.135, p.91-121, 1994.
- LOVLEY, D. Dissimilatory metal reduction. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v.46, p.276-290, 1993.
- LULI, G.W., TALNAGI, J.W., STROHL, W.R. Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.4, p.846-854, 1983.
- MERTZ, W.E. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiology Reviews**, Baltimore, v.49, p. 163-239, 1969.
- MILACIC, R., STUPAR, J. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste and sewage sludge-amended soils. **Environmental Science and Technology**, Easton, v.29, n.2, p.506-514, 1995.
- OGAWA, T., USUI, M., YATOME, C., *et al.* Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p.254-260, 1989.
- ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. Hamburg : Mc Graw Hill, 1990. 609p.
- SHARMA, D.C., CHATTERJEE, C., SHARMA, C.P. Chromium accumulation and its effects on wheat metabolism. **Plant Science**, Dublin, v.111, p.145-151, 1995.
- TEDESCO M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A., *et al.* **Análises de solos , plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre : Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p. (Boletim Técnico 5).
- WANG, P.C., MORI, T., KOMORI, K. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.7, p.1665-1669, 1989.
- WANG Y.T., XIAO, C. Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure culture of bactéria. **Water Research**, London, v.29, n.11. p.2467-2474, 1995.